

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE
HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**Obtención y estandarización del extracto de las
hojas de *Peumus boldus* Mol “boldo”. Ayacucho
2020**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA

Presentado por:

Bach. Prado Moreno, Ani Yesenia

Asesor:

Q.F. Aronés Jara, Marco Rolando

AYACUCHO - PERÚ

2021

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

RESOLUCIÓN DECANAL N° 365-2021-FCSA-UNSCH-D

BACHILLER: Ani Yesenia, PRADO MORENO

En la ciudad de Ayacucho, siendo las nueve horas, del día diecinueve del mes de octubre del año dos mil veintiuno, se reunieron a través de la plataforma virtual los docentes miembros del jurado de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, para el acto de sustentación de trabajo de tesis titulado: **"OBTENCIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE *Peumus boldus* Mol. "BOLDO" AYACUCHO 2020"**. Presentado por la bachiller **Ani Yesenia, PRADO MORENO** para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. Los miembros del Jurado de Sustentación conformado por:

Presidente : Prof. José Alejandro Yarleque Mujica

Miembros : Prof. Maricela López Sierralta

Prof. Edgar Cárdenas Landeo

Prof. Juan C. Paniagua Segovia (4to jurado)

Asesor : Prof. Marco R. Arones Jara

Secretario Docente (e): Prof. Osmar Héctor Huaraca Cárdenas

Con el quorum de reglamento se dio inicio la sustentación de tesis, el presidente de la comisión pide al secretario docente dar lectura a los documentos presentados por el recurrente, resolución decanal y algunas indicaciones al sustentante.

Da inicio la exposición la Bachiller: Ani Yesenia, PRADO MORENO, una vez concluida la exposición en el tiempo reglamentario. El presidente de la comisión solicita a los miembros del jurado evaluador realizar sus respectivas observaciones, preguntas y recomendaciones, seguidamente da pase al asesor de la tesis Profesor Marco R. Arones Jara, para que pueda dilucidar algunas preguntas, interrogantes, aclaraciones, etc.

El presidente invita a la sustentante abandonar el espacio virtual para que puedan proceder con la calificación.

RESULTADO DE LA EVALUACIÓN FINAL

Bachiller: Ani Yesenia, PRADO MORENO

JURADOS	TEXTO	EXPOSICIÓN	PREGUNTAS	P. FINAL
Prof. José A. Yarleque Mujica	17	17	16	17
Prof. Maricela López Sierralta	17	17	15	16
Prof. Edgar Cárdenas Landeo	17	17	17	17
Prof. Juan C. Paniagua Segovia	17	17	17	17
Prof. Marco R. Arones Jara	17	17	15	16
PROMEDIO FINAL				17

De la evaluación realizada por los miembros del jurado calificador, llegaron al siguiente resultado: Aprobar por unanimidad a la Bachiller **Ani Yesenia, PRADO MORENO**; quien obtuvo la nota final de 17 (diecisiete) para la cual los miembros del jurado evaluador firman al pie del presente, siendo las once horas con ocho minutos, se da por concluido el presente acto académico virtual.



Firmado digitalmente
por José Alejandro
YARLEQUÉ MUJICA
Fecha: 2021.10.19
12:10:26 -05'00'

Prof. José A. Yarleque Mujica
Presidente

MARICELA LÓPEZ SIERRALTA
Firmado digitalmente
por MARICELA LÓPEZ
SIERRALTA
Fecha: 2021.10.19
11:23:37 -05'00'

Prof. Maricela López Sierralta
Miembro



Firmado digitalmente por
**CARDENAS LANDEO
EDGAR**
Fecha: 2021.10.19
11:33:28 -05'00'

Prof. Edgar Cárdenas Landeo
Miembro



Firmado digitalmente
por Juan C. Paniagua
Segovia
Fecha: 2021.10.19
12:12:59 -05'00'

Prof. Juan C. Paniagua Segovia
Miembro



Firmado digitalmente por
**Marco R. Aronés
Jara**
Fecha: 2021.10.19
11:38:00 -05'00'

Prof. Marco R. Aronés Jara
Miembro asesor



Firmado digitalmente
por **HUARACA
CARDENAS OSMAR
HECTOR**
Fecha: 2021.10.19
11:11:05 -05'00'

Prof. Osmar H. Huaraca Cárdenas
Secretario Docente (e)

A mis padres Timoteo Prado
Quicaño y Martina Moreno
Tenorio quienes son mi
inspiración y motivación, a mis
hermanos, docentes y amigas.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por ser una Institución de alto nivel académico y forjar profesionales con alto nivel intelectual.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, en especial a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica y a los docentes sin excepción, por ser parte de mi carrera profesional, por compartir su tiempo para mejorar mi aprendizaje. Agradecer por su digna labor y doy mi reconocimiento por fomentar la educación de generación en generación, inculcando valores, sembrando conocimientos y formando a mejores profesionales y ciudadanos.

Al Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Medicamentos y Fitomedicamentos (CEDACMEF) por permitir hacer realidad este trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURA	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Antecedentes	3
2.2 <i>Peumus boldus</i> Molina	5
2.2.2 Descripción morfológica	5
2.2.3 Composición química	6
2.2.4 Aspectos fitoterapéuticos de <i>P. boldus</i>	7
2.3 Estandarización de extractos vegetales	8
2.4 Análisis de drogas vegetales por (CLAR)	9
III. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Lugar de ejecución	11
3.2 Definición de la población y muestra	11
3.3. Diseño metodológico	11
3.3.1 Tipo de estudio	11
3.3.2 Diseño experimental	11
3.4 Obtención del extracto acuoso	11
3.5 Estandarización del extracto	12
3.5.1 Preparación de las muestras para la identificación	12
3.5.2 Instrumentación	12
3.5.3 Valoración de boldina por HPLC-DAD	12
3.6 Análisis estadísticos	13
IV. RESULTADOS	15
V. DISCUSIÓN	233
VI. CONCLUSIÓN	27
VII. RECOMENDACIONES	29
VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS	311
IX. ANEXOS	333

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Cuantificación de Boldina en extractos secos de hojas de <i>P. boldus</i> M. Ayacucho 2020	22

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura química de la boldina	06
Figura 2. Espectro de absorción UV-VIS de la Boldina en el extracto seco de hojas de <i>P. boldus</i> M. Ayacucho 2020	17
Figura 3. Identificación de Boldina en el extracto acuoso de hojas de <i>P. boldus</i> M. Ayacucho 2020	18
Figura 4. Identificación de Boldina en el extracto hidroalcohólico (Etanol 55°) de hojas de <i>P. boldus</i> M. Ayacucho 2020	19
Figura 5. Identificación de Boldina en el extracto hidroalcohólico (Etanol 65°) de hojas de <i>P. boldus</i> M. Ayacucho 2020	20
Figura 6. Curva de calibración de Boldina para la cuantificación en el extracto seco de hojas de <i>P. boldus</i> M. Ayacucho 2020	21

ÍNDICE DE ANEXO

Anexo 1.	Certificado de identificación de <i>Peumus boldus</i> Mol. Ayacucho-2020.	35
Anexo 2.	Cromatograma del estándar primario de boldina, según la farmacopea europea, en el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Donde muestra el tiempo de retención a 1.220 min y área del pico 45,238. Ayacucho-2020.	36
Anexo 3.	Cromatograma de la boldina, obtenidos del extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus boldus</i> Mol. Según la farmacopea europea. En el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Donde muestra el tiempo de retención a 1.200min y área del pico 22,026. Ayacucho-2020.	37
Anexo 4.	Datos descriptivos del contenido de Boldina en los extractos de hojas de <i>Pneumus boldus</i> Mol. “boldo”, Ayacucho 2020.	38
Anexo 5.	Análisis de varianza del contenido de Boldina en los extractos de hojas de <i>Pneumus boldus</i> Mol. “boldo”, Ayacucho 2020.	39
Anexo 6.	Análisis de comparaciones múltiple de Tukey del contenido de Boldina en los extractos de hojas de <i>Pneumus boldus</i> Mol. “boldo”, Ayacucho 2020.	40
Anexo 7.	Equipo Cromatógrafo líquido de Alta Resolución marca UltiMate 3000 del Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Ayacucho – 2020	41
Anexo 8.	Procedimiento de filtrar el agua y la fase móvil para utilizar en el equipo Cromatógrafo líquido de Alta Resolución marca UltiMate 3000. En el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Ayacucho – 2020	42
Anexo 9.	Procedimiento de pesado del estándar de boldina y la muestra, extracto de las hojas de <i>Peumus boldus</i> Mol. En el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Ayacucho-2020.	43

Anexo 10.	Procedimiento de pesado de la muestra del extracto de las hojas de <i>Peumus boldus</i> Mol. En el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Ayacucho-2020.	44
Anexo 11.	El uso de rotavapor. En el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Ayacucho-2020.	45
Anexo 12.	Procedimiento de extracción del alcaloide “boldina” con el cloruro de metileno R En el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Ayacucho-2020.	46
Anexo 13.	Procedimiento de concentración de la muestra. En el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Ayacucho-2020.	47
Anexo 14.	Procedimiento donde se está llevando a un pH de 9.5 tal cual dice en la farmacopea europea. En el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Ayacucho-2020.	48
Anexo 15.	La estufa. En el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Ayacucho-2020.	49
Anexo 16.	Procedimiento de obtención del extracto acuoso e hidroalcohólico. En el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Ayacucho-2020.	50
Anexo 17.	Matriz de consistencia	51

RESUMEN

La Farmacopea Europea establece que los extractos de hojas de *Peumus boldus* Molina, deben contener un mínimo de 0,1% de alcaloides totales expresados como boldina. Asimismo, la Agencia Europea de Medicamentos ha aprobado su uso tradicional y se requiere de extractos estandarizados para una adecuada administración y dosificación. La investigación tuvo como objetivo obtener y estandarizar el extracto de las hojas de “boldo” que procedieron del departamento de Junín. Los extractos secos se obtuvieron por maceración a 45°C, utilizando como solventes agua y mezclas hidroalcohólicas. La identificación y cuantificación se realizó por HPLC, según lo descrito en la Farmacopea Europea. Se usó una columna C18 de 250mm x 4,60mm, el método fue isocrático a 25°C, la fase móvil fue una solución dietilamina:acetonitrilo y ácido fórmico (16:84 v/v), flujo 1,5 mL/min, volumen de inyección de 20 µl, longitud de onda de 304 nm y barrido UV-VIS de 200 a 600 nm. Los extractos presentaron picos de máxima absorción a longitudes de onda de 225 nm y 281 nm y un tiempo de retención de 1,2 minutos. Los extractos presentaron un color marrón y un aspecto higroscópico. El extracto hidroalcohólico de 65°, presentó un mayor contenido alcaloides de $0,295 \pm 0,007\%$, estadísticamente superior ($p < 0,05$) al extracto hidroalcohólico de 55° y el extracto acuoso que presentaron contenidos de alcaloides expresados en boldina de $0,054 \pm 0,003\%$ y $0,019 \pm 0,001\%$, respectivamente. Se concluye que es posible obtener y estandarizar el extracto de las hojas de *Peumus boldus* Mol. “boldo”.

Palabras claves: *Peumus boldus*, extracto, estandarización.

I. INTRODUCCIÓN

Peumus boldus Molina, conocida vulgarmente como “boldo”, es una especie nativa de Sudamérica, que crece abundantemente en la zona central de Chile, además en el sur del Perú y Marruecos. El boldo crece en prados secos, soleados, de climas fríos y templados¹.

Tradicionalmente las hojas de boldo se han utilizado para el dolor de oído, dolor de cabeza, reumatismo, congestión nasal y, sobre todo, para trastornos digestivos y biliares. Su uso extendido, principalmente para dispepsias y espasmos digestivos leves, por sus propiedades hepatoprotectoras, coleréticas y colagogicas, y también como sedante suave, ha llevado a su inclusión en la Farmacopea Europea y su evaluación por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA)².

Muchos estudios atribuyen el efecto benéfico del boldo a su contenido de boldina, considerado su alcaloide más característico; sin embargo, el notable contenido de polifenoles en esta especie, especialmente catequina y compuestos relacionados, más concentraciones relevantes de otros alcaloides fenólicos, sugieren una interpretación más compleja².

Así, la Farmacopea Europea considera como droga vegetal a las hojas de *P. boldus* M. (*Boldi folium*), y establece que éstas deben contener un mínimo de 0,1% de alcaloides totales expresados como boldina³. De igual manera, la EMA ha aprobado su uso tradicional para el alivio sintomático de la dispepsia y de las afecciones gastrointestinales leves de carácter espasmódico; y la Cooperativa Científica Europea de Fitoterapia (ESCOP) indica además su uso en disfunciones hepatobiliares menores y como coadyuvante en el tratamiento del estreñimiento⁴. El uso de *P. boldus*, en el ámbito de la fitoterapia, está muy difundido. Se usa como hojas desecadas, extractos, comprimidos, tanto en presentaciones simples como compuestas⁴.

La EMA, respecto a la posología, lo recomienda tanto para adultos y ancianos en forma de infusión y como extracto seco. Así mismo, la ESCOP, recomienda su uso en forma de infusión tintura y extracto fluido⁴.

Respecto al uso de extractos, éstos generalmente son conocidos como estandarizados o normalizados. La reglamentación europea para los medicamentos define claramente lo que son los extractos normalizados, así como otras dos categorías de extractos según la especificación de contenido en principios activos (extractos normalizados) o marcadores (extractos cuantificados)⁴.

La utilización de extractos son importantes, en primer lugar, permite la preparación de una mayor variedad de formas farmacéuticas y, segundo, disminuir las dosis con respecto a las drogas vegetales de origen⁴.

Con la finalidad de garantizar una adecuada utilización de las plantas medicinales, así como, otras formas de presentación, es necesario que los extractos utilizados sean adecuadamente preparados, vale decir estandarizados.

La Farmacopea Europea, respecto al extracto seco de hojas de boldo "*Boldi folium*", refiere que es elaborado a partir de hoja de boldo. Asimismo, indica varias posibilidades de tipo de extractos, como extractos acuosos y extractos hidroalcohólicos. Del mismo modo, establece que se puede producir mediante un procedimiento adecuado utilizando agua caliente a no menos de 65°C o un disolvente hidroalcohólico equivalente en concentración a etanol de 45-75% v/v.

En ese sentido, ante las diferentes posibilidades para la obtención y preparación de extractos a base de hojas de boldo, es que la presente investigación tiene como finalidad obtener y estandarizar extractos a base de las hojas de *P. boldus* Molina.

OBJETIVO GENERAL:

- Obtener y estandarizar el extracto de las hojas de *Peumus boldus* Mol. "boldo".

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Obtener extractos secos a partir de hojas *Peumus boldus* M.
- Estandarizar los extractos secos de hojas *Peumus boldus* M. según el contenido de alcaloides totales calculados como boldina.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Fuentes et al², evaluaron el contenido de alcaloides de *Peumus boldus*, con la finalidad de realizar un análisis cuantitativo a los alcaloides presentes en la corteza, la madera y las raíces de los árboles de boldo. Detectaron dieciocho alcaloides en la corteza, hojas, madera y raíces de *P. boldus*, incluyendo trazas de secoboldina, N-metilsecoboldina, glaucina y norreticulina, no reportados previamente como constituyentes de esta especie. Usando estándares apropiados, cuantificaron trece de ellos por UHPLC-MS/MS. La boldina fue el alcaloide dominante en la corteza y lauroiltsine en madera y raíces. La composición alcaloide de las hojas, determinada para 130 árboles identificados individualmente, clasificados por edad y sexo, fue altamente variable, donde predominaron N-metillaurotetanina, laurotetanina, coclaurina y en algunos casos isocorydina, pero no boldina.

Soto et al⁵, evaluaron el efecto de las condiciones de extracción sobre el contenido fenólico total y la capacidad antioxidante de hojas silvestres pre tratadas de *P. boldus*. Los resultados indicaron que las infusiones preparadas con bolsitas de té de boldo comerciales tenían valores de actividad antioxidante similares o superiores en comparación con las infusiones preparadas con hojas secadas por calor o liofilizadas. Los experimentos de extracción mostraron que las mezclas hidroalcohólicas son los mejores solventes para extraer antioxidantes de las hojas de boldo. Teniendo en cuenta el perfil de alcaloides de los extractos de hojas liofilizadas y bolsas de té de hierbas, por HPLC, estas últimas exhibieron mayores cantidades de los alcaloides, incluida la boldina.

Klimaczewski et al⁶, estudiaron la actividad antioxidante del extracto de *P. boldus* y del alcaloide boldina frente al daño inducido por el citrato de Fe (II) en las mitocondrias de hígado de rata in vitro. El objetivo de este estudio fue evaluar los

efectos del extracto de hoja de *P. boldus* y boldina contra los sistemas de daño oxidativo mitocondrial inducido por citrato de Fe^{2+} . Se evidenció que *P. boldus* fue un antioxidante más eficaz que la boldina, cuando se utilizaron. Los efectos antioxidantes del extracto de *P. boldus* (PbE) se pueden atribuir a sus compuestos polifenólicos, determinados por HPLC (Cromatografía líquida de alta performance). Por tanto, el del extracto de *P. boldus* (PbE) y la boldina pueden tener propiedades antioxidantes sinérgicas y contribuir al efecto protector de *P. boldus* contra las enfermedades hepáticas asociadas con el estrés oxidativo y el hierro libre.

Vogel et al⁷, evaluaron el cultivo de *P. boldus* cultivado en diferentes condiciones de luz, humedad del suelo y densidad de plantación. Determinaron que el rendimiento de hojas por planta, así como el contenido de alcaloides y aceites esenciales fueron los mismos para las plantas cultivadas bajo sombra y para las plantas expuestas a pleno sol. Las hojas producidas por el boldo cultivado generalmente cumplen con los requisitos descritos en la normativa europea. Concluyeron que el boldo se puede cultivar con éxito en las condiciones de cultivo descritas.

Simirgiotis et al⁸, identificaron los constituyentes fenólicos en infusiones de hojas de *P. boldus* mediante HPLC con arreglo de diodos y espectrometría de masas en tándem de ionización por electropulverización. Identificaron componentes fenólicos, principalmente proantocianidinas y glicósidos de flavonol. Determinaron que la huella digital de HPLC obtenida podría ser útil en la autenticación del extracto crudo, así como para el análisis cualitativo y la diferenciación de poblaciones de plantas en el rango de distribución de árboles.

Palma et al⁹, diseñaron tabletas de *P. boldus* por compresión directa utilizando un novedoso extracto. Reportaron el análisis de la mezcla de solventes con mayor rendimiento y la obtención de extracto fluido y seco. Se evaluaron varias formulaciones de tabletas conteniendo el extracto vegetal seco de boldo y excipientes comunes para compresión directa.

Yovera M²⁰, determinó el efecto protector del extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* "Boldo" en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas *Holtzman* hembra. Donde se usó el extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* Concluyendo que el extracto acuoso de *Peumus boldus* posee efecto protector en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas *Holtzman* hembra, evidenciado mediante parámetros clínicos, bioquímicos y morfológico.

Palomino A²¹, los componentes volátiles del aceite esencial de *Peumus boldus* (boldo) de origen peruano fueron obtenidos por hidrodestilación y posteriormente caracterizados usando GC-MS en los laboratorios de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM. Los resultados muestran la presencia de 21 componentes. De estos el componente mayor es 4-metil-7-etil-3,8-dioxatriciclo [5, 1,0 (7-4)] octano con 48%, seguido por 1,5 cineol con 14,9%, el trans pinocarbeol con 1.5% el 4-terpineol y el terpineol con el 1.6% cada uno. Los restantes componentes se hallan en concentraciones inferiores al 1%.

Guillen F²², realizaron el estudio del efecto hepatoprotector del *Peumus boldus* en hepatotoxicidad inducida por paracetamol en *Rattus rattus var albinus*, donde demuestran que las hojas del boldo poseen compuestos activos, entre ellos la boldina a la que algunos estudios le atribuyen propiedades hepatoprotectoras, se realizó un estudio experimental en 16 ejemplares de *Rattus rattus var albinus*, concluyendo que *Peumus boldus* posee efecto hepatoprotector en la toxicidad hepática inducida por paracetamol en *Rattus rattus var albinus*. Usando el extracto hidroalcohólico al 70%.

2.2 Peumus boldus Molina

2.2.1 Clasificación taxonómica de *Peumus boldus* “boldo”

División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Sub clase	: Magnoliidae
Orden	: Laurales
Familia	: Monimiaceae
Género	: <i>Peumus</i>
Especie	: <i>Peumus boldus</i> Molina
Nombre vulgar	: “boldo”

Fuente: Constancia emitida por la bióloga Laura Aucasime Medina especialista en taxonomía y sistemática de plantas (Anexo 1).

2.2.2 Descripción morfológica

P. boldus, es un árbol o arbusto dioico, perennifolio, deciduo de hasta 9 m de alto, aromático, frondoso, muy ramificado, con ramas alargadas. Sus **hojas** son opuestas cortamente pecioladas, perennes, ovoides u oblongas de 3-6 m de largo por 2-4 cm de ancho, coriáceas, enteras, rugosas o correosas, verde pálido en el haz y más clara y con nervios prominentes en el revés. Presenta **flores** unisexuales, blancas o amarillas campanuladas, axilares o terminales, de hasta 1

cm de diámetro; rara vez se dispone en racimos laxos. Las flores masculinas presentan muchos estambres. Los **frutos** son pequeños, carnosos, amarillos, jugosos y comestibles. Toda la planta tiene un aroma especial¹.

2.2.3 Composición química

Los principios activos de *P. boldus* son alcaloides isoquinolénicos derivados de la aporfina y la noraporfina (0,1-0,5%) de los cuales se han aislado más de una veintena, destacando en proporción de boldina (Figura 1) y otros en menor cantidad como la isoboldina, la (+) reticulina, la laurotetanina y lauroitsina. Además contiene aceite esencial (1-3%), compuestos de hidrocarburos monoterpénicos (ρ -cimeno, α -pineno y β -pineno, γ -terpineno, limoneno, β -felandreno) y monoterpenos oxigenados (1,8 cineol, linalol, alcanfor, ascaridol). Además, presenta flavonoides (ramnetol, isoramnetol, kempferol) y taninos (1-2%)⁴.

Los análisis de HPLC de muestras de hojas y extractos de boldo evidenciaron la presencia de laurotetanina o N-metillaurotetanina como alcaloides principales, seguido a menudo por isocoridina^{2,10,11}. Sin embargo, un análisis de hojas recolectadas en el centro-sur de Chile y de bolsitas de té de boldo indicó isocoridina, con menos N-metillaurotetanina, como alcaloides principales,⁵ mientras que un perfil ¹³C NMR (Resonancia magnética nuclear) de un extracto crudo de hoja de boldo sugirió que la norisocoridina era la más abundante, seguida también por N-metillaurotetanina¹².

Si bien muchos estudios atribuyen el efecto benéfico del boldo a su contenido de boldina, considerado su alcaloide más característico, el notable contenido de polifenoles en esta especie, especialmente catequina y compuestos relacionados, más concentraciones relevantes de otros alcaloides fenólicos, sugieren una interpretación más compleja.

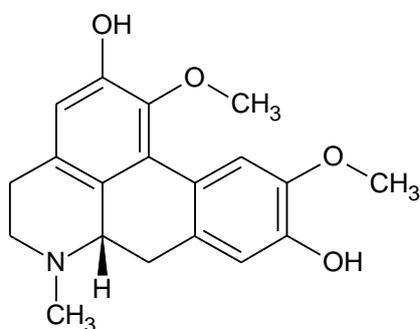


Figura 1. Estructura química de la boldina

2.2.4 Aspectos fitoterapéuticos de *P. boldus*

Según la Farmacopea Europea, la **droga vegetal** de *P. boldus*, consiste en la hoja (*Boldi folium*) entera o fragmentada desecada, con un contenido mínimo de 0,1% de alcaloides, expresados como boldina, respecto a la droga seca⁴.

La **acción farmacológica** es diversa, se usa como digestiva (aperitiva, colarética, colagoga) hepatoprotectora, antioxidante, antierematoso (inhibe la peroxidación lipídica), hipoglicemiante, antiinflamatoria, antipirética, antihelmíntica, fungicida, citoprotectora y antitumoral. El aceite esencial tiene actividad bactericida⁴.

La Farmacopea Europa, refiere que los **extractos acuosos elaborados** a partir de hoja de boldo, presenta un contenido mínimo de 0,5% del total de alcaloides, expresado como boldina ($C_{19}H_{21}NO_4$; PM: 327,4) en extracto seco y para extractos hidroalcohólicos un contenido mínimo 1,0% del total de alcaloides³.

La **producción** de extractos a partir de *Boldi folium* se realiza mediante un procedimiento adecuado utilizando agua caliente a no menos de 65°C o un disolvente hidroalcohólico equivalente en concentración al etanol (45-75% v/v).⁴

Según la EMA *P. boldus* está **indicado** para el alivio sintomático de la dispepsia y de las afecciones gastrointestinales leves de carácter espasmódico. Así mismo, la ESCOP indica su uso en disfunciones hepatobiliares menores y como coadyuvantes en el tratamiento del estreñimiento⁴.

Respecto a la **posología**, según ESCOP, *P. boldus* se usa en forma de infusión (2 -5 g de droga al día), extracto hidroalcohólico (0,2-0,6 g de droga o dosis equivalente), tintura (1:5, etanol 80%) 1-3 mL diarios, extracto fluido (1:1, etanol 80%) 0,5-1 mL diarios. Según EMA, la posología para adultos y anciano, consiste en infusión (1-2 g en 150 mL de agua, 2-3 veces al día) y como extracto seco (5:1 acuoso) 200-400 mg dos veces al día⁴. La duración del tratamiento es de dos semanas, y si los síntomas persisten, se debe consultar con un profesional de salud⁴.

P. boldus está **contraindicado** en caso de obstrucción de las vías biliares, colangitis, afecciones hepáticas, litiasis biliar y otras afecciones que requieren control médico. La Comisión E recomienda no utilizar el aceite esencial puro, debido a su contenido en ascaridol; sin embargo, hay que tener en cuenta que el aceite esencial de boldo no siempre es rico en ascaridol⁴.

No existe suficiente información que garantice la **seguridad** del uso de *P. boldus* durante el embarazo, la lactancia y en menores de 18 años.⁴

2.3 Estandarización de extractos vegetales

Los dos **procedimientos** básicos para la obtención de productos extractivos a partir de drogas vegetales son la destilación y la acción de uno o más disolventes sobre la droga. En la extracción con disolventes hay que tener en cuenta la **relación droga-extracto** (RDE), que se define como la relación entre la cantidad de droga vegetal y la de extracto obtenido con la misma. Así mismo, se debe tener en cuenta la **relación droga-disolvente** (RDD), que es la relación entre la cantidad de droga vegetal, expresada en masa, utilizada en la elaboración de un extracto y la cantidad del primer disolvente de extracción, expresada en masa o volumen⁴.

El extracto sin excipientes, se define como extracto vegetal genuino (extracto seco) y en el caso de extractos blancos y líquidos, el extracto genuino puede contener cantidades variables de disolvente de extracción⁴.

En el ámbito de la fitoterapia, para un adecuado uso de los productos extractivos, según las indicaciones y la posología, es necesario conocer intrínsecamente a los productos extractivos, tanto cualitativa como cuantitativamente, lo que se logra con el proceso de estandarización de extractos.

Con frecuencia se habla de **extractos estandarizados**, que en anglosajón significa “ajustado a una norma” (standard en inglés) y que, en español, debería traducirse como “normalizado. Al respecto, la reglamentación europea define claramente lo que son los extractos normalizados, así como otras dos categorías de extractos según la especificación de contenido en **principios activos** (extractos normalizados) o **marcadores** (extractos cuantificados)⁴.

Los **extractos normalizados**, son lo que están ajustados a un contenido definido de uno o más constituyentes con actividad terapéutica conocida. El ajuste de contenido puede realizarse mediante la adición de excipientes inertes o mediante la mezcla de lotes de extractos de diferente contenido⁴.

Los **extractos cuantificados** son los que están ajustados a uno o más marcadores activos, el contenido de los cuales está controlado dentro de un rango limitado y especificado. Los ajustes se realizan mediante la mezcla de lotes de extractos⁴.

Una última categoría son “**otros extractos**”, los cuales no se ajustan a un contenido particular de constituyentes. A efectos de control, uno o más constituyentes se utilizan como marcadores analíticos. Éstos son marcadores que se emplean con fines analíticos, para el control de calidad. En la Farmacopea, el

contenido mínimo de estos marcadores analíticos se especifica en la monografía de cada extracto natural⁴.

2.4 Análisis de drogas vegetales por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR, en inglés: HPLC, High Performance Liquid Chromatography), en ocasiones denominada cromatografía líquida de alta eficacia, es una técnica de separación cromatográfica en la que una fase móvil líquida circula a través de una fase estacionaria sólida contenida en una columna. Se basa principalmente en mecanismos de adsorción, de reparto, de intercambio iónico o de exclusión molecular. En cromatografía líquida, la rapidez de equilibrio del soluto entre la fase móvil y la estacionaria es mayor cuanto menor es la dimensión de las partículas de la fase estacionaria, lo cual implica una mayor resistencia al flujo de la fase móvil y por lo tanto la necesidad de emplear presión elevada para forzar el paso de líquido a través de la columna. Normalmente, se requieren presiones aproximadas de 70 a 400 Atmosferas para conseguir flujos de 0,5 a 5 ml/min. La columna y el equipo empleados deben estar contruidos de material resistente a estas presiones elevadas⁴.

Entre sus **aplicaciones**, al igual que la cromatografía gaseosa, la CLAR se emplea tanto con finalidad cualitativa (identidad y pureza), como con finalidad cuantitativa (valoración de principios activos, marcadores y posibles contaminantes). Las determinaciones cuantitativas, también en este caso, se basan en que la respuesta del detector y el área del correspondiente pico del cromatograma son proporcionales a la cantidad de sustancia. Puede ser necesario emplear factores de corrección y las determinaciones pueden efectuarse utilizando un patrón interno, un patrón externo o por normalización⁴.

El análisis de constituyentes de plantas medicinales generalmente se efectúa por HPLC, debido a que permite realizar los análisis cuantitativos de forma mucho más eficaz y segura¹³. Así, la Farmacopea Europea y Brasileña, para el análisis de Boldi folium y sus extractos, refiere el uso del HPLC en el análisis cuantitativo de alcaloides totales^{3,14}.

El perfeccionamiento de detectores específicos para determinadas clases de sustancias permite un análisis selectivo, incluso cuando se encuentran en mezclas complejas.¹³ Por esta razón, para analizar los productos fitoterapéuticos, sin poner en riesgo la eficacia de la columna cromatográfica será necesario realizar una purificación previa del uso de agentes clarificantes¹³.

Para el análisis de productos fitoterapéuticos, la selección del detector varía de acuerdo con las características de las estructuras que están siendo analizadas. El detector más usado es el que mide la absorción en la región UV-visible. La comparación de los espectros con los espectros que se encuentran en un banco de datos, suministra valiosas informaciones sobre la clase química de las sustancias presentes en el extracto¹³.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Medicamentos y Fitomedicamentos (CEDACMEF) “Javier Gómez Guerreiro”: Laboratorio de Control de Calidad, 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.

3.2 Definición de la población y muestra

La **población** corresponde a las hojas de la especie de *Peumus boldus* Molina “boldo”, procedente de la provincia de “Chanchamayo” del departamento de Junín. La **muestra** estuvo constituida por 3 Kg de planta fresca de *Peumus boldus* Mol. “boldo” recolectadas de la selva “Chanchamayo” del departamento de Junín. La especie fue **identificada** por la bióloga Laura Aucasime Medina (anexo 1).

3.3. Diseño metodológico

3.3.1 Tipo de estudio

El tipo de estudio fue aplicado¹⁵.

3.3.2 Diseño experimental

El diseño fue experimental de tipo pre experimento con únicamente pos prueba¹⁶.

$$G \times mg\%_{boldina}$$

Dónde: G es el grupo de hojas, x el solvente y $mg\%_{boldina}$ es la concentración de boldina.

3.4 Obtención del extracto acuoso

Se pesó 30 g de muestra seca y pulverizada, se agregó 80 mL solvente (agua, etanol 55° y etanol 65°) y se realizó la extracción con agitación constante. La extracción con agua se realizó a ebullición y la extracción con las mezclas hidroalcohólicas se realizó a 50°C^{3,9}. El extracto se enfrió y se filtró en un filtro

PTFE, para luego concentrarlo en un rotavapor a 40°C. El extracto concentrado se terminó de evaporar a sequedad en una estufa a 40° C por 24 horas¹³.

3.5 Estandarización del extracto

3.5.1 Preparación de las muestras para la identificación

Se pesó 0,5 g del extracto seco y se agregó 25 mL de ácido clorhídrico diluido R, se sonicó por 15 min y filtró. La muestra filtrada se transfirió a una pera de bromo, se desengrasó con 10 mL de una mezcla acetato de etilo R y hexano R (1:1). La fase acuosa se ajustó a pH 9,5 con amoniaco diluido R1 y se extrajo sucesivamente con 50 ml, 25 ml y 25 ml de cloruro de metileno R, hasta agotamiento.³ Se separó la fase inferior y se concentró en un rotavapor a 40°C y posteriormente se llevó hasta sequedad en un baño maría a 40°C.¹⁷ El extracto seco se redisolvió y diluyó hasta 10 mL con fase móvil y se inyectó (20 µL) en un HPLC-DAD³.

3.5.2 Instrumentación

Se utilizó un HPLC Dionex 3000 ultramate equipado con una bomba y detector UV con arreglo de diodos y automuestreador. Se usó una columna C18 de 250 mm x 4,60 mm, 5 µm (Phenomenex, USA) mantenido a 25°C.

3.5.3 Identificación de boldina por HPLC-DAD

La identificación de boldina en el extracto seco de *P. boldus* se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Para ello, la solución del extracto seco de *P. boldus* en fase móvil filtrada fue sometida a análisis pro HPLC-DAD usando un método isocrático y una fase móvil de solución A, solución B (16:84 v/v) a un flujo fue 1,5 mL/min (la solución A contiene 0,2 mL de dietilamina R con 99,8 mL de acetonitrilo y la solución B contiene 0,2 mL de dietilamina R con 99,8 mL de agua ajustado a pH 3 con ácido fórmico R). El volumen de inyección fue 20 µl. La boldina fue monitoreada a 304 nm y se registraron espectros UV de 200 a 600 nm para la caracterización de los picos. Se utilizó un estándar de referencia de boldina CRS (3 mg en 25 mL de fase móvil)³.

3.5.3 Valoración de boldina por HPLC-DAD

Se preparó soluciones estándar de boldina CRS de concentraciones de 60, 120, 180, 240 y 300 mg%. El contenido de boldina se analizó por HPCL-DAD, según el método descrito en la identificación de boldina y se determinó el área bajo la curva.

3.6 Análisis estadísticos

Las medias y desviación estándar del contenido de boldina corresponden a tres repeticiones. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) y el análisis de comparaciones múltiples de Duncan con un 95% de nivel de confianza¹⁸.

IV. RESULTADOS

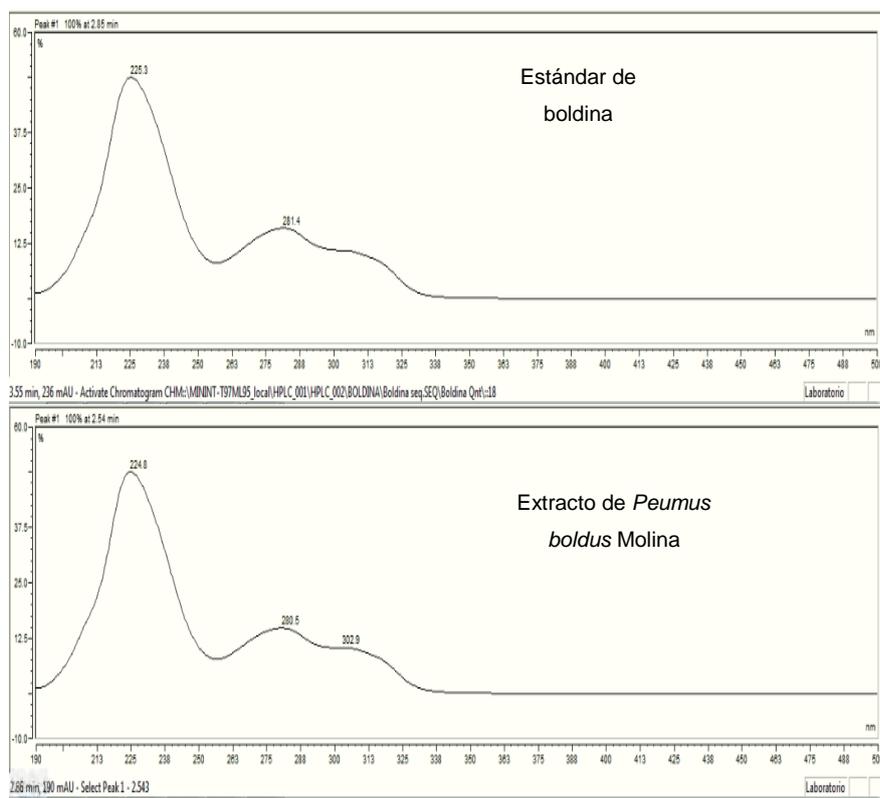


Figura 2. Espectro de absorción UV-VIS de la Boldina en el extracto seco de hojas de *P. boldus* M. Ayacucho 2020

Cromatograma por HPLC del extracto acuoso de las hojas de *peumus boldus*
Mol. "boldo"

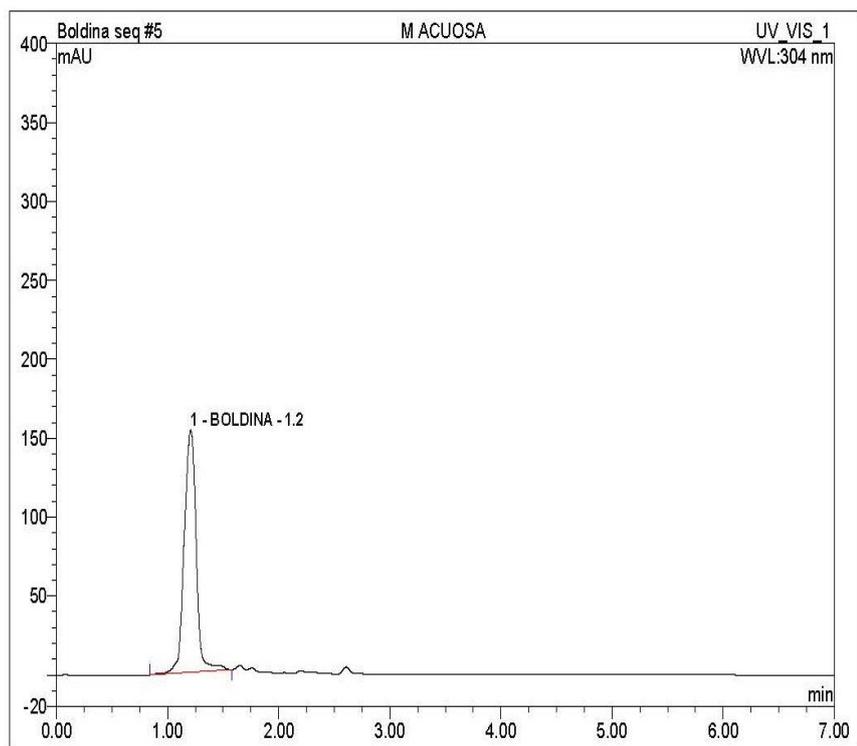


Figura 3. Identificación de Boldina en el extracto acuoso de hojas de *P. boldus* M.
Ayacucho 2020

Cromatograma por HPLC del extracto Hidroalcohólico al 55° de las hojas de *peumus boldus* mol. "boldo"

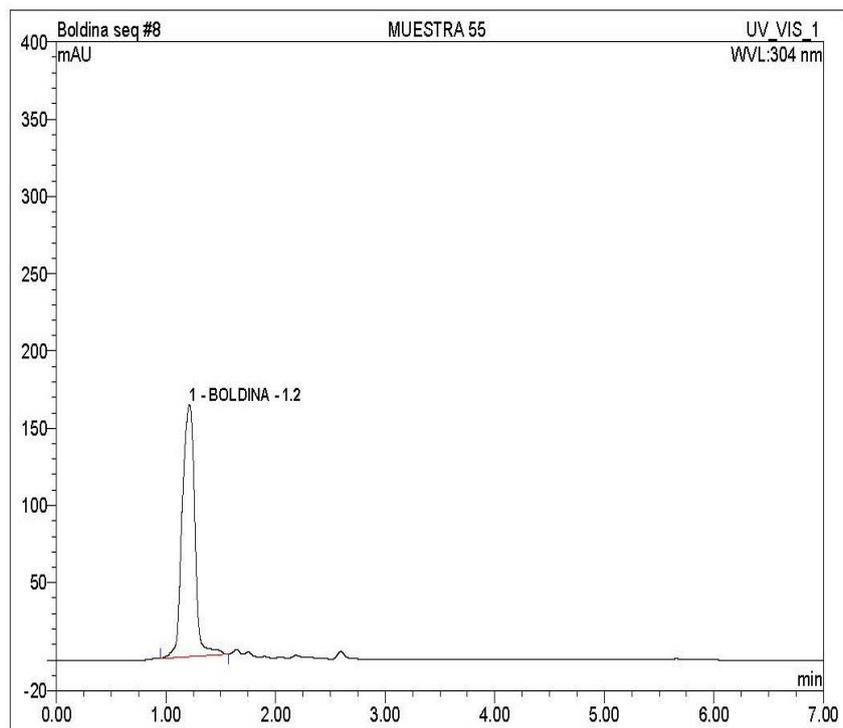


Figura 4. Identificación de Boldina en el extracto hidroalcohólico (Etanol 55°) de hojas de *P. boldus* M. Ayacucho 2020

Cromatograma por HPLC del extracto Hidroalcohólico al 65° de las hojas de *peumus boldus* mol. "boldo"

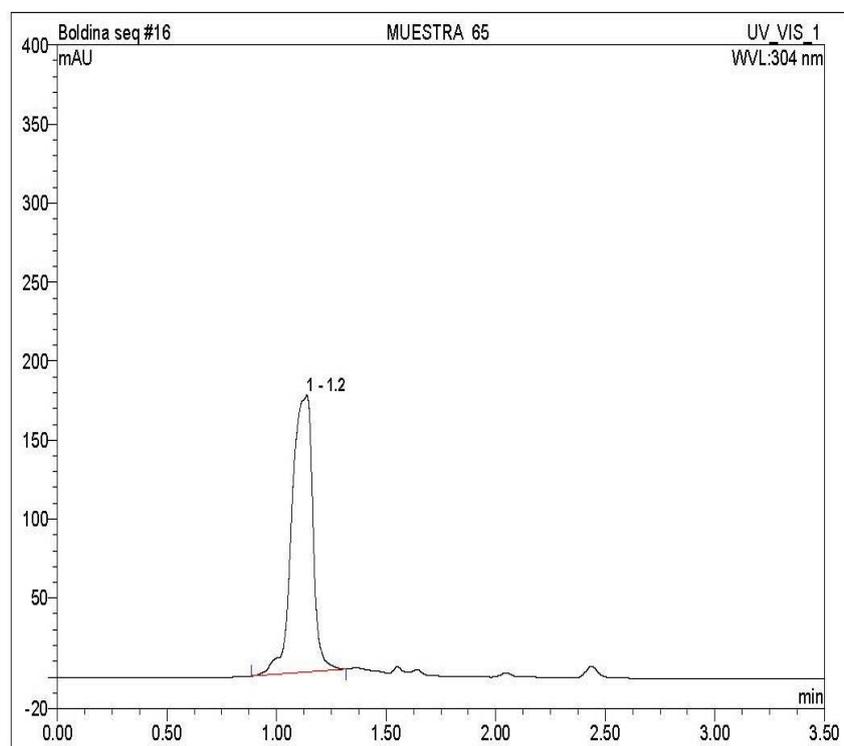


Figura 5. Identificación de Boldina en el extracto hidroalcohólico (Etanol 65°) de hojas de *P. boldus* M. Ayacucho 2020

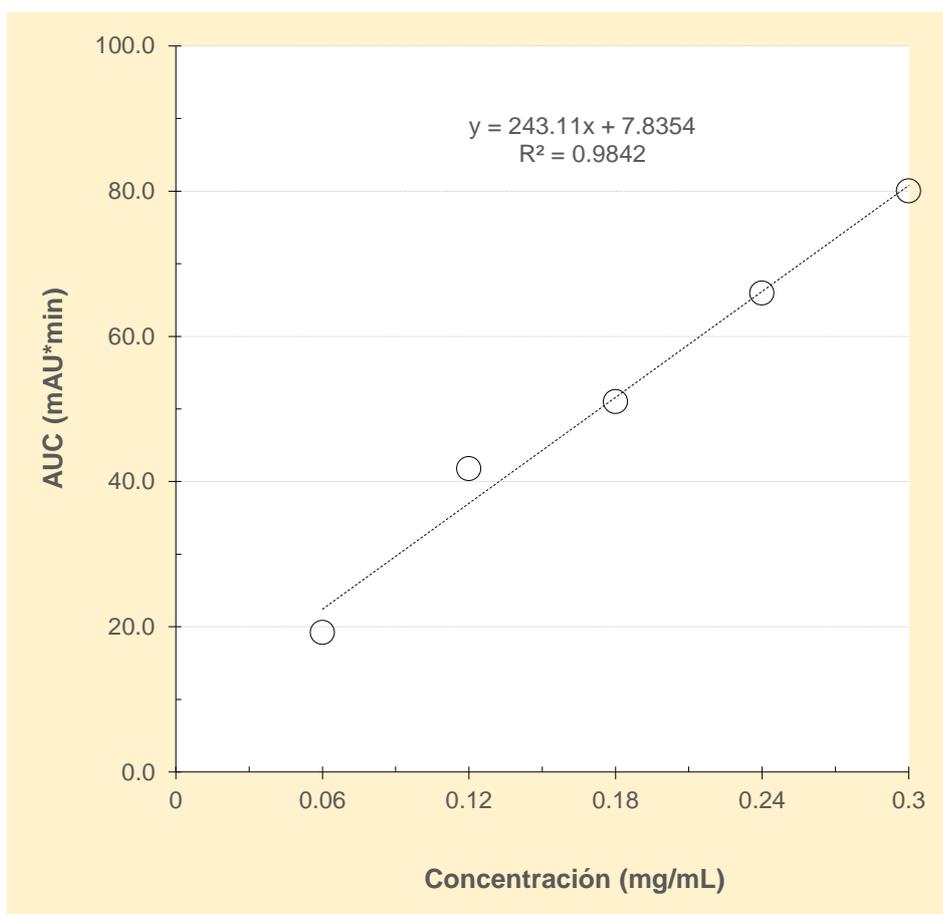


Figura 6. Curva de calibración de Boldina para la cuantificación en el extracto seco de hojas de *P. boldus* M. Ayacucho 2020

Tabla 1. Cuantificación de Boldina en extractos secos de hojas de *P. boldus* M. Ayacucho 2020

Solvente	AUC	Concentración (mg/mL)	g	%	\bar{x} (%)[†]
Agua	19,198	0,0104	0,000120	0,0200	0,019 ± 0,001 ^a
	19,126	0,0100	0,00011	0,0193	
	19,185	0,0103	0,00011	0,0198	
Etanol 55°	23,125	0,0338	0,00035	0,0675	0,054 ± 0,003 ^b
	21,741	0,0256	0,00027	0,0512	
	21,823	0,0260	0,00011	0,0520	
Etanol 65°	43,542	0,1556	0,00157	0,3092	0,295 ± 0,007 ^c
	41,784	0,1451	0,00011	0,2884	
	41,691	0,1446	0,00146	0,2874	

[†]Contenido de alcaloides expresados en boldina (%)

^{a,b,c} Comparaciones múltiples de Duncan al 95% de nivel de confianza

V. DISCUSIÓN

Las plantas medicinales y drogas vegetales se pueden usar para la obtención de principios activos purificados. También, se pueden usar directamente (infusiones o en polvo) o bien en forma de productos extractivos (extractos secos, tinturas, aceites esenciales, entre otros)⁴.

Los productos extractivos, dan lugar a la mayor parte de productos a base de plantas medicinales en fitoterapia. Por lo que deben aplicarse condiciones para ser incluidos en la categoría de medicamentos, es decir que cumplan con los requisitos de calidad, seguridad y eficacia⁴.

El uso del extracto de *P. boldus* está muy difundido en el campo de la fitoterapia. Se comercializa como extractos biológicos, liofilizados, estandarizados, extractos secos y fluidos, y en forma farmacéutica de comprimidos y cápsulas. Es por ello, que está incluido de obras oficiales como la Farmacopea Europea y la Farmacopea Brasileña⁴.

Por estas consideraciones el objetivo de la presente investigación fue obtener y estandarizar extractos secos de las hojas de *P. boldus*.

En primer lugar, se obtuvieron un extracto seco acuoso y dos extractos secos hidroalcohólicos a base de las hojas de *P. boldus*. Según la Farmacopea Europea, el extracto de *P. boldus* se obtiene a partir de las hojas, a través de un método adecuado, usando como solvente el agua o una mezcla hidroalcohólica³, es así, que los extractos hidroalcohólicos se obtuvieron con una mezcla hidroalcohólica de 55° y 65°. Al respecto, Palma et al⁹, al diseñar tabletas de extracto seco *P. boldus*, determinaron que los extractos secos hidroalcohólicos de hojas de boldo, obtenidas con mezclas hidroalcohólicas con una relación etanol:agua 70:30 y 60:40, reportaron los mayores niveles de boldina.

Asimismo, la Farmacopea Europea, refiere que el extracto de hojas de *P. boldus* M. "boldo" presenta el aspecto es de polvo higroscópico de color marrón o marrón verdoso³, que coincide con nuestros resultados, ya que los extractos acuosos e hidroalcohólicos obtenidos presentaron un color marrón y tenía características higroscópicas.

Al respecto, Vanaclocha et al⁴, refieren que los extractos secos son preparados de consistencia sólida obtenidas por eliminación total del disolvente empleado en la extracción, hasta obtener un polvo seco. Sin embargo, los extractos secos son ligeramente higroscópicos y normalmente tienen una pérdida por desecación que supera el 5% m/m.

Asimismo, en el proceso de obtención de extractos la relación droga-extracto (RDE), que se define como la relación entre la cantidad de droga vegetal y la de extracto obtenido con ella, se emplea con frecuencia para calcular la dosis que debe administrarse de un determinado extracto a partir de la dosis prescrita para la droga⁴, asimismo, la relación droga-disolvente (RDD), que es la relación entre la droga vegetal utilizada en la elaboración de un extracto y la cantidad del primer disolvente de extracción, son aspectos muy importantes en su estandarización⁴.

Respecto a la estandarización de extractos, existen los extractos normalizados, los extractos cuantificados. En el caso de los extractos acuosos e hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *P. boldus*, son extractos normalizados, ya que su contenido fue establecido en función al contenido de boldina, alcaloide mayoritario en hojas de *P. boldus*.

En la Figura 1, se presenta el espectro de absorción UV-Vis por HPLC-DAD, del extracto seco de *P. boldus*, en la cual se observa picos de máxima absorción a longitudes de onda de 225 nm y 281 nm, que coincide con el espectro de absorción del estándar de boldina. Al respecto, en el análisis de las drogas vegetales la identificación de uno más componentes activos relacionados con la actividad terapéutica de la droga vegetal es crucial, ya que de esta depende un adecuado control de calidad.

Sin bien es cierto, La Farmacopea Europea y la Farmacopea Brasileña^{3,14}, para la identificación de boldina en extractos secos, establece un procedimiento por el método de cromatografía en capa fina (CCF), en la presente investigación, se realizó por HPLC-DAD, debido a disponibilidad de algunos reactivos.

Además, en la actualidad, la mayoría de análisis de constituyentes de plantas se realizan por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), ya que es un método que permite realizar las separaciones que se llevan a cabo por CCF y además los análisis cuantitativos se pueden realizar de manera más eficaz y segura¹³.

La cromatografía líquida de alta eficiencia con detector con arreglo de diodos, o fila de fotodiodos, se usa para registrar el espectro completo de UV de cada pico a medida que se eluye y de este modo es posible determinar qué compuestos

corresponde a cada pico¹⁹, por lo que, la identificación de boldina que se realizó por HPLC-DAD es inequívoca.

Es así, que en las Figuras 2, 3 y 4 se presentan los cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD de los extractos de *P. boldus*. Se puede apreciar los picos característicos de la boldina, presentando un tiempo de retención de 1,2 minutos, tanto para los extractos acuosos e hidroalcohólicos como para el estándar de boldina. Cabe mencionar, que el tiempo de retención, es el tiempo que tarda un soluto, desde la inyección, en ser eluido de una columna cromatográfica, y que es característico de una sustancia química, que a su vez permite su identificación¹⁹. Si bien es cierto, la Farmacopea Europea³, establece para la boldina un tiempo de retención alrededor de 6 minutos, eso para compuestos como isoboldina con un tiempo de retención de 0,9 min; isocoridina N-óxido (1,8 min), laurotetanina (2,2 min), isocoridina (2,8 min), N-metil-laurotetanina (3,2 min), e inclusive refiere que adicionalmente pudiera presentar otros picos. Para nuestro caso, el pico tuvo un tiempo de retención de 1,2 con una respuesta de área bajo la curva (AUC) significativa y pico definido sin asimetrías, por lo que se procedió a realizar la identificación y cuantificación teniendo de referencia a ese tiempo de retención.

En la Figura 5, se presenta la curva de calibración de la boldina para la cuantificación de en los extractos secos de las hojas de *P. boldus*. La curva de calibración presenta una ecuación lineal de $y = 243x + 7,83$. De la ecuación, podemos observar que el valor de la intersección en el eje de la ordenadas es de 7,83 que representa un valor cercano al origen; asimismo, el coeficiente de determinación fue de 0,9842, cuyo valor es muy cercano a la unidad, lo que significa que la relación AUC versus concentración tiene una tendencia lineal muy definida. Dichos resultados, nos permite reportar las concentraciones de boldina en los extractos secos con precisión¹⁸.

En la Tabla 1, se presenta los resultados de la cuantificación de boldina (%) en los extractos secos de las hojas de *P. boldus*, tanto en el extracto acuoso como en los extractos hidroalcohólicos. Se observa que el extracto hidroalcohólico, obtenido con una mezcla hidroalcohólica de 65°, presentó un contenido alcaloides de $0,295 \pm 0,007\%$, estadísticamente superior ($p < 0,05$) al extracto hidroalcohólico de 55° y el extracto acuoso que presentaron contenidos de alcaloides expresados en boldina de $0,054 \pm 0,003\%$ y $0,019 \pm 0,001\%$, respectivamente.

Al respecto, la Farmacopea Europea, refiere los extractos secos obtenidos a partir de *P. boldus* M. "boldo" presentan un contenido de alcaloides totales expresados

como boldina ($C_{19}H_{21}NO_4$) de mínimo 0,5% en un extracto acuoso seco y 1,0% en extractos hidroalcohólicos³, según el cual, el contenido obtenido en la presente investigación es menor, lo que se puede deber a la procedencia de la muestra, condicionada por diferentes factores edáficos y climatológicos¹³.

Asimismo, Palma et al⁹, determinaron que los extractos secos hidroalcohólicos de hojas de *P. boldus*, obtenidos con mezclas hidroalcohólicas con una relación etanol:agua 70:30 y 60:40, reportaron los mayores niveles de boldina, con valores de 99 mg/100 mL y 90 mg/100 mL, lo que podría utilizarse estos extractos estandarizados a nivel de las farmacias de formulación y además permitirá una correcta dosificación y administración.

VI. CONCLUSIÓN

1. Se obtuvo y se estandarizó el extracto de las hojas de *Peumus boldus* Mol. "boldo".
2. Los extractos secos acuosos e hidroalcohólicos de *Peumus boldus* Mol. "boldo" presentaron picos de máxima absorción a longitudes de onda de 225 nm y 281 nm y un tiempo de retención de 1,2 minutos. Los extractos presentaron un color marrón y un aspecto higroscópico.
3. El extracto hidroalcohólico de *Peumus boldus* Mol. "boldo", obtenido con una mezcla hidroalcohólica de 65°, presentó un mayor contenido alcaloides de $0,295 \pm 0,007\%$, estadísticamente superior ($p < 0,05$) al extracto hidroalcohólico de 55° y el extracto acuoso que se presentaron contenidos de alcaloides expresados en boldina de $0,054 \pm 0,003\%$ y $0,019 \pm 0,001\%$, respectivamente.

VII. RECOMENDACIONES

1. Seguir realizando estudios de plantas medicinales ya que en nuestro Perú y nuestra región Ayacucho hay multitud de plantas medicinales que no se han estudiado aún.
2. Antes de empezar a utilizar el equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) que se encuentra en el laboratorio de control de calidad de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, se tiene que capacitar y haber manejado el equipo, para posteriormente no tener dificultades.
3. Se debe verificar las condiciones analíticas de los equipos que se van a usar en todo el procedimiento, con la finalidad de evitar errores en los resultados.

VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. Mostacero J, Castillo F, Mejía F, Gamarra O, Charcape MJ, Ramírez R. Plantas Medicinales del Perú: Taxonomía, Ecogeografía, Fenología y Etnobotánica. Trujillo: Fondo Editorial Asamblea Nacional de Rectores; 2011. 909 p.
2. Fuentes-Barros G, Castro-Saavedra S, Liberona L, Acevedo-Fuentes W, Tirapegui C, Mattar C, et al. Variation of the alkaloid content of *Peumus boldus* (boldo). *Fitoterapia*. 2018;127:179-85.
3. Council of Europe. European Pharmacopoeia. 8a ed. Vol. 2. Strasbourg; 2013. 3655 p.
4. Vanaclocha B, Cañigueral S. *Fitoterapia. Vademécum de prescripción*. 5a ed. Barcelona: ELSEVIER; 2019. 800 p.
5. Soto C, Caballero E, Pérez E, Zúñiga ME. Effect of extraction conditions on total phenolic content and antioxidant capacity of pretreated wild *Peumus boldus* leaves from Chile. *Food Bioprod Process*. 2014;92(3):328-33.
6. Klimaczewski CV, Saraiva R de A, Roos DH, Boligon A, Athayde ML, Kamdem JP, et al. Antioxidant activity of *Peumus boldus* extract and alkaloid boldine against damage induced by Fe(II)-citrate in rat liver mitochondria in vitro. *Ind Crops Prod*. 2014;54:240-7.
7. Vogel H, González B, Razmilic I. Boldo (*Peumus boldus*) cultivated under different light conditions, soil humidity and plantation density. *Ind Crops Prod*. 2011;34(2):1310-2.
8. Simirgiotis MJ, Schmeda-Hirschmann G. Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2010;1217(4):443-9.
9. Palma S, Luján C, Llabot JM, Barboza G, Manzo RH, Allemandi DA. Design of *Peumus boldus* tablets by direct compression using a novel dry plant extract. *Int J Pharm*. 2002;233(1-2):191-8.
10. Falé PL, Amaral F, Amorim Madeira PJ, Sousa Silva M, Florêncio MH, Frazão FN, et al. Acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity and toxicity of *Peumus boldus* water extracts on HeLa and Caco-2 cell lines. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(8):2656-62.
11. Betts TJ. Chromatographic evaluation of boldine and associated alkaloids in Boldo. *J Chromatogr A*. 1990;511:373-8.
12. Bakiri A, Hubert J, Reynaud R, Lanthony S, Harakat D, Renault J-H, et al. Computer-Aided ¹³C NMR Chemical Profiling of Crude Natural Extracts without Fractionation. *J Nat Prod*. 2017;80(5):1387-96.
13. Sharapin N. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia: Convenio Andrés Bello; 2000. 247 p.

14. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Farmacopea Brasileña. 5a. ed. Vol. 1. Brasilia; 2010. 546 p.
15. Pineda E, de Alvarado EL. Metodología de la investigación. 3ra ed. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 2008. 260 p.
16. Hernández R, Fernández C, Baptista M del P. Metodología de la investigación. 5a. ed. México: Mc Graw-Hill; 2010. 613 p.
17. Miranda M. Métodos de análisis de drogas y extractos. 5a ed. Cuba: México; 2010. 613 p.
18. Wayne D. Bioestadística: Bases para el análisis de las ciencias de la salud. 4a ed. México: Limusa; 2010. 298 p.
19. Harris D. Análisis químico cuantitativo. 3a ed. España: Editorial Reverté, S.A.; 2016. 942 p.
20. Yovera M. efecto protector del extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* "Boldo" en la toxicidad hepática inducida por isoniazida en ratas Holtzman hembra [tesis para optar el título profesional de médico cirujana]. Lima-Perú. 2015.
21. Palomino A. Constituyentes volátiles del aceite esencial de *Peumus boldus* (Boldo) del Perú. Rev. Per. Quim. Ing. Quim. 2007; 10(2):18-21.
22. Guillen F. Efecto hepatoprotector de *Peumus boldus* "boldo" en la hepatotoxicidad inducida por paracetamol en *Rattus rattus Var Albinus*. [Tesis para la titulación]. Trujillo-Perú. 2016.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Certificado de identificación de *Peumus boldus* Mol. Ayacucho-2020.

C O N S T A N C I A

LA BIOLOGA LAURA AUCASIME MEDINA ESPECIALISTA EN TAXONOMÍA Y SISTEMÁTICA DE PLANTAS DEJA CONSTANCIA:

Que, el Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fito medicamentos "Marco A. Garrido Malo", ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de Investigación

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988, siendo su taxonomía el siguiente:

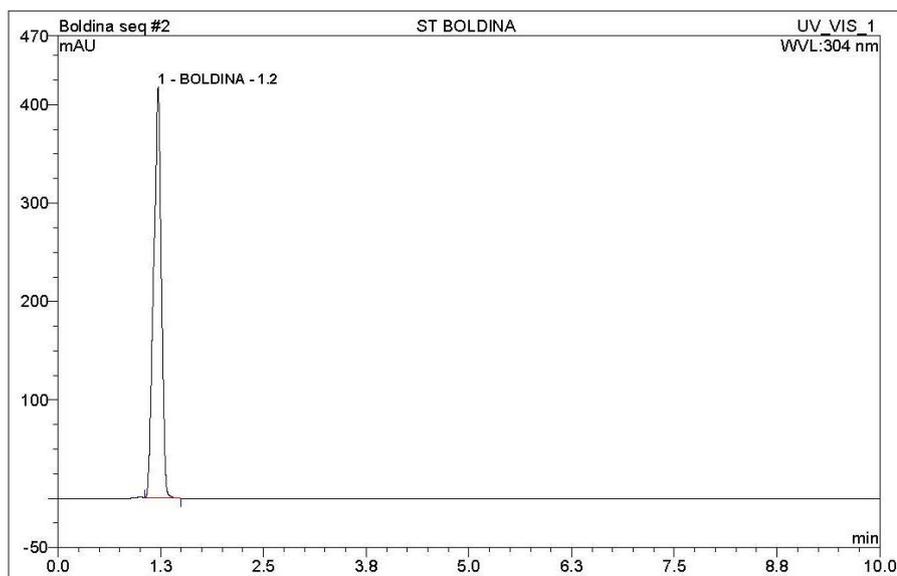
DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	MAGNOLIIDAE
ORDEN	:	LAURALES
FAMILIA	:	MONIMIACEAE
GENERO	:	Peumus
ESPECIE	:	<i>Peumus boldus</i> Mol.
N.V.	:	"boldo"

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

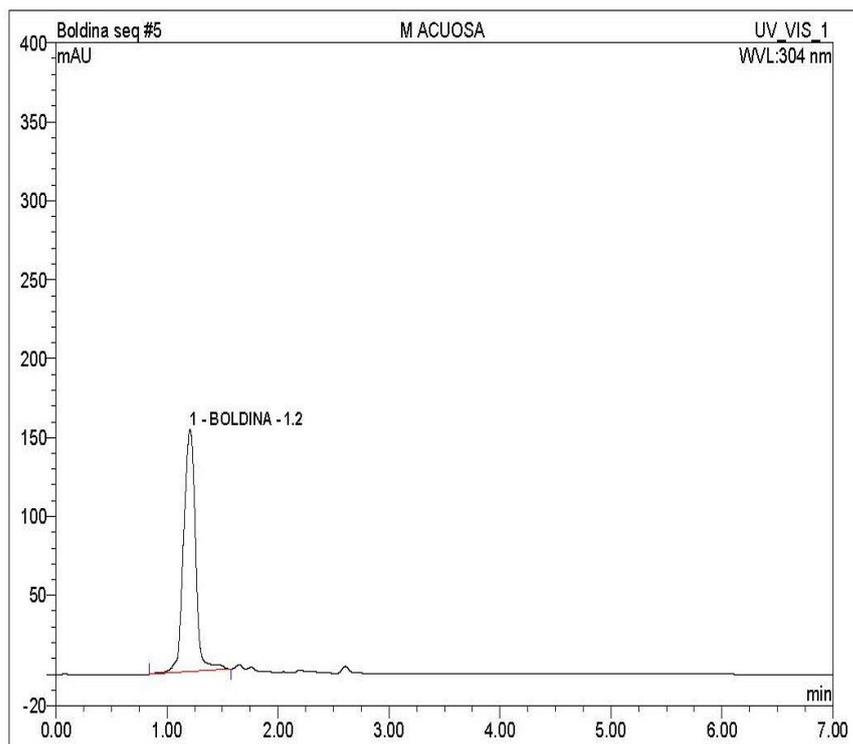
Ayacucho, 3 de Setiembre del 2 019.


LAURA AUCASIME MEDINA
BIOLOGA
Reg. C.B.P. N° 583 C.R. - XIII

Anexo 2. Cromatograma del estándar primario de boldina, según la farmacopea europea, en el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Donde muestra el tiempo de retención a 1.220 min y área del pico 45,238. Ayacucho-2020.



Anexo 3. Cromatograma de la boldina, obtenidos del extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* Mol. Según la farmacopea europea. En el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Donde muestra el tiempo de retención a 1.200min y área del pico 22,026. Ayacucho-2020.



Anexo 4. Datos descriptivos del contenido de Boldina en los extractos de hojas de *Pneumus boldus* Mol. “boldo”, Ayacucho 2020.

Extractos	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Extracto acuoso	3	0,0197	0,00036	0,00021	0,0188	0,0206	0,02	0,02
Extracto EtOH 55°	3	0,0536	0,00343	0,00198	0,0450	0,0621	0,05	0,06
Extracto EtOH 65°	3	0,2950	0,01231	0,00711	0,2644	0,3256	0,29	0,31
Total	9	0,1228	0,13017	0,04339	0,0227	0,2228	0,02	0,31

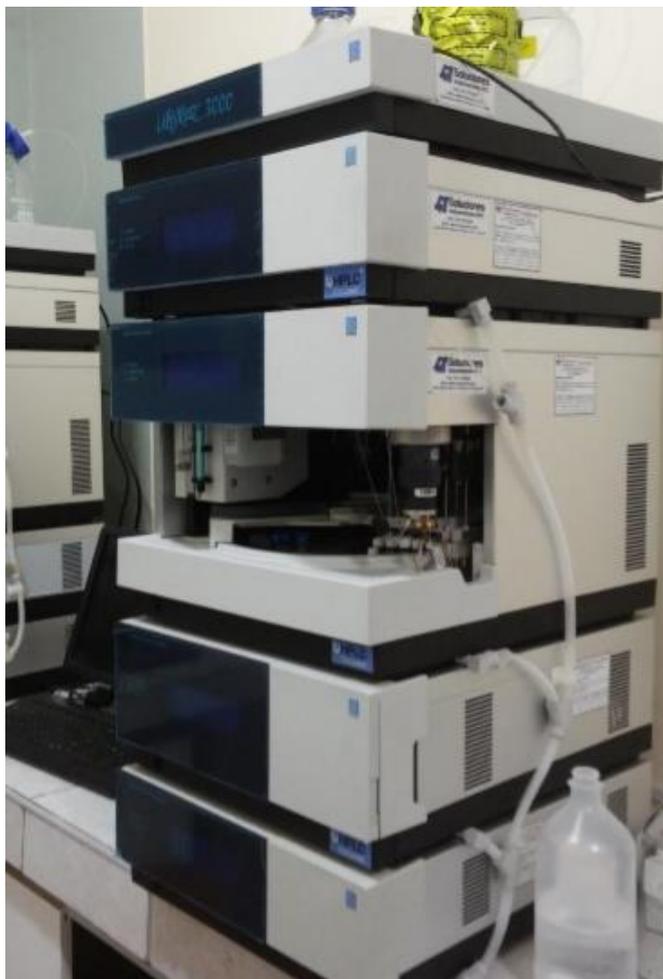
Anexo 5. Análisis de varianza del contenido de Boldina en los extractos de hojas de *Pneumus boldus* Mol. “boldo”, Ayacucho 2020.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p-valor
Entre grupos	0,135	2	0,068	1241.58	1.4x10 ⁻⁸
Dentro de grupos	0.000	6	0,000		
Total	0.136	8			

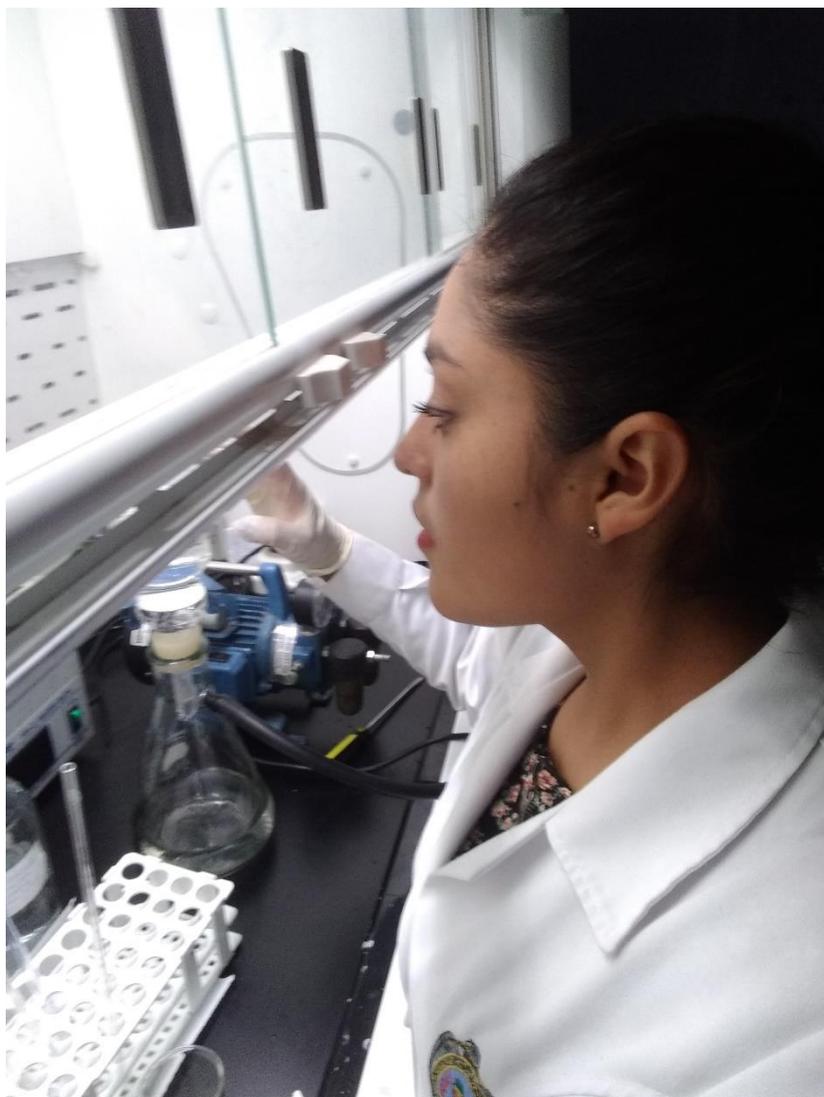
Anexo 6. Análisis de comparaciones múltiple de Tukey del contenido de Boldina en los extractos de hojas de *Pneumus boldus* Mol. “boldo”, Ayacucho 2020.

Extractos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		a	b	c
Extracto acuoso	3	0,0197		
Extracto EtOH 55°	3		0,0536	
Extracto EtOH 65°	3			0,2950
Sig.		1,000	1,000	1,000

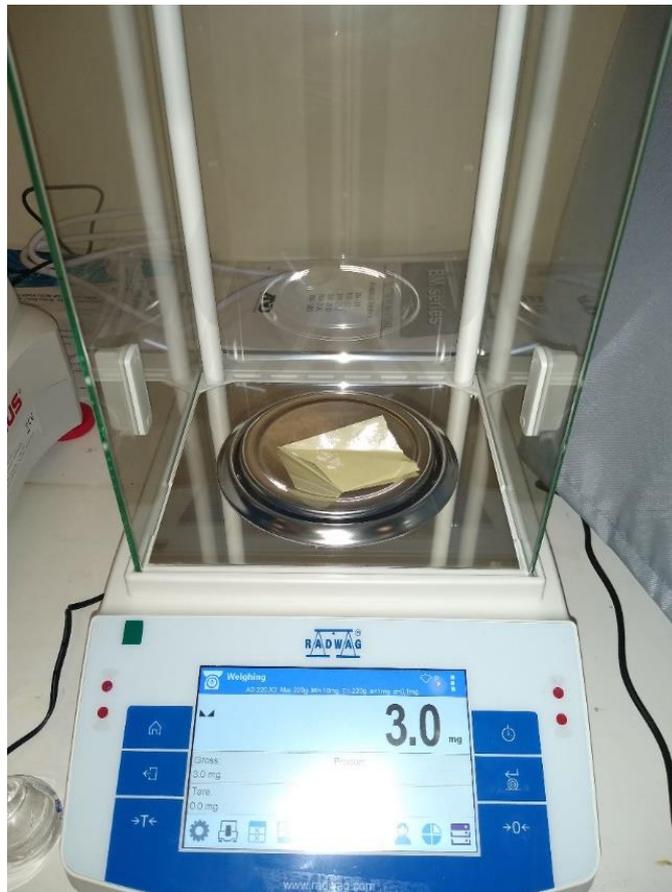
Anexo 7. Equipo Cromatógrafo líquido de Alta Resolución marca UltiMate 3000 del Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Ayacucho – 2020



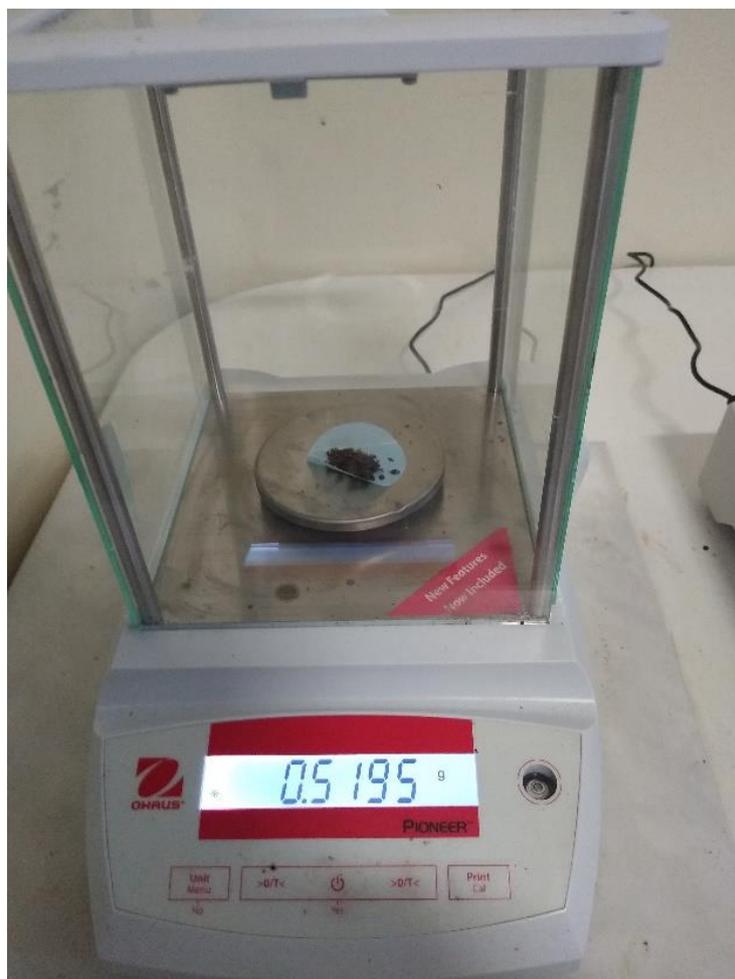
Anexo 8. Procedimiento de filtrar el agua y la fase móvil para utilizar en el equipo Cromatógrafo líquido de Alta Resolución marca UltiMate 3000. En el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Ayacucho – 2020



Anexo 9. Procedimiento de pesado del estándar de boldina y la muestra, extracto de las hojas de *Peumus boldus* Mol. En el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Ayacucho-2020.



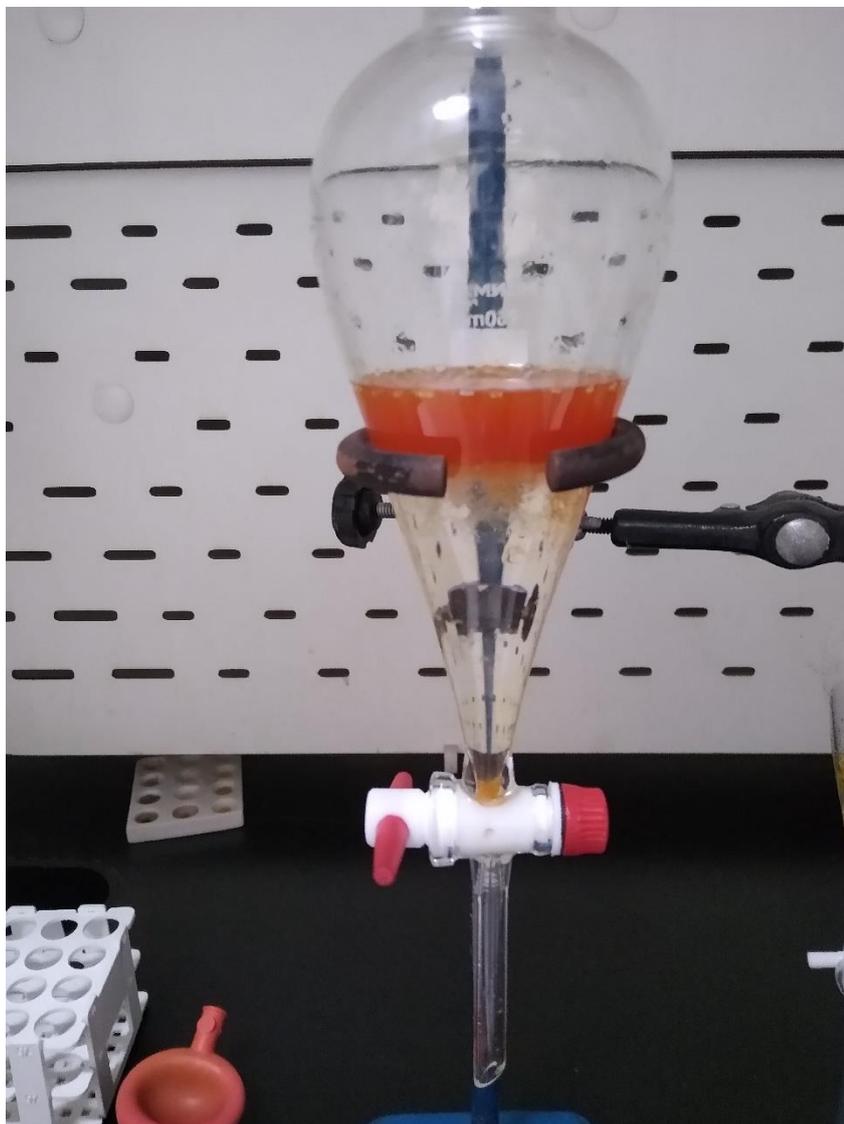
Anexo 10. Procedimiento de pesado de la muestra del extracto de las hojas de *Peumus boldus* Mol. En el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Ayacucho-2020.



Anexo 11. El uso de rotavapor. En el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Ayacucho-2020.



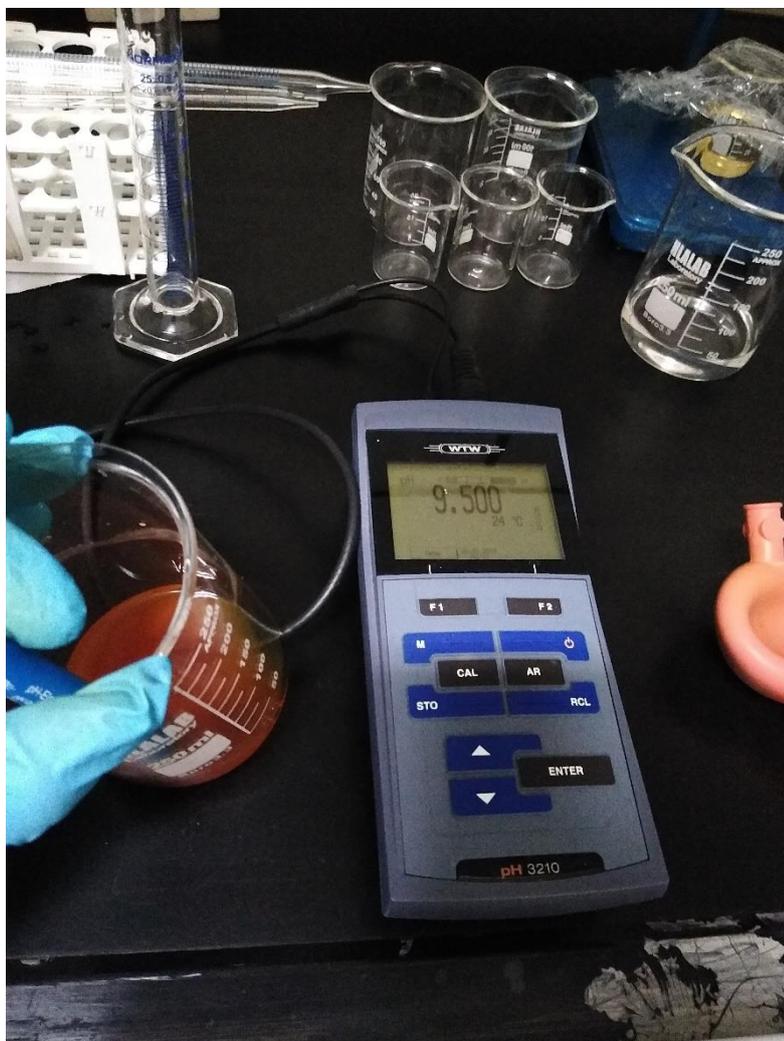
Anexo 12. Procedimiento de extracción del alcaloide “boldina” con el cloruro de metileno R En el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Ayacucho-2020.



Anexo 13. Procedimiento de concentración de la muestra. En el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Ayacucho-2020.



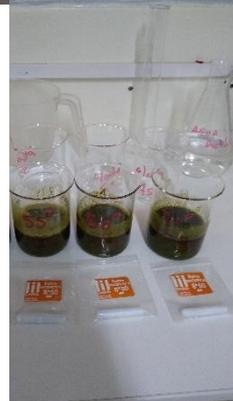
Anexo 14. Procedimiento donde se está llevando a un pH de 9.5 tal cual dice en la farmacopea europea. En el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Ayacucho-2020.



Anexo 15. La estufa. En el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Ayacucho-2020.



Anexo 16. Procedimiento de obtención del extracto acuoso e hidroalcohólico. En el Centro de Desarrollo y Control de Calidad de Medicamentos y Fito-medicamentos, Facultad de Ciencias de la Salud de la E.P. Farmacia y Bioquímica. Ayacucho-2020.



Anexo 17. Matriz de consistencia

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	VARIABLES	MARCO TEÓRICO	METODOLOGÍA
Obtención y estandarización del extracto de las hojas de <i>Peumus boldus</i> Mol "boldo". Ayacucho 2020	¿Se podrá obtener el extracto de las hojas de <i>Peumus boldus</i> Mol. "boldo" en Ayacucho 2020? ¿se podrá estandarizar el extracto de las hojas de <i>Peumus boldus</i> Mol. "boldo" en Ayacucho 2020?	<p>OBJETIVO GENERAL</p> <ul style="list-style-type: none"> Obtener y estandarizar el extracto de las hojas de <i>Peumus boldus</i> Mol. "boldo". <p>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> Obtener extractos secos a partir de las hojas de <i>Peumus boldus</i> M. Estandarizar los extractos secos de las hojas de <i>Peumus boldus</i> M. según el contenido de alcaloides totales calculados como boldina. 	<p>a. Contenido de alcaloides en las hojas</p> <p>• Indicadores: Alcaloides (%)</p> <p>b. Identificación de la boldina por HPLC-DAD.</p> <p>c. Contenido de alcaloide boldina en el extracto.</p> <p>• Indicadores: Alcaloides (%)</p>	<p>Antecedentes <i>Peumus boldus</i> Molina</p> <ul style="list-style-type: none"> Clasificación taxonómica de <i>Peumus boldus</i> "boldo" Descripción morfológica Composición química Aspectos fitoterapéuticos de P. boldus <p>Estandarización de extractos vegetales</p> <p>Análisis de drogas vegetales por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)</p>	<p>Tipo de investigación</p> <p>Tipo de estudio aplicado</p> <p>Diseño experimental</p> <p>Pre experimento con únicamente pos prueba.</p> <p>La población corresponde a las hojas de la especie de <i>Peumus boldus</i> Molina "boldo", procedente de la provincia de "Chanchamayo" del departamento de Junín.</p> <p>La muestra estuvo constituida por 3 Kg de planta fresca de <i>Peumus boldus</i> Mol. "boldo" recolectadas de la selva "Chanchamayo" del departamento de Junín.</p> <p>La especie fue identificada por la bióloga Laura Aucasime Medina.</p> <p>Análisis de datos</p> <p>Los datos se presentarán mediante fotos y gráficos. Los resultados de los análisis fisicoquímicos como: identificación por HPLC, concentración de alcaloides "boldina" por HPLC, prueba de aceites esenciales, materia extraña, cenizas sulfatadas, se expresará haciendo comparación con un estándar primario de "boldina" y usando los equipos del laboratorio de control de calidad de la E.P. Farmacia Bioquímica- UNSCH. En la determinación de los parámetros botánicos de la planta <i>Peumus boldus</i> Mol se usará el microscopio. Para los resultados Se usará el programa de Word y Excel.</p>



UNSCH

**FACULTAD DE
CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA PROFESIONAL DE
FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**DOCENTES INSTRUCTORES
DEL SOFTWARE ANTIPLAGIO**



CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD EN PRIMERA INSTANCIA DE TRABAJO DE TESIS

El suscrito docente – instructor responsable de operativizar, verificar, garantizar y controlar la originalidad de los trabajos de tesis de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica designado por Resolución Decanal N° 068 – 2021 – UNSCH – FCSA/D de fecha 30 de abril de 2021, deja constancia que el trabajo de tesis titulado:

Obtención y estandarización del extracto de las hojas de *Poemus boldus* Mol “boldo”. Ayacucho 2020.

Autor: Bach. PRADO MORENO, Ani Yesenia

Asesor: Profesor ARONÉS JARA, Marco Rolando

Ha sido sometido al análisis del sistema antiplagio TURNITIN concluyendo que presenta un porcentaje de 23% de Índice de Similitud.

Por lo que, de acuerdo con el porcentaje establecido en el Artículo 13 del Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga es procedente conceder **la Constancia de Originalidad en Primera Instancia.**

Ayacucho, 03 de setiembre de 2021



Firmado digitalmente por:
AGUILAR FELICES ENRIQUE
JAMER
Motivo: Soy el autor del
documento
Fecha: 03/09/2021 17:43:22-0500

Mg. Enrique Javier AGUILAR FELICES
Docente – Instructor



CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

El que suscribe docente instructor responsable de verificar y controlar la originalidad de los trabajos de tesis en segunda instancia de la Facultad de Ciencias de la Salud, deja constancia que el trabajo de tesis titulado:

Obtención y estandarización del extracto de las hojas de *Peumus boldus* Mol "boldo". Ayacucho 2020

Autor: PRADO MORENO Ani Yesenia

Asesor(a) : Dr. ARONÉS JARA Marco Rolando

Ha sido verificado y sometido al análisis CON DEPOSITO mediante el sistema TURNITIN concluyendo que presenta un porcentaje de **22 % de similitud**.

Por lo que, de acuerdo con el porcentaje establecido en el Artículo 17 del Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga es procedente conceder la Constancia de Originalidad con Deposito.

Ayacucho, 10 de setiembre de 2021.

Firmado
digitalmente por
Dr. Emilio G.
Ramírez Roca
Fecha: 2021.09.10
17:25:37 -05'00'

Dr. Emilio Ramírez Roca
RESPONSABLE

Obtención y estandarización del extracto de las hojas de Peumus boldus Mol “boldo”. Ayacucho 2020

por Ani Yesenia Prado Moreno

Fecha de entrega: 10-sep-2021 05:14p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 1645619070

Nombre del archivo: BORRADORA_TESIS._PRADO_MORENO.pdf (2.09M)

Total de palabras: 8736

Total de caracteres: 45540

Obtención y estandarización del extracto de las hojas de *Peumus boldus* Mol "boldo". Ayacucho 2020

INFORME DE ORIGINALIDAD

22%

INDICE DE SIMILITUD

22%

FUENTES DE INTERNET

7%

PUBLICACIONES

6%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	4%
2	naturistaalfonso.com Fuente de Internet	2%
3	alicia.concytec.gob.pe Fuente de Internet	2%
4	www.medicina.usmp.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
7	doku.pub Fuente de Internet	1%
8	www.fitoterapia.net Fuente de Internet	1%

9	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	1 %
10	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	1 %
11	1library.co Fuente de Internet	1 %
12	www.mdpi.com Fuente de Internet	1 %
13	www.eurekaselect.com Fuente de Internet	1 %
14	digi.usac.edu.gt Fuente de Internet	1 %
15	Leanne Silva de Sousa, Carla Verônica Rodarte de Moura, Edmilson Miranda de Moura. "Influence of binary, ternary and quaternary mixtures on oxidative stability and study of kinetics and thermodynamic parameters of the degradation process of soybean biodiesel", Fuel, 2020 Publicación	<1 %
16	vsip.info Fuente de Internet	<1 %
17	www.alanrevista.org Fuente de Internet	<1 %

18 Antoine Bruguière, Séverine Derbré, Joël Dietsch, Jules Leguy et al. "MixONat, a software for the dereplication of mixtures based on ¹³C NMR spectroscopy", *Analytical Chemistry*, 2020
Publicación <1 %

19 dspace.unitru.edu.pe
Fuente de Internet <1 %

20 archive.org
Fuente de Internet <1 %

21 search.ndltd.org
Fuente de Internet <1 %

22 bibliotecafarmaceutica.com
Fuente de Internet <1 %

23 www.labome.org
Fuente de Internet <1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo