



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Aporte a la estandarización de un extracto de cálices de *Physalis peruviana*

María Isabel Cardona Paredes

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá D.C, Colombia

2014

Aporte a la estandarización de un extracto de cálices de *Physalis* *peruviana*

María Isabel Cardona Paredes, Q.F

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Farmacéuticas

Directora:
Ph.D., Diana Marcela Aragón Novoa

Grupo de Investigación:
Tecnología de productos naturales (TECPRONA)

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Área curricular de Farmacia
Bogotá D.C, Colombia
2014

“La gota de agua logra perforar la roca no por su fuerza sino por su perseverancia”

Ovidio

Agradecimientos

Mi mayor gratitud está dirigida a Dios todo poderoso por darme tantas oportunidades de crecer y aprender.

A mis padres por todo su apoyo, por su maravilloso ejemplo, por su amor

A mi hermano por sus consejos y su compañía en todo momento

A la profesora Marcela Aragón por todo su apoyo, por estar ahí en las buenas y en las malas, por sus enseñanzas, por su disposición estoy muy agradecida.

A Johan por su valiosa ayuda, por estar conmigo cuando más lo he necesitado por su cariño, por acompañarme, por compartir tantos momentos.

A la Universidad Nacional de Colombia por permitirme aprender y llevar a cabo éste proyecto.

A mis compañeros del grupo de investigación Reina Toro por su gran ayuda y valiosa información, Milena Baena, Paola Cárdenas, Iván Medina todos tuvieron mucha disposición para colaborarme cuando más lo necesité.

Al profesor Luis Fernando Ospina por su colaboración y valiosas enseñanzas

A Yenny mi prima y amiga por compartir tantos momentos de risas, por su valioso conocimiento en el momento más indicado y por acompañarme en este camino.

A Clau por compartir juntas tantos momentos y por su valiosa amistad.

A Laura Carlos por compartir juntas este sueño y apoyarnos en el camino

A Geison Costa por su valiosa información y por toda su colaboración.

A todas las personas que conocí en este camino y que sin saberlo han puesto un granito de arena para culminarlo.

Resumen

Physalis peruviana es una planta utilizada en la medicina tradicional por sus propiedades antioxidantes las cuales se le atribuyen a los compuestos fenólicos que se encuentran en la misma. En el presente trabajo se evaluó el efecto de algunas variables del proceso de extracción de cálices de *P. peruviana* sobre el contenido de fenoles totales, contenido de rutina y actividad antioxidante *in vitro* del extracto obtenido, así como la influencia de las condiciones de almacenamiento y factores de estrés sobre dichas variables respuesta.

El primer paso fue la evaluación de la influencia de determinados factores del proceso de extracción sobre las variables respuesta mencionadas, en éste primer paso es de suma importancia realizar una estandarización del proceso de extracción que permita tener uniformidad en los resultados, para lo cual el material vegetal recolectado en tres regiones de Colombia fue sometido a extracción por percolación con variación en determinados factores de extracción. Posteriormente se llevó a cabo la evaluación de las variables respuesta por medio de ensayos *in vitro* como la captación de óxido nítrico y DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) en el caso de la actividad antioxidante, metodología Folin-Ciocalteu para el contenido de fenoles totales y la cuantificación de rutina se utilizó cromatografía líquida de alta eficiencia CLAE. Posteriormente se realizaron estudios de condiciones de almacenamiento para lo cual los extractos fueron almacenados bajo condiciones ambientales $14 \pm 8^{\circ}\text{C}$, 72 % HR y en cámara de almacenamiento $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65 \pm 5\%$ HR por un periodo de cuatro semanas en ambas condiciones. Finalmente se llevaron a cabo los ensayos de estrés donde las muestras fueron sometidas a hidrólisis ácida y alcalina así como también a oxidación.

Cómo resultado se logró determinar que las condiciones óptimas para obtener los mejores resultados en las variables respuesta evaluadas fueron solvente de extracción (etanol al 70%) y tiempo de percolación de 72 horas; la región de origen del material vegetal también fue un factor importante para obtener los mejores resultados. Una vez establecidas las

mejores condiciones se comprobó que el proceso de extracción fuera reproducible elaborando tres lotes y caracterizando las variables respuestas evaluadas.

En cuanto a los estudios de condiciones de almacenamiento se logró determinar que la actividad antioxidante, contenido de rutina y los fenoles totales no tuvieron variaciones significativas bajo la condiciones de almacenamiento ambientales $14 \pm 8^{\circ}\text{C}$, 72 % HR mientras que en cámara de almacenamiento en condiciones controladas $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65 \pm 5\%$ HR sí se presentaron variaciones significativas en el contenido de rutina. En los ensayos de estrés, los resultados mostraron una importante disminución en las variables respuesta evaluadas principalmente con la hidrólisis alcalina.

Palabras clave: Actividad antioxidante, *Physalis peruviana*, extracción, rutina, fenoles totales, DPPH, óxido nítrico.

Abstract

Physalis peruviana is a plant used in traditional medicine for its antioxidant properties, which are attributed to their phenolic compounds. In this work, it was evaluated the effect of some variables of the extraction process of calyces of *Physalis peruviana* on the total phenolic content, rutin quantity and in vitro antioxidant activity of the extract obtained, Also it was evaluated the influence of and the storage conditions and some stress factors on the same response variables.

At first was to evaluate the influence of certain factors of the extraction process on the response variables mentioned, in this step it's very important perform an extraction process standardization that allows having uniformity in the results. The vegetable material was harvested in three Colombian regions was subjected to extraction by percolation with variation on certain factors extraction. Subsequently it was evaluated the antioxidant activity by using in vitro assays as (degradation of sodium nitropusiate and DPPH reduction) , phenolic compounds by (Folin-Ciocalteu) and rutin quantity by (HPLC).

Later were performed a study of influence of storage conditions, for which, the extracts were stored under ambient conditions 14 ± 8 ° C, 72 % HR and in a chamber 30 ± 2 °C, 65 ± 5 % RH for four - weeks for both conditions. Finally was performed stability study under stress conditions, where samples were subjected to acid and alkaline hydrolysis as well as oxidation.

It was determined the optimal conditions to get the best results on the response variables evaluated being the extraction solvent (ethanol 70%) and percolation time of 72 hours the factors that influenced in the results; the origin region of vegetable material was also an important factor to obtain the best results. Once established the best extraction conditions was verified that the extraction process was reproducible doing three batches and characterizing the response variables evaluated.

Regarding storage conditions studies it was possible to determined that the antioxidant activity, the rutin quantity and total phenols had no significant changes under ambient storage conditions $14 \pm 8^{\circ}\text{C}$, 72% HR while on camera storage under controlled conditions $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65 \pm 5\%$ RH significant variations occurred in rutin quantity. In stability study under stress conditions, the results showed a significant decrease in the response variables evaluated primarily with alkaline hydrolysis.

Keywords: Antioxidant activity, *Physalis peruviana*, extraction, rutin, total phenol, DPPH, nitric oxide.

Contenido

| | Pág. |
|---|--------------|
| Resumen | IX |
| Lista de figuras | XVI |
| Lista de tablas | XVIII |
| Lista de Símbolos y abreviaturas | XX |
| Introducción | 1 |
| 1. Marco teórico | 5 |
| 1.1 Generalidades de <i>Physalis peruviana</i> | 5 |
| 1.1.1. Estudios fitoquímicos | 7 |
| 1.1.2. Usos terapéuticos tradicionales | 8 |
| 1.1.3. Algunos estudios previos de actividad biológica | 8 |
| 1.2 Estrés oxidativo y actividad antioxidante | 10 |
| 1.2.2. Antioxidantes naturales..... | 10 |
| 1.2.3. Metodologías para evaluar la actividad antioxidante | 13 |
| 1.3 Estandarización de extractos | 15 |
| 1.4 Estudios de estabilidad | 16 |
| 1.4.1 Tipos de estudios de estabilidad..... | 17 |
| 1.4.2 Ensayos de estrés | 17 |
| 1.4.3 Estudios de estabilidad de productos naturales | 20 |
| 1.5 Análisis estadístico en componentes principales ACP..... | 20 |
| 2. Objetivos | 23 |
| 2.1 Objetivo general | 23 |
| 2.2 Objetivos específicos | 23 |
| 3. Materiales y métodos | 25 |
| 3.1 Materiales | 25 |
| 3.1.1 Equipos | 25 |
| 3.1.2 Reactivos..... | 25 |
| 3.1.3 Material vegetal | 26 |
| 3.2 Metodología | 27 |
| 3.2.1 Elaboración de los extractos de cálices de <i>Physalis peruviana</i> | 27 |
| 3.2.2 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de los cálices de <i>Physalis peruviana</i> | 28 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.2.2.1 | Óxido nítrico | 28 |
| 3.2.2.2 | DPPH | 29 |
| 3.2.3 | Evaluación de fenoles totales | 30 |
| 3.2.4 | Cuantificación de rutina por cromatografía líquida de alta eficiencia CLAE | 31 |
| 3.2.5 | Análisis estadístico | 32 |
| 3.2.6 | Estandarización en términos de contenido fenoles totales, actividad antioxidante y contenido de rutina el proceso de extracción cálices de <i>Physalis peruviana</i> | 33 |
| 3.2.6.1 | Evaluación de la actividad antioxidante | 33 |
| 3.2.6.2 | Fenoles totales | 33 |
| 3.2.6.3 | Cuantificación de rutina por cromatografía de alta eficiencia | 33 |
| 3.2.7 | Evaluación del efecto de algunas condiciones de almacenamiento de los extractos de cálices de <i>Physalis peruviana</i> | 33 |
| 3.2.7.1 | Evaluación de la actividad antioxidante | 34 |
| 3.2.7.2 | Fenoles totales | 34 |
| 3.2.7.3 | Cuantificación de rutina por cromatografía de alta eficiencia | 35 |
| 3.2.8 | Evaluación de la estabilidad del extracto de cálices <i>P. peruviana</i> bajo condiciones de estrés | 35 |
| 3.2.8.1 | Hidrólisis..... | 35 |
| 3.2.8.2 | Oxidación | 36 |
| 3.2.9 | Análisis estadístico de la estandarización del proceso de extracción, condiciones de almacenamiento y ensayos de estrés..... | 37 |
| 4. | Resultados y discusión | 39 |
| 4.1 | Extracción del material vegetal | 39 |
| 4.2 | Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de cálices de <i>Physalis peruviana</i> | 41 |
| 4.2.1 | Óxido nítrico | 41 |
| 4.2.2 | DPPH | 42 |
| 4.3 | Cuantificación de fenoles totales..... | 45 |
| 4.4 | Cuantificación de rutina por cromatografía líquida de alta eficiencia | 48 |
| 4.5 | Análisis estadístico de las condiciones de extracción | 52 |
| 4.5.1 | Análisis estadístico de las tres regiones | 52 |
| 4.5.2 | Análisis estadístico de la región de Ipiales | 59 |
| 4.5.3 | Análisis estadístico de la región de Granada..... | 63 |
| 4.5.4 | Análisis estadístico de la región de Silvia | 67 |
| 4.6 | Estandarización del proceso de extracción de los de cálices de <i>Physalis peruviana</i> en términos de contenido de fenoles totales, rutina y actividad antioxidante | 73 |
| 4.6.1 | Evaluación de la actividad antioxidante de los tres extractos obtenidos con las mejores condiciones de extracción..... | 73 |
| 4.6.2 | Evaluación de fenoles totales de los tres extractos obtenidos con las mejores condiciones de extracción | 74 |
| 4.6.3 | Cuantificación de rutina en los tres extractos obtenidos con las mejores condiciones de extracción | 75 |
| 4.7 | Estudio de condiciones de almacenamiento | 75 |
| 4.7.1 | Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos sometidos a condiciones de almacenamiento..... | 76 |
| 4.7.2 | Evaluación fenoles totales de los extractos sometidos a condiciones de almacenamiento..... | 77 |
| 4.7.3 | Cuantificación de rutina de los extractos sometidos a condiciones de almacenamiento..... | 78 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.8 | Ensayos bajo condiciones de estrés..... | 80 |
| 4.8.1 | Hidrólisis | 80 |
| 4.8.1.1 | Cuantificación de rutina por cromatografía de alta eficiencia CLAE | 81 |
| 4.8.1.2 | Fenoles totales | 86 |
| 4.8.1.3 | Evaluación de la actividad antioxidante | 86 |
| 4.8.2 | Oxidación..... | 88 |
| 4.8.2.1 | Fenoles totales | 89 |
| 4.8.2.2 | Actividad antioxidante | 89 |
| 4.8.2.3 | Cuantificación de rutina | 91 |
| 5. | Conclusiones y recomendaciones..... | 95 |
| 5.1 | Conclusiones..... | 95 |
| 5.2 | Recomendaciones..... | 97 |
| | Bibliografía..... | 95 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1-1: Aspectos morfológicos de <i>Physalis peruviana</i> L..... | 6 |
| Figura 1-2: Estructura química de rutina (quercetina-3-O-rutinósido) | 12 |
| Figura 1-3: Degradación de rutina por temperatura | 13 |
| Figura 1-4: Flujograma de los estudios de estrés para la hidrólisis alcalina y ácida. | 19 |
| Figura 4-1: Rendimiento de los extractos de cálices de <i>Physalis peruviana</i> de las tres... regiones. | 40 |
| Figura 4-2: Captación del radical DPPH• por los extractos de cálices de <i>Physalis</i> <i>peruviana</i> en las tres regiones evaluadas. | 44 |
| Figura 4-3: Representación gráfica de la curva de calibración de ácido gálico para la..... cuantificación de fenoles totales. | 45 |
| Figura 4-4: Contenido de fenoles totales de los extractos de cálices de <i>Physalis</i> <i>peruviana</i> de las tres regiones. | 46 |
| Figura 4-5: Cromatograma obtenido para los extractos de cálices de <i>Physalis peruviana</i> a 340 nm..... | 49 |
| Figura 4-6: Cromatograma obtenido para el estándar de rutina a 340 nm..... | 49 |
| Figura 4-7: Contenido de rutina de los extractos de cálices de <i>Physalis peruviana</i> de las tres regiones evaluadas | 51 |
| Figura 4-8: Histograma de valores propios de las tres regiones. | 53 |
| Figura 4-9: Círculo de correlaciones de todas las regiones (primer plano factorial de las... variables del ACP). | 53 |
| Figura 4-10: Figura de punto de corte para la selección del número de clusters. | 55 |
| Figura 4-11: Primer plano factorial con modalidades ilustrativas de todas las regiones | 56 |
| Figura 4-12: Histograma de valores propios de la región de Ipiales. | 59 |
| Figura 4-13: Círculo de correlaciones de la región de Ipiales (primer plano factorial de... las variables del ACP). | 60 |
| Figura 4-14: Punto de corte para la selección del número de clusters en la región de..... Ipiales. | 61 |
| Figura 4-15: Primer plano factorial con modalidades ilustrativas de la región de Ipiales | 62 |
| Figura 4-16: Valores propios para la región de Granada..... | 63 |
| Figura 4-17: Círculo de correlaciones de la región de Granada | 64 |
| Figura 4-18: Punto de corte para la selección del número de clusters para la región de... Granada. | 65 |
| Figura 4-19: Primer plano factorial con modalidades ilustrativas de la región de Granada | 66 |
| Figura 4-20: Valores propios para la región de Silvia. | 67 |

| | |
|---|----|
| Figura 4-21: Círculo de correlaciones de la región de Silvia | 68 |
| Figura 4-22: Punto de corte para la selección del número de clusters para la región de... Silvia. | 69 |
| Figura 4-23: Primer plano factorial con modalidades ilustrativas de Silvia | 70 |
| Figura 4-24: Cromatogramas de los extractos en condiciones normales y bajo..... condiciones de estrés por hidrólisis. | 82 |
| Figura 4-25: Hidrólisis alcalina de flavonoides | 83 |
| Figura 4-26: Degradación de rutina por hidrólisis ácida | 84 |
| Figura 4-27: Ampliación de los cromatogramas de los extractos en condiciones..... normales y bajo condiciones de estrés por hidrólisis. | 85 |
| Figura 4-28: Cromatogramas de la muestra sin degradar y de las muestras sometidas a oxidación con H ₂ O ₂ 1% durante 3 horas..... | 92 |

Lista de tablas

Pág.

| | |
|--|----|
| Tabla 3-1: Matriz diseño experimental RSM | 28 |
| Tabla 3-2: Condiciones de gradiente de concentración de la fase móvil en CLAE..... | 31 |
| Tabla 3-3: Variables del estudio de condiciones de almacenamiento | 34 |
| Tabla 3-4: Condiciones de hidrólisis | 35 |
| Tabla 4-1: Extractos obtenidos de los cálices de <i>Physalis peruviana</i> con sus respectivos.. rendimientos. | 39 |
| Tabla 4-2: Captación de óxido nítrico de los extractos de cálices de <i>Physalis peruviana</i> ... de las tres regiones..... | 41 |
| Tabla 4-3: Captación del radical DPPH• por los extractos de cálices de <i>Physalis</i> <i>peruviana</i> de las tres regiones evaluadas. | 43 |
| Tabla 4-4: Fenoles totales de los extractos de cálices de <i>Physalis peruviana</i> de las tres... regiones evaluadas..... | 46 |
| Tabla 4-5: Contenido de rutina de los extractos de cálices de <i>Physalis peruviana</i> de las... tres regiones, expresado en µg de rutina / mg de extracto..... | 50 |
| Tabla 4-6: Resumen del análisis estadístico para cada una de las regiones | 71 |
| Tabla 4-7: Captación de óxido nítrico de los tres extractos obtenidos con las mejores..... condiciones de extracción | 73 |
| Tabla 4-8: Captación de DPPH• de los tres extractos obtenidos con las mejores..... condiciones de extracción | 74 |
| Tabla 4-9: Cuantificación de fenoles totales de los tres extractos obtenidos con las..... mejores condiciones de extracción | 74 |
| Tabla 4-10: Cuantificación de rutina de los tres extractos obtenidos con las mejores..... condiciones de extracción | 75 |
| Tabla 4-11: Captación de óxido nítrico de las muestras sometidas a condiciones de..... almacenamiento..... | 76 |
| Tabla 4-12: Captación de DPPH• de las muestras sometidas a condiciones de..... almacenamiento..... | 77 |
| Tabla 4-13: Fenoles totales de las muestras sometidas a condiciones de..... almacenamiento..... | 78 |
| Tabla 4-14: Contenido de rutina de las muestras sometidas a condiciones | 79 |
| Tabla 4-15: Degradación de rutina bajo condiciones de hidrólisis..... | 83 |

| | |
|---|----|
| Tabla 4-16: Contenido de fenoles totales de las muestras sometidas a condiciones de.... hidrólisis HCl/NaOH 0,01N, durante 2 horas, a una temperatura de 25°C | 86 |
| Tabla 4-17: Captación de óxido nítrico de las muestras sometidas a condiciones de..... hidrólisis HCl / NaOH 0,01N, durante 2 horas a una temperatura de 25°C..... | 87 |
| Tabla 4-18: Captación de DPPH• de las muestras sometidas a condiciones de hidrólisis.. HCl/NaOH 0,01N, durante 2 horas a una temperatura de 25°C..... | 87 |
| Tabla 4-19: Influencia de la hidrólisis ácida y alcalina sobre las variables respuesta..... evaluadas..... | 88 |
| Tabla 4-20: Contenido de fenoles totales de las muestras sometidas a condiciones de.... oxidación..... | 89 |
| Tabla 4-21: Captación de óxido nítrico de las muestras sometidas a condiciones de..... oxidación..... | 89 |
| Tabla 4-22: Captación de DPPH• de las muestras sometidas a condiciones..... de oxidación | 90 |
| Tabla 4-23: Contenido de rutina de las muestras sometidas a condiciones de..... oxidación..... | 91 |

Lista de Símbolos y abreviaturas

| Abreviatura /símbolo | Significado |
|-----------------------------|---|
| Abs | Absorbancia |
| ACP | Análisis estadístico de componentes principales |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| °C | Grados Celsius o centígrados |
| CLAE | Cromatografía líquida de alta eficiencia |
| DAD | Detector de arreglo de diodos |
| D.E | Desviación estándar |
| DPPH | 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo |
| E.S.M | Error estándar de media |
| G | Gramos |
| ICH | Conferencia Internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano |
| IFA | Ingrediente farmacéutico activo |
| mAU | Unidades de área *10 ⁻³ |
| Mg | Miligramos |
| Min | Minutos |
| mL | Mililitros |
| NaNP | Nitropusiato de sodio |
| NO | Óxido nítrico |
| PBS | Buffer de fosfato |
| PFT | Producto farmacéutico terminado |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| µg | Microgramos |

Introducción

Las plantas se han utilizado a lo largo de la historia como fuente de alimentos, combustibles y como base de la medicina tradicional. Con registros de su uso alrededor del año 2600 antes de Cristo, aproximadamente con 1000 sustancias derivadas de las plantas de Mesopotamia, los griegos, romanos, indios y chinos también contribuyeron al uso de medicinas a base de plantas (Cragg, 2013).

En las últimas décadas los productos naturales de origen vegetal han retomado especial importancia en el tratamiento de diversas enfermedades debido a la gran cantidad de investigaciones en fitoquímica, farmacognosia y horticultura (Petronilha, 2012). La demanda de fitoterapéuticos, fitocosméticos y suplementos dietarios está aumentando a nivel mundial como alternativas terapéuticas antioxidantes y antiinflamatorios entre otras, con menos efectos secundarios, menos tóxica y a precios más bajos, por lo tanto juegan un papel importante principalmente en las zonas rurales de países en vía de desarrollo (Sen, 2011).

Teniendo en cuenta la importancia que han tomado los productos naturales, es necesario construir información fiable sobre la calidad, seguridad y efectividad de los mismos, el primer paso para obtener dicha información es la estandarización de los extractos que serán utilizados como materia prima en los fitoterapéuticos, fitocosméticos y suplementos dietarios (Izquierdo *et al.*, 2011). Dentro de la estandarización de los extractos, el proceso de extracción cumple un papel muy importante ya que puede influir sobre los compuestos bioactivos de la plantas, por eso es de vital importancia garantizar su uniformidad y reproducibilidad (Patel *et al.*, 2012; Cristiane *et al.*, 2005). El presente trabajo tiene como objetivo estandarizar las condiciones de extracción de cálices de *P. peruviana* con el fin de obtener un extracto rico en fenoles y con elevada capacidad antioxidante como un aporte a la estandarización de un extracto de cálices de *P. peruviana* con actividad antioxidante.

La actividad antioxidante de los medicamentos basados en productos naturales ha sido centro de muchos estudios, un importante grupo de investigadores se han basado en el estrés oxidativo y en la búsqueda de antioxidantes de origen vegetal seguros y eficaces, el creciente interés se ha desencadenado debido a las diversas enfermedades ligadas a la oxidación como son las patologías cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes y el cáncer (Alarcón, 2013). Muchas plantas se han proyectado como fuentes viables de antioxidantes, debido a la presencia de compuestos fenólicos en las mismas.

Physalis peruviana L. originaria del Perú, es una planta perenne y arbustiva con frutos en forma de bayas, los cuales crecen dentro de un cáliz formado por cinco sépalos que protege completamente el fruto durante todo su desarrollo (Floréz, 2000). Ésta planta es usada en la medicina tradicional Colombiana así como en otros países por sus actividades farmacológicas relacionadas con su capacidad antioxidante y antiinflamatoria entre otras. Estudios fitoquímicos de *Physalis peruviana* L. demostraron la presencia de compuestos fenólicos en diferentes órganos de la misma como frutos y cálices a lo cual atribuyeron la elevada capacidad antioxidante de la planta (Licodiedoff *et al.*, 2013; Vilaplana *et al.*, 2014). Wu y colaboradores también estudiaron dicha capacidad en la planta entera de *Physalis peruviana* L. encontrando una importante actividad antioxidante la cual se vio influenciada por las condiciones de extracción (Wu *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta lo anterior *P. peruviana* es un candidato prometedor para el desarrollo de productos fitoterapéuticos y fitocosméticos, los cuales requieren para su diseño información previa que permita estandarizar los extractos para asegurar la calidad de los mismos.

También es importante tener en cuenta que la seguridad de los medicamentos a base productos naturales ha tomado especial control por los entes regulatorios debido a problemas de calidad presentados en la fabricación de los mismos ya que, a diferencia de los medicamentos sintéticos, los medicamentos a base de productos naturales son químicamente más complejos. Existen diversos factores que pueden afectar el perfil fitoquímico y la calidad de éstos productos como son: la procedencia geográfica, genotipo, partes de la planta, tiempo de cosecha, almacenamiento y extracción (Debbie *et al.*, 2012).

Por tal razón y aprovechando la investigación fitoquímica y farmacológica que, tanto de los frutos como de los cálices de ésta especie, ha sido desarrollada por investigadores del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, el presente trabajo tiene como principal objetivo determinar cuáles son las condiciones del método de extracción que permiten obtener un extracto de cálices de *P. peruviana* más rico en fenoles totales y con mayor capacidad antioxidante. Adicionalmente, evaluar el efecto que ciertos factores de estrés y ciertas condiciones de almacenamiento puedan tener sobre dicho contenido de fenoles totales y dicha capacidad antioxidante del extracto obtenido. Como parte complementaria del trabajo, la recolección de las especies nativas se llevó a cabo en tres regiones de Colombia (Cauca, Nariño y Cundinamarca) teniendo en cuenta que la procedencia geográfica también tiene importante influencia en las variables anteriormente mencionadas.

Los resultados obtenidos contribuyen a la generación de valor agregado para este material de desecho así como también al conocimiento de la actividad farmacológica de los cálices de *P. peruviana* como antioxidante y son una base para continuar con la caracterización de estos extractos dentro de la preformulación de un producto fitoterapéutico o fitocosmético.

1. Marco teórico

1.1 Generalidades de *Physalis peruviana*

Physalis peruviana L. de nombre común uchuva o *cape gooseberry* en países de habla inglesa, es originaria del Perú. También existen indicios de que proviene del Brasil y fue aclimatada en los altiplanos del Perú y Chile. Entre Chile y Colombia crece como planta silvestre y semisilvestre en zonas altas entre los 1.500 y los 3.000 m.s.n.m, prefiere temperaturas promedio entre 13°C y 18°C. Con el aumento de la altitud la planta produce un sistema radical más superficial, un porte más bajo, hojas pequeñas y gruesas, y aplaza el pico de producción (Flórez, 2000).

El género *Physalis* (familia Solanaceae), incluye unas 100 especies herbáceas perennes y anuales cuyos frutos se forman y permanecen dentro del cáliz; casi todas en estado silvestre y muy pocas en estado semisilvestre, siendo *P. peruviana* la especie más utilizada por su fruto azucarado (Flórez, 2000).

P. peruviana es una herbácea, semi- arbusto en posición vertical, perenne en zonas subtropicales, puede llegar a crecer hasta una altura de 1,8 m. Las flores son polinizadas fácilmente por insectos, por el viento e incluso por autopolinización (Puente *et al.*, 2011).

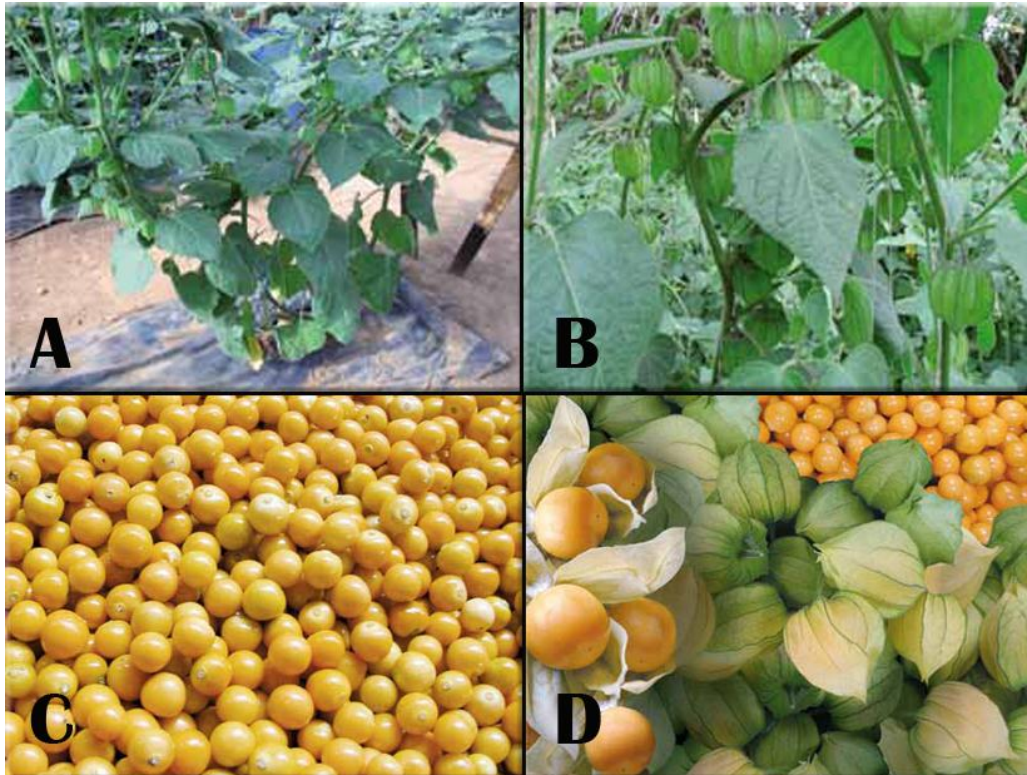
El fruto es redondeado u ovoide, color naranja, de aproximadamente dos centímetros de diámetro, con un peso de 4 a 10 g, su pulpa jugosa de olor y sabor agradables, con numerosas semillas pequeñas; encerrado en un cáliz acrescente con forma de vejiga, de color verde que cuando la fruta madura se torna más delgado y de color pardo (Wills *et al.*, 1984) como se observa en la Figura 1-1.

La fruta de la uchuva tiene un alto contenido de vitamina A, minerales, ácido ascórbico vitamina C, así mismo están presentes vitaminas del complejo B como son: Tiamina (0.05), Niacina (0.02) y Ácido Nicótico (0.3). El fruto contiene 15% de sólidos solubles principalmente azúcares con un alto nivel de fructosa.

Los contenidos de proteína y fósforo son excepcionalmente altos para una fruta, su contenido de fibra es de gran importancia en la dieta en la que la pectina presente en la fruta actúa como regulador intestinal (Ramadan, 2011).

En relación al cáliz, objeto de estudio en el presente trabajo, éste se encuentra formado por cinco sépalos persistentes, es vellosos con venas salientes y con una longitud de unos 4 a 5 cm, cubre completamente el fruto durante todo su desarrollo; inicia su alargamiento cuando ha pasado la fecundación del fruto. Durante los primeros 40 a 45 días de su desarrollo es de color verde, pero con la maduración del fruto va perdiendo clorofila volviéndose pergamino al final. Es importante porque protege el fruto contra insectos, pájaros, enfermedades y situaciones climáticas extremas como la radiación solar, además de servir como una fuente indispensable de carbohidratos durante los primeros 20 días del crecimiento del fruto (Flórez, 2000).

Figura 1-1: Aspectos morfológicos de *Physalis peruviana* L. A. Ejemplar planta entera, B. hojas y tallo, C. fruto, D. fruto con cáliz. Adaptado de Carmona, 2011. Uchuva *Physalis peruviana*



En Colombia a finales de la década de los ochenta se introdujeron al departamento de Boyacá dos ecotipos africanos, procedentes de Kenia y Sudáfrica. Durante las últimas tres décadas *P. peruviana* pasó de ser una especie olvidada a la fruta exótica más promisoriosa para el mercado internacional siendo Europa, Asia y Estados Unidos los principales consumidores de la misma. El ecotipo Colombiano se ha destacado por características como sabor dulce, aroma y color brillante, además de lo anterior el interés comercial en esta fruta ha crecido debido a que sus propiedades nutricionales y medicinales han empezado a ser mucho más exploradas, lo cual ha incentivado su desarrollo como cultivo comercial. Las exportaciones de uchuva desde Colombia son las más significativas en el ámbito mundial por lo cual en los últimos cinco años el área cultivada aumentó significativamente siendo el departamento de Cundinamarca el principal productor (Flórez, 2000).

1.1.1. Estudios fitoquímicos

Diversos compuestos químicos de *P. peruviana* han sido investigados como es el caso de los flavonoides (miricetina, rutina), los cuales fueron encontrados en los frutos (Licodiedoff *et al.*, 2013). Wu y colaboradores atribuyeron la elevada actividad antioxidante de los extractos etanólicos de la planta entera de *P. peruviana* a los flavonoides presentes en la misma (Wu *et al.*, 2005).

Estudios llevados a cabo por Basey y colaboradores indicaron la presencia del alcaloide higrina en las raíces y las partes aéreas de *P. peruviana*, la cual también se encuentra en otras especies del mismo género (Basey *et al.*, 1992).

Otros estudios han centrado sus investigaciones en la presencia de witanólidos como perulactonas, 28-hidroxiwitanólido, witaperuvina I-K-L-N, fiperunólidos A-B y fisalolactona en las partes aéreas de *P. peruviana* (Fang *et al.*, 2012).

Vilaplana *et al.*, realizaron estudios sobre la composición química de diferentes frutos latinoamericanos incluyendo los cálices de *P. peruviana* identificando quercetin-3-O-rutinósido, kaempferol-3-O-rutinósido, ácidos 3-O-cafeoilquínico y 5-O-cafeoilquínico, destacando las concentraciones de flavonoles y derivados del ácido hidroxicinámico las cuales fueron las más altas comparadas con otras frutas de Latinoamérica con actividad antioxidante (Vilaplana *et al.*, 2014). Estos resultados son coherentes dentro de nuestro grupo de investigación en donde se aisló e identificó al quercetin-3-O-rutinósido (rutina) y

kaempferol-3-O-rutinósido como los principales componentes de los extractos de cálices de *P. peruviana*.

1.1.2 Usos terapéuticos tradicionales

Muchas propiedades medicinales se le han atribuido a *P. peruviana* en la medicina popular como antiespasmódica, diurética, antiséptica antidiabéticas sedante y analgésico (Puente *et al.*, 2011), en el tratamiento de malaria, asma, hepatitis, dermatitis y reumatismo, (Licodiedoff *et al.*, 2013). En diferentes regiones de Colombia, se le han atribuido usos terapéuticos como purificador de la sangre, disminución de la albúmina, en el tratamiento de las cataratas, reconstrucción del nervio óptico y en control de la amebiasis, de las cuales algunas han sido validadas experimentalmente. Algunas de las propiedades medicinales del fruto de *P. peruviana* están relacionadas con su actividad antioxidante y los polifenoles presentes en la fruta (Puente *et al.*, 2011).

Los cálices de *P. peruviana* son ampliamente utilizados en la medicina tradicional por sus propiedades contra el cáncer, antimicrobiano, antipirético, diurético e inmunomodulador y anti-inflamatorio (Puente *et al.*, 2011). Estos múltiples usos populares de *P. peruviana* han motivado el desarrollo de diversas investigaciones con el objetivo de identificar sus principios activos y sus acciones farmacológicas.

1.1.3 Algunos estudios previos de actividad biológica

En un estudio realizado por Wu *et al.*, determinaron el método de extracción de *P. peruviana* más eficaz para obtener un extracto con óptimas propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Los métodos empleados fueron maceración con variación del fluido de extracción (agua caliente, etanol al 96%) y fluidos supercríticos con CO₂, y las variables respuesta fueron la actividad antioxidante y antiinflamatoria. El estudio demostró que las variaciones en el método de extracción tienen influencia sobre los compuestos activos al igual que sobre las propiedades terapéuticas. El extracto obtenido por medio de la metodología de fluido supercrítico con etanol al 5% mostró un mayor contenido de fenoles y flavonoides totales, al igual que una actividad antioxidante y antiinflamatoria más potente que los métodos convencionales. Se encontró que el extracto SCEPP-5, obtenido en condiciones supercríticas, presentaba la mayor contenido de flavonoides (234.63 ± 9.61 mg/kg) y fenoles (90.80 ± 2.21 mg/kg) y por ende una potente actividad antioxidante. La evaluación de la actividad se realizó en pruebas de Citocromo C,

inhibición de la xantina oxidasa, determinación de nitrito y ensayo de prostaglandina E2. Estos resultados confirman algunos de los usos tradicionales de *P. peruviana* y permiten medir la actividad antioxidante. Esta actividad antioxidante se le atribuye a la presencia de flavonoides saponinas y fenoles, compuestos que fueron identificados en estudios fitoquímicos (Wu *et al.*, 2006).

Dentro del conjunto de investigaciones que se han realizado sobre las propiedades terapéuticas de *P. peruviana* se le ha atribuido especial importancia a la actividad antiinflamatoria. Uno de los estudios se llevó a cabo con el fin de demostrar dicha actividad en extractos del jugo del fruto tomando un modelo inflamatorio en ojos de conejo. Los resultados confirmaron la actividad antiinflamatoria del jugo del fruto en comparación con fármacos antiinflamatorios de uso común, además de una fuerte acción inhibitoria sobre el crecimiento de fibroblastos de conejo, lo que podría validar su uso popular en el tratamiento de los pterigios (Pardo *et al.*, 2011).

Franco y cols., evaluaron la actividad antiinflamatoria de *P. peruviana* pero a diferencia de estudios previos, esta investigación fue llevada a cabo con extractos y fracciones obtenidas de los cálices de *P. peruviana*. Para esto realizaron ensayos *in vivo* e *in vitro* sobre mediadores del proceso inflamatorio como prostaglandinas, óxido nítrico y el factor de necrosis tumoral alfa así como en el modelo *in vivo* de colitis ulcerativa. Los resultados obtenidos confirmaron la actividad antiinflamatoria de la fracción mayoritaria de los cálices de *P. peruviana*, validando su uso en la medicina popular (Franco, 2006).

Así mismo, diversos estudios se han enfocado en otras propiedades de ésta planta como la anticancerígena, evaluando la actividad citotóxica de *P. peruviana* en las líneas colo-205 (cáncer de colon) y K562 (leucemia mieloide crónica) (Zavala *et al.*, 2006). Este estudio concluyó que los extractos etanólicos de hojas y tallos son más citotóxicos que el fármaco de elección en cáncer de colón (5-fluorouracilo), lo cual indica que *P. peruviana* posee gran potencial en la búsqueda de nuevas sustancias activas anticancerígenas.

La actividad antibacteriana también ha sido investigada. Estudios *in vitro* de la actividad antibacteriana de extractos y fracciones de cálices de *P. peruviana* sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, indicaron una potente actividad para la fracción de cloroformo de cálices de *P. peruviana* CMI \leq 0,256 mg/mL (Franco *et al.*, 2013).

1.2 Estrés oxidativo y actividad antioxidante

El estrés oxidativo es causado por las ROS, las cuales incluyen aniones superóxido (O_2^-), radicales hidroxilo ($OH\bullet$), peróxidos inorgánicos (H_2O_2), peróxidos orgánicos (ROOH), ozono (O_3), oxígeno singlete (O_2), peroxilo (ROO) y semiquinona (Q) es una de las principales causas de enfermedades cardiovasculares y diabetes así como también del envejecimiento. El cáncer y las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer también son generadas por ROS debido al daño causado por dichas especies reactivas al ADN (Kumar, 2012). Aunque las ROS son producidas en el cuerpo humano durante la función celular normal y como mecanismo de defensa del sistema inmune contra infecciones, la sobreproducción de éstas causa oxidación de macromoléculas tales como lípidos de membrana, proteínas, enzimas y ácidos nucleicos (Johanson *et al.*, 2010).

El daño celular que ocurre sobre los lípidos se conoce como peroxidación lipídica, lo cual altera la permeabilidad de la membrana causando muerte celular (Cadenas y Hauptmann, 1997). En cuanto a las proteínas se presenta la oxidación de un grupo de aminoácidos como son fenilalanina, tirosina, histidina y metionina, en el ADN ocurren mutaciones y carcinogénesis (Wiseman y Halliwell, 1996).

El efecto de la excesiva producción de ROS es contrarrestado por los sistemas antioxidantes endógenos los cuales hacen parte de la primera línea de defensa frente a la oxidación, éstos se encuentran constituidos por familias de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPx), también se encuentran los antioxidantes no enzimáticos vitamina E, ascorbato y glutatión (Johanson *et al.*, 2010). Este mecanismo se complementa con fuentes externas de antioxidantes, que demuestran ser ellas mismas antioxidantes independientes, vienen a apoyar los sistemas antioxidantes de primera línea o también sirven de materiales básicos para que el cuerpo pueda fabricar antioxidantes (Festy, 2007).

1.2.2 Antioxidantes naturales

Es bien conocido que una dieta rica en frutas y vegetales protege contra ciertas formas de cáncer y enfermedades cardiovasculares. Dichos efectos protectores se han atribuido en gran parte a los antioxidantes presentes como el ácido ascórbico, β -caroteno, carotenoides de menor importancia y los compuestos fenólicos (Rice-Evans *et al.*, 1995).

Los compuestos fenólicos son muy importantes para la fisiología de las plantas debido a su participación en la morfología de las mismas (color, soporte mecánico en el caso de lignina), en el crecimiento (ácidos fenólicos se han relacionado con la absorción de nutrientes y proteínas), en la reproducción y en protección contra patógenos y otros factores de estrés como la radiación UV (Stalikas, 2007; Schijlen *et al.*, 2004; Heim *et al.*, 2002; Parr y Bolwell, 2000). Estos van desde fenoles simples hasta compuestos altamente polimerizados, siendo los ácidos fenólicos, cumarinas, taninos condensados y flavonoides las principales subclases de los mismos (Hounsome *et al.*, 2008; Bravo, 1998; Macheix *et al.*, 1990).

Los flavonoides son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal que abarcan aproximadamente 10.000 estructuras, son importantes para el desarrollo de la planta así como para su defensa frente a agentes agresores externos por lo cual su ubicación en las plantas también depende de sus funciones, la gran cantidad de flavonoides en apéndices externos tales como tricomas es consistente con las funciones de protección de la radiación UV de los rayos solares (Agati *et al.*, 2012). También se ha reportado en la bibliografía la protección que brindan contra microorganismos como bacterias, hongos y virus, a los insectos, otros animales herbívoros y al medio ambiente agresivo (Heim *et al.*, 2002).

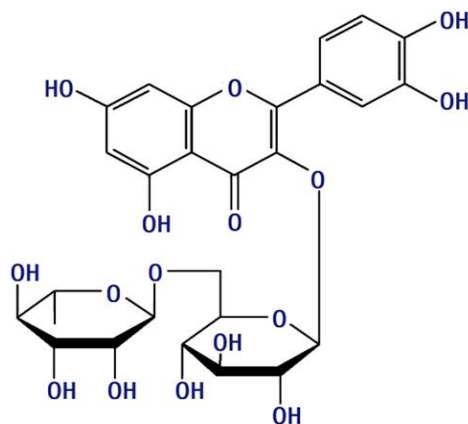
Por otra parte, en su relación con el hombre éstos compuestos se han reportado como los mayores constituyentes en la dieta de origen vegetal, se estima que aproximadamente 3-80 mg de flavonoides son consumidos en la dieta diaria y provienen exclusivamente de los alimentos de origen vegetal. Sus principales fuentes se encuentran en las frutas, verduras, determinadas bebidas como el vino, cereales y las legumbres (Festy, 2007), lo cual es beneficioso ya que éstas sustancias presentan una serie de actividades farmacológicas, como su actividad sobre la circulación sanguínea, actividad antihepatotóxica, antiinflamatoria, antialérgica, antitumoral, antibacteriana, antifúngica y antiviral (Baberán *et al.*, 1994).

Los flavonoides son de naturaleza fenólica y se caracterizan por poseer dos anillos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general $C_6-C_3-C_6$. Suelen presentar al menos tres hidroxilos fenólicos y se encuentran generalmente combinados con azúcares en forma de glicósidos, aunque también se

encuentran con relativa frecuencia como agliconas libres (Baberán *et al.*, 1994). Teniendo en cuenta las variaciones en su estructura, los flavonoides se han clasificado principalmente en flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, catequinas, y antocianinas (Pyrzynska y Biesaga, 2009). Además, una amplia variedad de derivados están presentes en cada familia según el número y la naturaleza de los sustituyentes unidos al núcleo flavonoide (Biesaga, 2011).

Un flavonoide de relevancia en el presente trabajo es rutina, compuesto por quercetina (2, 3, 5, 7, 3',4'-pentahidroxiavona) y rutinosa, un disacárido de ramnosa y glucosa (Cui *et al.*, 2014), como se muestra en la Figura 1-2. Rutina, que se encuentra presente en los cálices de *P. peruviana*, tiene importante actividad antioxidante además de otras actividades biológicas que son potencialmente beneficiosas para la salud como cardioprotector, antiinflamatoria, anticancerígeno y protector neurológico. Por lo cual éste flavonoide se ha convertido en un importante ingrediente bioactivo en nutracéuticos y productos farmacéuticos (Nguyen *et al.*, 2013).

Figura 1-2: Estructura química de rutina (quercetina-3-O-rutinósido)



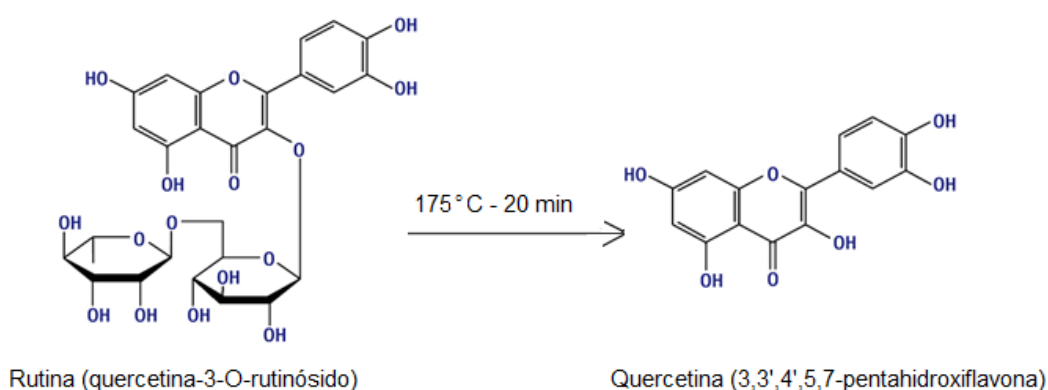
La potente actividad antioxidante de rutina se debe principalmente a la presencia de anillos fenólicos y grupos hidroxilo libres en su estructura química, éstos grupos hidróxilo pueden donar hidrógeno para evitar la oxidación (Chua, 2013). También se le ha atribuido dicha actividad al doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C (Rice-Evans, 2001).

De los aproximadamente 2000 flavonoides glicósidos conocidos, quercitrina, rutina y robinin son los más comunes en la dieta. Quercitrina y rutina son hidrolizados en el

intestino para la formación de quercetina mientras que la hidrólisis de robinin forma kaempferol (Bokkenheuser *et al.*, 1987).

Estudios llevados a cabo por Deng y colaboradores sobre la estabilidad de los flavonoides glicósidos en hojas de noni, demostraron que a temperaturas que oscilan entre 100-200°C rutina sufre degradación de 50-95% lo que conlleva a la formación de quercetina, Figura 1-3 (Deng *et al.*, 2001).

Figura 1-3: Degradación de rutina por temperatura (Adaptado de Deng *et al.*, 2001)



1.2.3 Metodologías para evaluar la actividad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos naturales ha presentado un creciente interés en la actualidad, debido a la complejidad de las metodologías *in vivo*, se han desarrollado distintos métodos *in vitro* para determinar de una manera experimental sencilla la actividad antioxidante de una sustancia determinada. Los ensayos se basan en diversas estrategias como:

- La evaluación del barrido de radicales libres por los antioxidantes.
- La capacidad de los antioxidantes para reducir iones cúpricos y férricos.
- La capacidad de los antioxidantes para proteger a una molécula diana expuesta a determinada fuente de radicales libres.
- La inhibición de la oxidación de las proteínas de baja densidad LDL (Alarcón, 2013).

A continuación se describirán los dos ensayos antioxidantes utilizados en el presente trabajo:

Ensayo de captación de DPPH•

Dentro de los ensayos basados en la evaluación del barrido de radicales libres se encuentra la metodología de captación de DPPH (2,2- difenil-1- picrilhidracilo). DPPH• es un radical estable y presenta una banda de absorción típica a 517nm, la disminución en la intensidad de la absorción en presencia de muestras que contienen antioxidantes se obtiene después de un determinado tiempo de incubación (30 min) (Alarcón, 2013).

El radical DPPH• produce un intenso color morado en solventes orgánicos, cuando ésta solución de DPPH se mezcla con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno se da lugar a su forma reducida, lo cual conlleva a la pérdida del color morado. La reacción primaria se presenta en la ecuación (1.1).



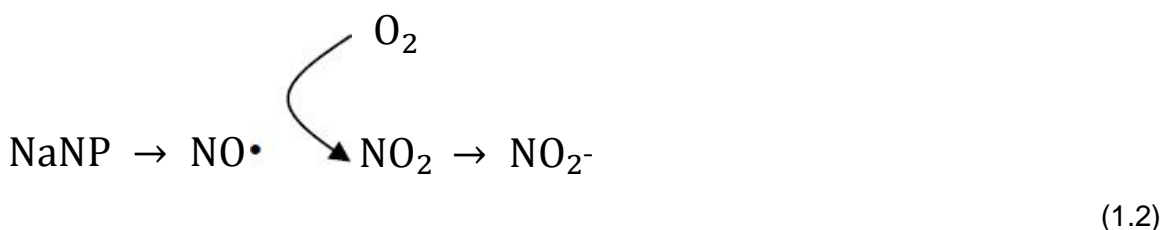
Siendo Z• el radical DPPH•, AH la molécula donante, ZH la forma reducida y A• el radical libre producido en éste primer paso el nuevo radical formado es mucho más estable que el inicial. Ésta ecuación tiene como objetivo representar como la actividad de los radicales libres Z• se ve suprimida por la formación de ZH (Molyneux, 2004).

Es importante tener en cuenta que el ensayo de captación de DPPH• proporciona información sobre la capacidad para donar electrones de los compuestos, el número de electrones que determinada molécula puede donar y por lo tanto información sobre el mecanismo bajo el cual se llevaría a cabo la actividad antioxidante. Sin embargo, el radical DPPH• no posee relevancia biológica, por lo tanto el ensayo proporciona importante información para determinar la capacidad de captación de radicales libres de los extractos analizados pero es necesario complementar la investigación con otros ensayos de capacidad antioxidante y llevar a cabo estudios *in vivo* con el fin de determinar el comportamiento de los extractos analizados y su actividad antioxidante en los sistemas biológicos (Mansour *et al.*, 2011).

Captación de radical óxido nítrico

Otro ensayo que también evalúa la capacidad de barrido de radicales libres, es el ensayo de captación de óxido nítrico. Éste método utilizado para la determinación de NO• se realiza indirectamente por medio de la valoración del nitrito y nitrato que son los últimos

productos formados por éste radical en fase acuosa (Franco, 2006). Para llevar a cabo éste proceso se utiliza el nitropusiato de sodio en solución acuosa, a pH fisiológico el cuál espontáneamente genera óxido nítrico, éste interactúa con oxígeno para producir iones nitrito que pueden cuantificarse utilizando el reactivo de Griess. Los antioxidantes compiten con el oxígeno por el óxido nítrico, lo que conlleva a una reducción en la producción de iones nitrito. Como se puede observar en la ecuación (1.2). La absorbancia se lee a 550nm (Ebrahimzadeh *et al.*, 2010).



El radical $\text{NO}\cdot$ es un radical gaseoso, producido por distintas células y capaz de mediar un gran número de funciones efectoras (Robbins *et al.*, 2007). Por lo tanto a diferencia del radical $\text{DPPH}\cdot$ el radical $\text{NO}\cdot$ posee importante relevancia biológica.

1.3 Estandarización de extractos

La estandarización de extractos vegetales adquiere una importancia cada vez mayor, ya que facilita una mejor caracterización analítica de los extractos permitiendo que se cumplan los requisitos de calidad, efectividad y seguridad exigidos para cualquier medicamento a base de productos naturales (Izquierdo *et al.*, 2011).

La calidad de los extractos vegetales se puede ver influenciada por factores tales como el método de extracción, el solvente de extracción, tamaño de las partículas de la droga vegetal, proporción material vegetal / solvente y el tiempo de extracción. La uniformidad de dichos factores en la obtención de los extractos es de gran importancia para garantizar la calidad de los mismos. El desarrollo de técnicas que permitan el análisis de los compuestos presentes en la planta también constituye un paso esencial para la estandarización de extractos vegetales (Patel *et al.*, 2012; Cristiane *et al.*, 2005).

Para llevar a cabo la estandarización de extractos se requiere de los siguientes pasos:

- Secado y la molienda
- Selección del método de extracción adecuado

- Análisis de los compuestos utilizando métodos cromatográficos y espectrofotométricos determinados
- Análisis de datos a base de compuestos bioactivos o marcadores (Heng *et al.*, 2013).

Los diferentes métodos de extracción pueden afectar el perfil fitoquímico y los compuestos bioactivos obtenidos de la planta, por lo tanto dependiendo de las propiedades físicas y químicas de los compuestos presentes en los materiales vegetales, una adecuada extracción, en combinación con una técnica analítica apropiada es primordial (Heng *et al.*, 2013).

En el presente trabajo se llevó a cabo la estandarización del método de extracción de los cálices de *P. peruviana*, con el fin de obtener los mejores resultados en cuanto al contenido de fenoles totales, contenido de rutina y actividad antioxidante, aportando con éste paso para la estandarización de un extracto de cálices de *P. peruviana*.

1.4 Estudios de estabilidad

El propósito de un estudio de estabilidad, para este caso, es suministrar la evidencia necesaria y suficiente de cómo la calidad de un extracto vegetal varía con el tiempo por la influencia de determinados factores ambientales tales como temperatura, humedad y luz con el fin de establecer las condiciones almacenamiento recomendadas y sustentar la vida útil del extracto (Li *et al.*, 2005).

El mercado de los productos naturales ha experimentado un elevado crecimiento durante los últimos años. Sin embargo, las formulaciones basadas en extractos vegetales son a menudo propensas al deterioro bien sea durante la extracción, fabricación y/o el almacenamiento, lo cual puede llevar a la pérdida del principio activo, la producción de metabolitos sin actividad y en casos extremos la formación de metabolitos tóxicos. Los estudios de estabilidad tienen importante relevancia en la etapa de formulación para la determinación de unas condiciones de almacenamiento que garanticen la calidad y eficacia del producto natural (Thakur *et al.*, 2011). Sin embargo, es importante destacar que hasta la fecha, no existen resoluciones específicas para el estudio de estabilidad de los extractos vegetales, ni de los productos fitoterapéuticos.

1.4.2 Tipos de estudios de estabilidad

Los estudios de estabilidad pueden ser realizados de varias formas. Estudios de estabilidad acelerados (envejecimiento acelerado) y los de largo plazo (envejecimiento natural). Los primeros sirven para soportar la vida útil más probable (tentativa) del producto en el mercado y los segundos para establecer la vida útil definitiva del producto bajo unas condiciones de almacenamiento definidas (Ministerio de protección social, 2006).

Con el fin de brindar información sobre el desarrollo y presentación de los estudios de estabilidad de medicamentos, el Ministerio de Protección Social publicó en 2006 una guía la cual fue estructurada tomando como referencia los documentos publicados por la OMS y la ICH (Ministerio de protección social, 2006).

1.4.3 Ensayos de estrés

Los ensayos bajo estrés realizados en un ingrediente farmacéutico activo, pueden ayudar a identificar los productos de degradación, lo que a su vez permite el establecimiento de las rutas de descomposición, la estabilidad intrínseca de la molécula y la validación de la capacidad del procedimiento analítico para distinguir entre el analito de interés y los productos de degradación con el fin de ser empleado en estudios de estabilidad.

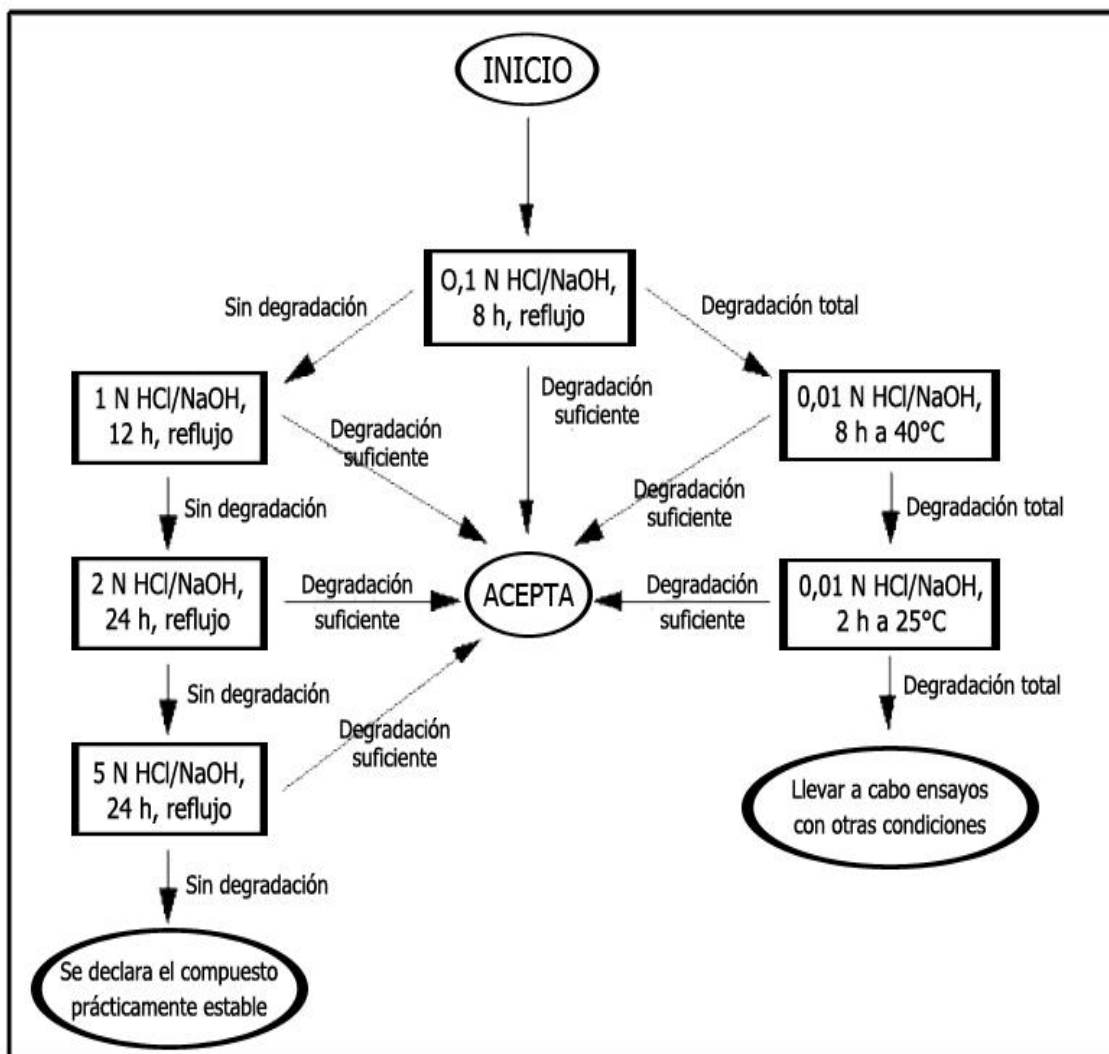
La naturaleza de los ensayos bajo estrés dependerá del IFA, en particular y del tipo de producto farmacéutico terminado involucrado (Ministerio de protección social, 2006). Estas pruebas no están diseñadas para degradar completamente el compuesto, sino con el fin de promover la degradación en cierto porcentaje (10-30%) (Singh y Bakshi, 2000).

Sin embargo, la ausencia de procedimientos para este tipo de estudios es una de las dificultades a las cuales se enfrentan los investigadores en el momento de decidir las condiciones de estrés que serán utilizadas en el desarrollo de medicamentos (Singh y Bakshi, 2000). Con respecto a los medicamentos a base de productos naturales, es poca la información sobre cómo llevar a cabo estos ensayos y la presencia de mezclas complejas en los extractos hace que las directrices de la ICH para medicamentos no se puedan aplicar directamente a éstos productos (Bilia *et al.*, 2001).

▪Hidrólisis

La hidrólisis es una de las degradaciones químicas más comunes, es un proceso que incluye la degradación de un compuesto al reaccionar con agua. La hidrólisis ácida y básica implica la catálisis de los grupos funcionales ionizables presentes en la molécula. La selección del tipo y la concentración de los ácidos y bases a utilizar dependen de la estabilidad del compuesto, al igual que la temperatura para el ensayo las cuales pueden variar de 40°C a 110°C (Blessy *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta dichas variaciones en el presente estudio, se tomó como base para realizar los análisis la guía propuesta por Singh y Bakshi, 2000 para los ensayos de hidrólisis. Como se presenta en la Figura 1-4.

Figura 1-4: Flujograma de los estudios de estrés para la hidrólisis alcalina y ácida (Adaptado de Singh y Bakshi, 2000)



▪ Oxidación

La reacción de oxidación implica la eliminación de un átomo electropositivo o radical, o la adición de un átomo electro negativo o radical (Singh y Bakshi, 2000). El peróxido de hidrógeno es el compuesto más utilizado para la oxidación en los ensayos de degradación forzada. Sin embargo, existen otros compuestos como iones metálicos y oxígeno que también pueden ser utilizados en éste tipo de ensayo. La selección del tipo de reactivo y la concentración del mismo dependen de la estabilidad del compuesto (Blessy *et al.*, 2013).

1.4.4 Estudios de estabilidad de productos naturales

Diversos investigadores han realizado estudios de estabilidad a productos naturales, para lo cual han realizado adaptaciones de las metodologías para formas farmacéuticas y fármacos sintéticos.

Bilia *et al.*, evaluaron la estabilidad térmica y foto estabilidad, tanto de un extracto comercial seco de *Hypericum perforatum* L. como de cápsulas que incluían dicho extracto, aplicando las guías de la ICH. Los análisis se realizaron por cromatografía líquida de alta resolución (CLAE) tomando como marcadores flavonoles, hiperforinas e hipericinas. Los resultados mostraron que todos los compuestos evaluados fueron fotosensibles en las condiciones evaluadas. Los estudios de estabilidad fueron realizados durante tres meses bajo dos condiciones de temperatura y humedad $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ a $60\% \pm 5\%$ HR para los estudios a largo plazo y $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ a $75\% \pm 5\%$ HR, para las condiciones aceleradas. Según los resultados encontrados en los estudios acelerados los compuestos se degradaron rápidamente y en los estudios a largo plazo se presentó una degradación de más del 70% para hipericinas en un periodo de tres meses. Los autores del estudio sugieren revisar y adaptar las condiciones de almacenamiento de dichas formas farmacéuticas, las cuales son ampliamente comercializadas (Bilia *et al.*, 2001).

1.5 Análisis estadístico en componentes principales ACP

El análisis en componentes principales (ACP) es una técnica multivariada, cuyo principal objetivo es comparar los individuos según los valores de las variables continuas que se parecen, un segundo objetivo es el de ver relaciones entre las variables que están describiendo a los individuos (Pardo y Cabargas, 2011).

La comparación de los individuos está basada en similitudes y diferencias, ofreciendo una descripción visual del grupo o clustering por medio de representaciones geométricas: una para comparar a los individuos (nube de individuos), y otra para estudiar las relaciones entre las variables (nube de variables) (Pardo y Cabargas, 2011).

En la nube de individuos, el parecido o la diferencia de los mismos, según las variables que los están caracterizando se traduce en la analogía geométrica en un sistema de distancias, ósea el parecido o diferencia de los individuos se determina en cercanía o lejanía geométrica (Pardo y Cabargas, 2011).

La nube de variables se puede entender, como un conjunto de flechas que parten del origen y son de una longitud igual a la desviación estándar de la variable. El ángulo entre cada par de flechas representa la correlación entre esas dos variables. Ángulos pequeños significan una alta correlación positiva, ángulos cercanos a 90° ausencia de correlación y ángulos cercanos a 180° una alta correlación negativa (Pardo y Cabargas, 2011).

El ACP tiene presenta múltiples ventajas:

- Reduce la dimensionalidad de un conjunto de datos multivariados
- Remueve las relaciones existentes entre las variables
- Es una herramienta útil para simplificar el análisis
- Permite interpretar gran cantidad de variables consideradas en una evaluación exhaustiva (Borrego *et al.*, 1999).

Dadas las ventajas de la metodología, el ACP ha sido aplicado a una gran cantidad de problemas en las ciencias. Carrillo *et al.*, investigaron la influencia de las zonas de origen de *Theobroma cacao* sobre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante, para lo cual utilizaron el análisis en componentes principales ACP. La metodología usada les permitió establecer que el contenido de cafeína y la relación teobromina / cafeína, se veían influenciadas por la zona de origen del material vegetal (Carrillo *et al.*, 2014).

En otros estudios llevados a cabo por Borrego *et al.*, aplicaron la metodología ACP para encontrar el grado de asociación entre variables y cuáles de éstas contribuyeron para obtener un mayor rendimiento en siete genotipos de papa *Solanum tuberosum* L. Los resultados determinaron una elevada correlación entre rendimiento y altura de la planta, peso seco de hojas y contenido de clorofila (Borrego *et al.*, 1999).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de algunas variables del proceso de extracción de cálices de *Physalis peruviana* sobre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante *in vitro* del extracto obtenido.

2.2 Objetivos específicos

Evaluar el tiempo de percolación, la proporción etanol-agua y la presencia de luz en el proceso de extracción de los cálices de *P. peruviana* sobre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto.

Estandarizar en términos de contenido de fenoles totales el proceso de extracción de cálices de *P. peruviana*.

Determinar el efecto de factores de estrés y condiciones de almacenamiento definidas sobre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante *in vitro* de un extracto caracterizado de cálices de *P. peruviana*.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Equipos

- Equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia, Shimadzu LC-6AD con inyector automático detector con UV-vis con arreglo de diodos
- Espectrofotómetro UV BIORAD X-Mark Microplate
- Rotavapor Büchi R-114, R-110
- Balanza analítica Mettler Zurichtype H15
- Equipo para obtención de agua para CLAE Milli-Q, Millipore
- Baño de ultrasonido Elma, E 60 H Elmasonic

3.1.2 Reactivos

Solventes CLAE: Metanol (CLAE) de J.T Baker, Agua de calidad CLAE obtenida a través del sistema miliQ de Millipore Co[®].

Reactivos: Ácido acético (grado reactivo analítico) de Scharlau, reactivo de Folin-Ciocalteu 2N de Aldrich, ácido fosfórico, carbonato de sodio.

Solventes grado técnico: etanol 96%

3.1.3 Material vegetal

Los cálices de *Physalis peruviana* fueron recolectados en tres regiones de Colombia. Ipiales (Nariño), Granada (Cundinamarca) y Silvia (Cauca).

Ipiales (Nariño)

Ubicación: 0°54'0"N 77 41'40"O

Altitud: 2.898 m.s.n.m

Temperatura promedio: 12°C

Humedad relativa: 83%

Fecha de recolección: Enero 2013

Granada (Cundinamarca)

Ubicación: 04°31"N 74°21"O

Altitud: 2.450 m.s.n.m

Temperatura promedio: 14°C

Humedad relativa: 64%

Fecha de recolección: Marzo 2013

Silvia (Cauca)

Ubicación: 02°37"N 76°23"O

Altitud: 2.800 m.s.n.m

Temperatura promedio: 15°C

Humedad relativa: 74%

Fecha de recolección: Febrero 2013

Los cultivos de *Physalis peruviana* de las regiones de Granada (Cundinamarca) y Silvia (Cauca) presentaban condiciones agronómicas estandarizadas debido a la comercialización del fruto en forma masiva.

En el caso del cultivo de *Physalis peruviana* de la región de Ipiales (Nariño) las condiciones relacionadas con el cultivo no estaban estandarizadas ya que pertenecían a campesinos de la región quienes no comercializaban el fruto.

3.2 Metodología

3.2.1 Elaboración de los extractos de cálices de *Physalis peruviana*

Los cálices fueron cuidadosamente seleccionados eliminando aquellos dañados o en mal estado. Éstos fueron secados en horno con flujo de aire constante a 40°C durante 72 horas. Posteriormente, el material seco fue molido empleando un molino de cuchillas, obteniéndose así el polvo.

El material vegetal previamente humedecido con 40 mL de etanol al 96% fue sometido a extracción por percolación 10:150 (m/v), con variación de las siguientes condiciones:

El tiempo de extracción (48 – 72 hrs)

Luz (presencia – ausencia)

Solvente de extracción (Etanol 96 %, Etanol 70%)

Las condiciones de oscuridad fueron controladas cubriendo los percoladores con papel aluminio durante el tiempo de extracción.

Se realizaron 12 extractos por cada región, realizando el número de ensayos y la combinación de variables según el diseño experimental aplicado metodología de superficie de respuesta (RSM) como se observa en la (

Tabla 3-1).

Tabla 3-1: Matriz diseño experimental RSM

| No. Ensayo | Tiempo (horas) | Luz | Etanol (%) |
|------------|----------------|-----|------------|
| 1 | 72 | Sin | 70 |
| 2 | 48 | Con | 96 |
| 3 | 48 | Sin | 96 |
| 4 | 48 | Con | 70 |
| 5 | 72 | Con | 70 |
| 6 | 72 | Sin | 70 |
| 7 | 72 | Sin | 96 |
| 8 | 48 | Sin | 70 |
| 9 | 72 | Sin | 96 |
| 10 | 72 | Con | 96 |
| 11 | 48 | Sin | 70 |
| 12 | 48 | Con | 96 |

No se realizaron réplicas de cada ensayo, ya que el diseño experimental así lo permite por que incluye una adecuada cantidad de ensayos, dentro de los cuáles se repiten las combinaciones de variables, disminuyendo el efecto de posibles errores experimentales.

Los extractos obtenidos, se concentraron en rotaevaporador utilizando calentamiento suave (25°C - 30°C), el extracto obtenido se llevó a sequedad en baño maría a 40°C durante aproximadamente 5 horas.

3.2.2 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de los cálices de *Physalis peruviana*

3.2.2.1 Óxido nítrico

Éste método consiste en la determinación de NO[•] a través de la valoración del nitrito y nitrato, éstos pueden ser determinados mediante un ensayo espectrofotométrico basado en la reacción de Griess, ya que el óxido nítrico es generado por el nitropusiato de sodio (NaNP) en solución acuosa pH 7,4 (Franco, 2006).

Procedimiento:

Preparación de las muestras: 10 μL de los extractos etanólicos previamente disueltos fueron incubados por triplicado en tubos ependorff que contenían 1 mL de nitropusiato de sodio (NaNP) 5 mM durante 2 horas. Como patrones se utilizaron ácido gálico y rutina a una concentración de 100 μM cada uno.

Se tomaron alícuotas de 100 μL de los tubos que contenían las muestras y se colocaron en los pozos de la placa que contenía la curva de calibración. Como blanco se tomó 1 mL de PBS, como control de máxima liberación de NO se incluyó 1 mL de NaNP. Además 1 mL etanol, ya que fue el vehículo utilizado para disolver las muestras.

Posteriormente se adicionaron 100 μL del reactivo de Griess recién preparado a cada uno de los pozos de la placa y se agitó durante cinco minutos. Se leyó a una absorbancia de 550 nm en un espectrofotómetro UV para placas de 96 pozos.

Los resultados se expresan cómo % de captación de óxido nítrico mediante la ecuación (3.1).

$$\% \text{Captación de NO} \bullet = (100 - ((\text{Abs } m \div \text{Abs NPS}) \times 100)) \quad (3.1)$$

En la cual Abs m corresponde a la absorbancia de la muestra y Abs NPS corresponde a la absorbancia del grupo control (Nitropusiato de sodio) donde se encuentra la máxima producción de NO \bullet .

3.2.2.2 DPPH

Éste ensayo es comúnmente utilizado para la determinación de la actividad antioxidante de los compuestos puros. El radical DPPH \bullet es estable en solución, presentando una coloración púrpura que absorbe a 515 nm. Cuando DPPH \bullet acepta un átomo de hidrógeno de la molécula antioxidante presenta reducción de DPPH \bullet a DPPH $_2$ y el color púrpura cambia a amarillo con disminución de la absorbancia. El cambio del color es monitoreado por espectrofotometría (Kumar *et al*, 2012).

Procedimiento:

Curva de calibración: Se realizó una curva de calibración en una placa de 96 pozos a partir de una solución de ácido ascórbico con valores finales de 50, 40, 30, 20, 10, 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$, cada uno por triplicado.

Preparación de las muestras: Se prepararon soluciones de los extractos en metanol, posteriormente de cada uno se tomaron 70 μL y se colocaron por triplicado en los pozos de la placa que contenía la curva de calibración, con la adición de 30 μL de DPPH a una concentración de 33 $\mu\text{g} / \text{mL}$ en metanol.

Como blanco se tomaron 70 μL de las muestras por triplicado con la adición de 30 μL de metanol. Para el control negativo se agregaron 70 μL de metanol y 30 μL de la solución de DPPH.

Las placas se mantienen en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente, transcurrido ese tiempo se mide la absorbancia a 570 nm, estos valores son utilizados para determinar el % de DPPH remanente para cada una de las muestras evaluadas.

Los resultados se expresan cómo % de captación de DPPH• mediante la ecuación (3.2)

$$\% \text{ de captación de DPPH} = \left(\frac{\text{Abs } c - \text{Abs } m}{\text{Abs } c} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

En la cual Abs m corresponde a la absorbancia de la muestra y Abs c es la absorbancia del control (solución de DPPH en metanol sin muestra).

3.2.3 Evaluación de fenoles totales

La concentración de fenoles totales fue medida por espectrofotometría, teniendo como principio la reacción colorimétrica de óxido reducción, en este caso el agente oxidante es el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Curva de calibración: Se preparó una solución madre de ácido gálico (1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$), partiendo de ésta se realizó una curva de calibración con valores finales de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,57 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Preparación de las muestras: Se prepararon las muestras en etanol, de tal forma que se obtuvo una concentración final en las placas de 1 mg / mL.

Procedimiento: Se tomaron 100 μL de los extractos etanólicos diluidos y las soluciones de ácido gálico a las diferentes concentraciones. A cada una de las muestras tanto de extracto como de patrón se le adicionaron 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu 2N y se agitó. Posteriormente se agregaron 200 μL de una solución de carbonato de sodio Na_2CO_3 al 7,5%, finalmente se llevó a un volumen de 2 mL con agua destilada y se dejó

en incubación durante dos horas a temperatura ambiente. La absorbancia fue medida a 726 nm. Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico/ g de extracto (mg A.G. / g extracto).

3.2.4 Cuantificación de rutina por cromatografía líquida de alta eficiencia CLAE

Para la cuantificación del flavonoide rutina, presente en los extractos de cálices de *P. peruviana*, se empleó la metodología analítica por CLAE-DAD validada en el grupo de investigación (Toro R., 2014). Las condiciones cromatográficas se muestran a continuación:

Columna: Phenomenex C-18 (150 x 3,90 mm)

Flujo 1 mL / min

Volumen de inyección: 10 μ L

Longitud de onda: 340 nm

Tiempo de análisis: 30 minutos

Temperatura del horno: 35°C

Fase móvil: Solución A (Agua: Ácido acético 0,5 %), Solución B (Metanol: Ácido acético 0,5 %).

Programa de gradiente:

Tabla 3-2: Condiciones de gradiente de concentración de la fase móvil en CLAE

| Tiempo (min) | Concentración (%) Sln B | Concentración (%) Sln A |
|--------------|----------------------------|----------------------------|
| 0,01 | 10 | 90 |
| 5 | 50 | 50 |
| 10 | 50 | 50 |
| 15 | 80 | 30 |
| 25 | 80 | 30 |
| 26 | 10 | 90 |
| 30 | 10 | 90 |

Los solventes fueron previamente filtrados (0,45 μ m) utilizando bomba de vacío. Preparación de las muestras: Se pesó 1 mg de cada extracto en un tubo eppendorf, se adicionó 1 mL de metanol y se agitó hasta disolución. La solución se filtró utilizando una membrana Millipore de 0,45 μ m y se adicionó a un vial de 1,5 mL.

3.2.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se aplicaron las metodologías estadísticas análisis de componentes principales (ACP) y clasificación jerárquica (Cluster). Los datos estadísticos fueron procesados usando el programa estadístico "R".

El análisis en componentes principales se realizó con el fin de determinar la influencia de la región de origen de los cálices de *P. peruviana* y de las condiciones del proceso de extracción sobre las variables analizadas. Adicionalmente encontrar las relaciones entre éstas variables.

Las variables analizadas fueron: porcentaje de captación de DPPH, porcentaje de captación de óxido nítrico, contenido de fenoles totales, rendimiento y contenido de rutina. Estas variables son proyectadas en el primer plano factorial, lo que da la clave para su interpretación.

Los individuos en éste caso corresponden a los extractos obtenidos.

Los clusters son grupos que se conforman de manera tal que los elementos dentro de cada grupo sean los más homogéneos posibles y que, en cambio, los elementos de diferentes grupos sean lo más diferentes posibles, en éste caso los clusters se encuentran conformados por los extractos.

La clasificación jerárquica clustering, permite agrupar los extractos por medio de un "árbol" o "dendrograma", cuyas ramas terminales representan a cada uno de los individuos y el tronco es la clase conformada por todos los individuos. Un dendrograma representa una serie de particiones embebidas, en donde el número de clases decrece a medida que se aumenta la altura del árbol. Para obtener alguna clasificación particular se hace "un corte" en el árbol (Pardo y Cabargas, 2001).

El histograma o figura de valores propios, permite obtener valores propios ordenados de mayor a menor. Geométricamente este resultado corresponde a una rotación del sistema de ejes. El primer eje tiene la dirección más alargada de la nube o sea la de mayor dispersión, que corresponde a la dirección de mayor inercia. El plano conformado por los dos primeros nuevos ejes, denominados factoriales, es la mejor fotografía de la nube de puntos (Pardo y Cabargas, 2001).

3.2.6 Estandarización en términos de contenido de fenoles totales, actividad antioxidante y contenido de rutina el proceso de extracción cálices de *Physalis peruviana*

Empleando los factores de extracción óptimos, previamente determinados según el análisis estadístico ACP y clasificación jerárquica, se obtuvieron tres extractos partiendo de la misma materia prima, en éste caso se trabajó con el material vegetal de Granada, por ser el con el que se contaba en mayor contenido.

Las variables respuestas evaluadas en los extractos obtenidos con las mejores condiciones de extracción fueron contenido de rutina, fenoles totales y actividad antioxidante.

3.2.6.1 Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó por medio de la captación de óxido nítrico y DPPH• para lo cual se utilizaron las metodologías mencionadas en los numerales 3.2.2.1 y 3.2.2.2 respectivamente.

3.2.6.2 Fenoles totales

La determinación de fenoles totales se realizó teniendo en cuenta la metodología presentada anteriormente en el numeral 3.2.3.

3.2.6.3 Cuantificación de rutina por cromatografía de alta eficiencia

La cuantificación de rutina en los extractos sometidos a condiciones de almacenamiento se realizó según el procedimiento explicado en el numeral 3.2.4.

3.2.7 Evaluación del efecto de algunas condiciones de almacenamiento de los extractos de cálices de *Physalis peruviana*

Los extractos de cálices de *P. peruviana* de la región de Granada obtenidos con las mejores condiciones de extracción, previamente determinadas, fueron sometidos a dos condiciones de almacenamiento diferentes (Tabla 3-3).

Tabla 3-3: Variables del estudio de condiciones de almacenamiento

| Condiciones de almacenamiento | Cantidad de muestras | Estudio (semanas) | Variables respuesta evaluadas |
|--|----------------------|-------------------|--|
| Condiciones ambientales (14 ± 8 °C) (72 % HR) | 3 viales | 4 semanas | Fenoles totales Captación DPPH• Captación de NO Contenido de rutina |
| Cámara de almacenamiento (30 ± 2 °C) (65 ± 5 % HR) | 3 viales | 4 semanas | Fenoles totales Captación DPPH• Captación NO Contenido de rutina |

Las condiciones de almacenamiento descritas en la Tabla 3-3 fueron seleccionadas con el fin de simular la situación en la que serían almacenados los extractos, teniendo en cuenta las condiciones climáticas reinantes, la zona climática IV es la zona dentro de la cual se encuentra Colombia y los demás países con clima tropical (Ministerio de la protección social, 2007).

Los extractos se envasaron en viales de vidrio de 20 mL con tapa plástica, se taparon e identificaron con fecha. Tanto los viales colocados en condiciones ambientales, como los que fueron ubicados en la cámara se protegieron de la luz con papel aluminio. Los análisis se realizaron por triplicado al inicio y al final del estudio.

Las variables respuestas evaluadas en el estudio de los extractos de cálices de *P. peruviana* sometidos a condiciones de almacenamiento fueron contenido de rutina, de fenoles totales y actividad antioxidante.

3.2.7.1 Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó por medio de la captación de óxido nítrico y DPPH•, se llevaron a cabo las metodologías mencionadas en los numerales 3.2.2.1 y 3.2.2.2 respectivamente.

3.2.7.2 Fenoles totales

La determinación de fenoles totales se realizó teniendo en cuenta la metodología presentada anteriormente en el numeral 3.2.3.

3.2.7.3 Cuantificación de rutina por cromatografía de alta eficiencia

La cuantificación de rutina en los extractos sometidos a condiciones de almacenamiento se realizó según el procedimiento explicado en el numeral 3.2.4.

3.2.8 Evaluación de la estabilidad del extracto de cálices *P. peruviana* bajo condiciones de estrés

3.2.8.1 Hidrólisis

Las muestras fueron sometidas a hidrólisis bajo condiciones alcalinas y ácidas con variación tanto en la concentración de los reactivos, como en la temperatura. Los ensayos realizados se muestran en la Tabla 3-4.

Tabla 3-4: Condiciones de hidrólisis

| Tipo de hidrólisis | Reactivo utilizado | Concentración del reactivo | Temperatura | Tiempo | Variables respuestas analizadas |
|--------------------|--------------------|----------------------------|----------------|---------|--|
| Ácida | HCl | 0,1 N | 100 °C reflujo | 8 horas | Fenoles totales Captación DPPH• Captación de NO Contenido de rutina |
| | | 0,01N | 40 °C | 8 horas | |
| | | 0,01N | 25 °C | 2 horas | |
| Alcalina | NaOH | 0,1 N | 100 °C reflujo | 8 horas | Fenoles totales Captación DPPH• Captación de NO Contenido de rutina |
| | | 0,01N | 40 °C | 8 horas | |
| | | 0,01N | 25 °C | 2 horas | |

Para los ensayos de fenoles totales y captación de óxido nítrico se pesó 1g de extracto, posteriormente se llevó a un volumen de 10 mL con el reactivo correspondiente para llevar a cabo la hidrólisis. Pasado el tiempo de la reacción se tomaron alícuotas de 1,0 mL de las soluciones las cuales se neutralizaron y posteriormente se llevaron a un volumen final de 5,0 mL.

Para el ensayo de captación de DPPH se pesaron 3 g de extracto, posteriormente se llevaron a un volumen de 10 mL con el reactivo correspondiente para llevar a cabo la hidrólisis. Pasado el tiempo de la reacción se tomaron alícuotas de 1,0 mL de las soluciones las cuales se neutralizaron y posteriormente se llevaron a un volumen final de 5,0 mL.

Para el ensayo de cuantificación de rutina se pesaron 0,05 g de extracto, posteriormente se llevaron a un volumen de 10 mL con el reactivo correspondiente para llevar a cabo la hidrólisis. Pasado el tiempo de la reacción se tomaron alícuotas de 1,0 mL de las soluciones las cuales se neutralizaron y posteriormente se llevaron a un volumen final de 5,0 mL.

Se evaluaron las variables respuesta captación de óxido nítrico, captación de DPPH•, contenido de fenoles totales y contenido de rutina siguiendo las metodologías descritas en los numerales 3.2.2.1, 3.2.2.2, 3.2.3 y 3.2.4 respectivamente.

3.2.8.2 Oxidación

Los extractos fueron sometidos a oxidación con peróxido de hidrógeno, la metodología utilizada fue basada en la guía para ensayos de estrés de Singh y Bakshi, (2000).

Para los ensayos de fenoles totales y captación de óxido nítrico se pesó 1g de extracto, posteriormente se llevó a un volumen de 10 mL con peróxido de hidrógeno 1% y se dejó en incubación durante 3 horas a temperatura ambiente, luego se tomó una alícuota de 1,0 mL de la solución y posteriormente se llevó a un volumen final de 5,0 mL.

Para el ensayo de captación de DPPH se pesaron 3 g de extracto, posteriormente se llevaron a un volumen de 10 mL con peróxido de hidrógeno 1% y se dejó en incubación durante 3 horas a temperatura ambiente luego se tomó una alícuota de 1,0 mL de las soluciones y posteriormente se llevó a un volumen final de 5,0 mL.

Para el ensayo de cuantificación de rutina se pesaron 0,05 g de extracto, posteriormente se llevaron a un volumen de 10 mL, con peróxido de hidrógeno 1% y se dejó en incubación durante 3 horas a temperatura ambiente, luego se tomó una alícuota de 1,0 mL de la solución y posteriormente se llevó a un volumen final de 5,0 mL.

Se evaluaron las variables respuesta de captación de óxido nítrico, captación de DPPH•, fenoles totales y contenido de rutina, siguiendo las metodologías descritas en los numerales 3.2.2.1, 3.2.2.2, 3.2.3 y 3.2.4 respectivamente.

3.2.9 Análisis estadístico de la estandarización del proceso de extracción, condiciones de almacenamiento y ensayos de estrés

Para los estudios de las condiciones de almacenamiento y condiciones de estrés por hidrólisis, los resultados fueron expresados como la media aritmética de los valores \pm la desviación estándar y se analizaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de Dunnet o Tukey *post hoc* para comparaciones múltiples. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

Para las condiciones de estrés por oxidación se realizó el análisis estadístico *t* test. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

El procesamiento de los datos se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico comercial GradPad Prism®.

4. Resultados y discusión

4.1 Extracción del material vegetal

Durante el proceso de extracción se obtuvieron 12 extractos de cada una de las regiones. Los rendimientos de cada extracción con respecto al total del material vegetal utilizado se aprecian en la Tabla 4-1.

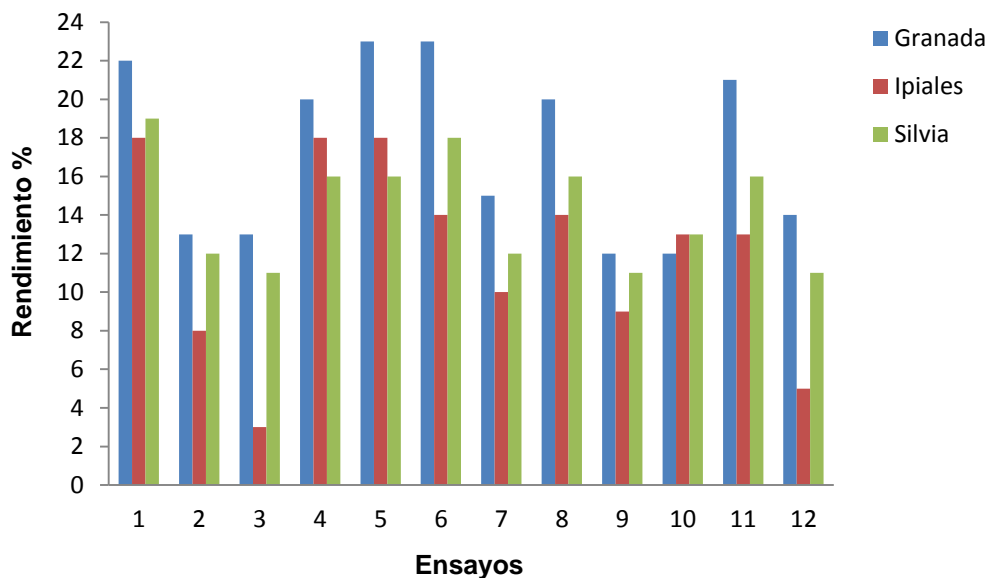
Tabla 4-1: Extractos obtenidos de los cálices de *Physalis peruviana* con sus respectivos rendimientos

| Extracto | Ipiales | | Silvia | | Granada | |
|----------|-------------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|
| | Peso del material vegetal (g) | Rendimiento (%) | Peso del material vegetal (g) | Rendimiento (%) | Peso del material vegetal (g) | Rendimiento (%) |
| 1 | 10,2 | 18 | 10,7 | 19 | 10,4 | 22 |
| 2 | 10,1 | 8 | 10,5 | 12 | 10,1 | 13 |
| 3 | 10,4 | 3 | 10,3 | 11 | 10,0 | 13 |
| 4 | 10,5 | 18 | 10,3 | 16 | 10,0 | 20 |
| 5 | 10,0 | 18 | 10,2 | 16 | 10,4 | 23 |
| 6 | 10,2 | 14 | 10,3 | 18 | 10,3 | 23 |
| 7 | 10,3 | 10 | 10,1 | 12 | 10,6 | 15 |
| 8 | 10,2 | 14 | 10,6 | 16 | 10,2 | 20 |
| 9 | 10,0 | 9 | 10,5 | 11 | 10,0 | 12 |
| 10 | 10,1 | 13 | 10,4 | 13 | 10,1 | 12 |
| 11 | 10,3 | 13 | 10,4 | 16 | 10,2 | 21 |
| 12 | 10,0 | 5 | 10,2 | 11 | 10,2 | 14 |

El rendimiento tuvo variación entre regiones, siendo ligeramente mayores los rendimientos de los extractos elaborados con el material vegetal de Granada y menores, en casi todos los casos, los rendimientos de los cálices de la región de Ipiales. Los extractos 5 y 6 de la región de Granada son los que presentan los mayores rendimientos (23%) mientras que el extracto 3 de la región de Ipiales es el que presenta el menor rendimiento (3%) (Tabla 4-1). Sin embargo, en términos de tendencia el comportamiento de ésta variable es similar en las tres regiones, ya que independientemente de la región

el rendimiento más alto se presenta para los extractos 5 y 6 y los más bajos para los extractos 3 y 12 (Figura 4-1).

Figura 4-1: Rendimiento de los extractos de cálices de *Physalis peruviana* de las tres regiones



Los mayores rendimientos en las tres regiones se obtuvieron para los ensayos 1, 4, 5, 6, 8 y 11 en los cuáles el proceso de extracción se llevó a cabo con etanol al 70%, mientras que los resultados más bajos se observaron en los ensayos 2, 3, 7, 9, 10 y 12 en los cuales se utilizó etanol al 96% como solvente de extracción. Aparentemente el tiempo de percolación y la presencia de luz no fueron factores determinantes en dicho resultados (Figura 4-1).

La elección del solvente de extracción es un factor determinante en los procesos de extracción, los resultados obtenidos se pueden explicar por la polaridad del etanol al 70% la cual puede ser más cercana a la polaridad de los compuestos presentes en los extractos de cálices de *P. peruviana*. Esto permite que mayor cantidad de dichos compuestos se disuelvan, además el agua podría aumentar la difusión de los polifenoles extraíbles a través de los tejidos de la planta. El efecto de hinchamiento que genera el agua en los tejidos vegetales, aumentaría la distancia entre las fibras de celulosa de los

mismos, provocando una expansión del material lo cual aumenta la superficie de contacto entre el soluto y el disolvente (Chua, 2013).

Los datos obtenidos son congruentes con estudios llevados a cabo por Zuorroy y Lavecchia, quienes realizaron investigaciones con el fin de determinar la mezcla etanol-agua óptima en el proceso de extracción de café para extraer mejor los compuestos fenólicos. En éste trabajo se concluyó que la composición del disolvente tenía una fuerte influencia en el rendimiento del proceso y que etanol al 60% fue la mejor opción comparado con etanol puro y agua (Zuorro y Lavecchia, 2013).

4.2 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de cálices de *Physalis peruviana*

4.2.1 Óxido nítrico

Los datos obtenidos se expresan como porcentaje de captación del radical NO•. Los resultados se muestran en la Tabla 4-2.

Tabla 4-2: Captación de óxido nítrico de los extractos de cálices de *Physalis peruviana* de las tres regiones

| Ensayo | Ipiales | Silvia | Granada |
|-----------|---------------|---------------|---------------|
| | Captación (%) | Captación (%) | Captación (%) |
| 1 | 34,2 ± 1,1 | 25,8 ± 2,7 | 47,7 ± 1,5 |
| 2 | 56,9 ± 3,8 | 21,8 ± 2,0 | 23,2 ± 0,6 |
| 3 | 17,8 ± 0,5 | 22,7 ± 0,7 | 21,4 ± 1,6 |
| 4 | 21,4 ± 2,7 | 29,2 ± 1,3 | 27,9 ± 1,7 |
| 5 | 57,7 ± 1,1 | 40,3 ± 2,1 | 46,9 ± 0,4 |
| 6 | 61,5 ± 0,5 | 39,5 ± 1,4 | 51,4 ± 1,4 |
| 7 | 44,3 ± 0,9 | 22,3 ± 0,4 | 58,4 ± 1,3 |
| 8 | 33,2 ± 4,0 | 29,4 ± 0,8 | 37,7 ± 1,7 |
| 9 | 61,1 ± 3,8 | 27,5 ± 2,0 | 63,3 ± 1,3 |
| 10 | 55,7 ± 2,7 | 34,9 ± 0,3 | 68,7 ± 1,1 |
| 11 | 36,5 ± 1,8 | 22,1 ± 1,7 | 7,1 ± 1,7 |
| 12 | 26,8 ± 2,3 | 39,3 ± 1,5 | 9,2 ± 0,1 |
| Rutina | 62,7 ± 0,1 | | |
| Ac.Gálico | 77,1 ± 1,9 | | |

Los datos son expresados como la media ± D.E. (n=3)

Para llevar a cabo el análisis se realizó la comparación entre los extractos obtenidos de cálices de *P. peruviana* y el grupo control (nitroprusiato de sodio), en el cual se encuentra la máxima producción de NO•.

El ácido gálico y rutina a 100 µM muestran un importante efecto captador del radical NO•, con un porcentaje superior al 60%.

Para los extractos de cálices de *P. peruviana*, se observan porcentajes de captación alrededor de 40%, destacándose el ensayo 10 de la región de Granada con 68,71%.

En un estudio realizado por Franco, el porcentaje de captación de óxido nítrico de fracciones y compuestos de cálices de *P. peruviana* a 100 µg / mL presentó un rango de captación entre 20 y 30%. Aunque la concentración del presente estudio fue 125 µg / mL la cual es cercana a la empleada en la investigación de Franco, no es posible hacer una comparación directa ya que los tipos de extractos son bastante diferentes en polaridad, los extractos evaluados por Franco eran no polares (extractos en éter de petróleo mientras que los obtenidos en este estudio tienen características más polares. (Franco, 2006).

Rop *et al.*, también evaluaron la captación de óxido nítrico de extractos de *P. peruviana* pero el análisis se llevó a cabo con los frutos. La actividad de captación de óxido nítrico de éstos extractos etanólicos fue de 35,02%, valores cercanos a los obtenidos en el presente estudio, aunque provienen de diferentes partes de la planta (Rop *et al.*, 2012).

4.2.2 DPPH

Los datos obtenidos se expresan cómo porcentaje de captación del radical DPPH•. Los resultados se muestran en la Tabla 4-3.

Tabla 4-3: Captación del radical DPPH• por los extractos de cálices de *Physalis peruviana* de las tres regiones evaluadas

| Extracto | Captación de DPPH• (%) | | |
|----------------------|------------------------|------------|------------|
| | Ipiales | Silvia | Granada |
| 1 | 84,6 ± 0,7 | 27,0 ± 1,6 | 45,7 ± 2,8 |
| 2 | 66,0 ± 2,6 | 28,4 ± 0,3 | 30,0 ± 2,5 |
| 3 | 60,0 ± 0,6 | 26,3 ± 2,7 | 29,8 ± 1,5 |
| 4 | 65,5 ± 1,7 | 46,1 ± 0,6 | 60,2 ± 1,2 |
| 5 | 74,9 ± 5,0 | 60,4 ± 3,4 | 45,8 ± 2,0 |
| 6 | 36,8 ± 2,0 | 42,2 ± 1,6 | 36,8 ± 3,7 |
| 7 | 58,2 ± 0,1 | 24,9 ± 3,5 | 30,1 ± 1,5 |
| 8 | 84,9 ± 0,7 | 57,3 ± 2,9 | 44,9 ± 0,8 |
| 9 | 54,5 ± 2,2 | 25,0 ± 1,7 | 26,7 ± 0,5 |
| 10 | 50,9 ± 1,8 | 26,7 ± 1,2 | 25,4 ± 0,5 |
| 11 | 89,1 ± 0,4 | 51,0 ± 0,1 | 46,4 ± 3,0 |
| 12 | 55,3 ± 1,7 | 26,5 ± 0,5 | 32,1 ± 2,0 |
| Ac. Ascórbico | 82,3 ± 0,56 | | |

Los datos son expresados como la media ± D.E. (n=3)

En la Tabla 4-3 se puede observar que los extractos de cálices de *P. peruviana* presentaron buenos porcentajes de captación del radical DPPH•. El ácido ascórbico con una concentración 40 µg / mL presentó un porcentaje de captación del radical DPPH• de 82,3 ± 0,56.

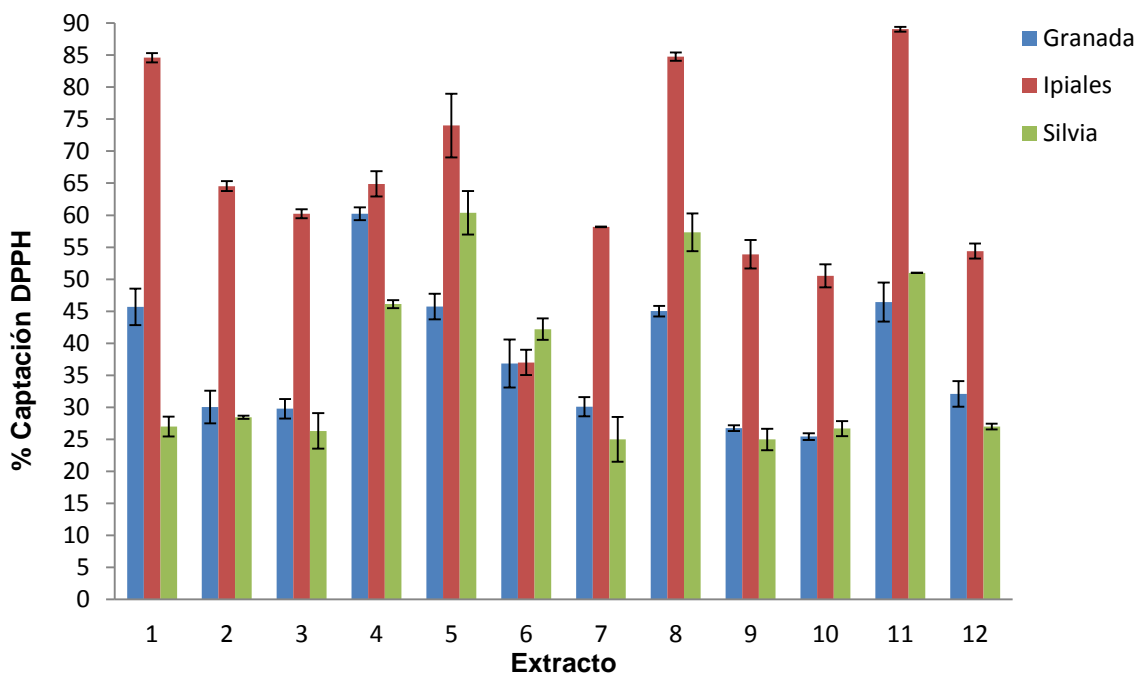
El extracto que tuvo mayor captación fue el 11 de la región de Ipiales 89,06 ± 0,38%, seguido por el extracto 8 con 84,87 ± 0,66 % también de la región de Ipiales. En las tres regiones se observa que los porcentajes de captación más altos se obtuvieron en los ensayos con el solvente de extracción etanol al 70%, mientras que los otros factores durante el proceso de extracción no fueron determinantes.

En un estudio realizado por Vilaplana *et al.*, se llevó a cabo la evaluación de la actividad antioxidante de los cálices y frutos de *P. peruviana* por medio del ensayo de captación de DPPH•. Los cálices de *P. peruviana* presentaron resultados de 4,94 ± 0,05 mmol Trolox / 100 g, mientras que los frutos 1,60 ± 0,06 mmol Trolox / 100 g. La investigación

determinó que los cálices de *P. peruviana* poseen buena actividad antioxidante, la cual fue mayor que en los frutos (Vilaplana *et al.*, 2014).

En la Figura 4-2 se presentan los resultados de porcentaje de captación de DPPH• de los extractos analizados en las tres regiones.

Figura 4-2: Captación del radical DPPH• por los extractos de cálices de *Physalis peruviana* en las tres regiones evaluadas



Los datos son expresados como la media \pm D.E. (n=3)

En la Figura 4-2 se puede observar un comportamiento similar para las tres regiones, siendo el solvente de extracción, etanol al 70%, el factor clave para obtener los resultados más altos.

Los resultados obtenidos son congruentes con estudios llevados a cabo por Soto *et al.*, quienes determinaron la influencia del solvente de extracción sobre la actividad antioxidante de las hojas de *Peumus boldus*, para lo cual aplicaron los ensayos de DPPH, FRAP, y ORAC. Los resultados sugieren que las mezclas hidroalcohólicas agua/etanol y agua/metanol (50:50) proporcionan una mejor extracción de los compuestos antioxidantes presentes en dicha planta y por lo tanto mejoran la actividad

antioxidante con respecto al metanol y etanol puros. Éstos resultados fueron atribuidos a la polaridad obtenida con las mezclas hidroalcohólicas (Soto *et al.*, 2013).

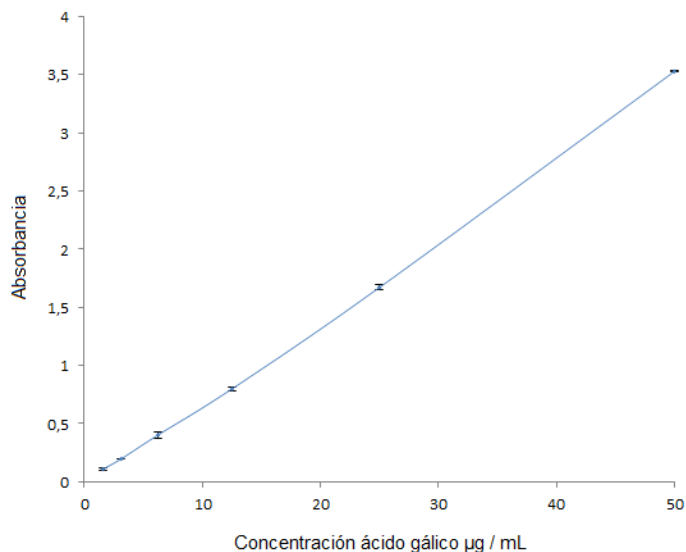
4.3 Cuantificación de fenoles totales

La concentración de fenoles totales fue medida por espectrofotometría, basándose en una reacción de óxido reducción. Usando el ácido gálico para la elaboración de la curva de calibración se determinó el contenido de fenoles totales por la interpolación de la misma, los resultados se expresaron como los equivalentes de ácido gálico (GAE, mg de ácido gálico/ g de extracto), cada análisis se llevó a cabo por triplicado. La curva de calibración presentó un $R^2 = 0,9991$. La ecuación obtenida de la curva de calibración se muestra a continuación (Ecuación 4.1).

$$Y = 0,0707X - 0,0414 \quad (4.1)$$

En la Figura 4-3 se observa la gráfica de la curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.

Figura 4-3: Representación gráfica de la curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales



Los datos son expresados como la media \pm D.E. (n=3)

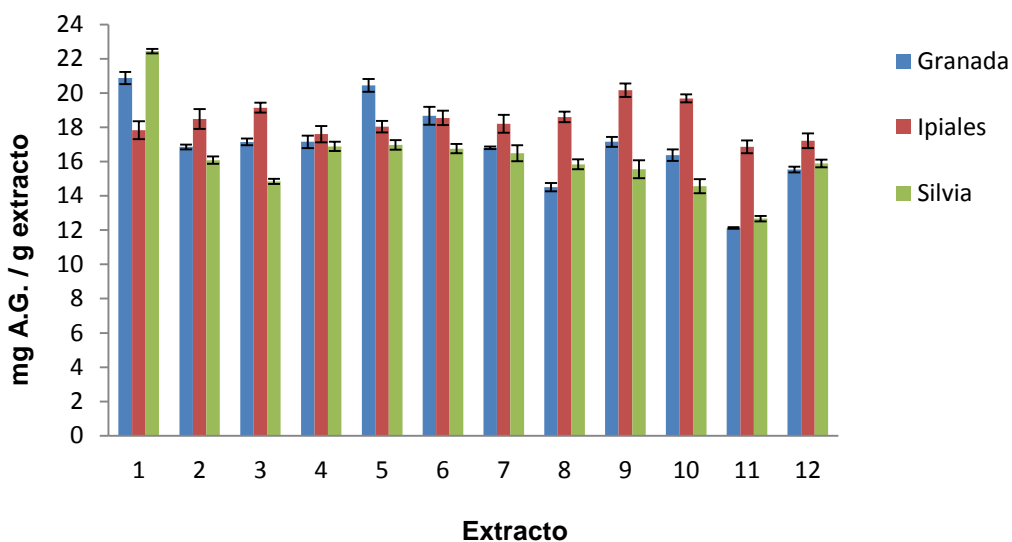
El contenido de fenoles totales para los extractos de cálices de *P. peruviana* se muestra en la Tabla 4-4 y en la Figura 4-4.

Tabla 4-4: Fenoles totales de los extractos de cálices de *Physalis peruviana* de las tres regiones evaluadas

| Extracto | Ipiales | Silvia | Granada |
|----------|--------------|--------------|-------------|
| | mg A.G. / g | mg A.G. /g | mg A.G. /g |
| 1 | 17,83 ±0,52 | 22,44 ±0,13 | 20,86± 0,36 |
| 2 | 18,44 ± 0,53 | 16,08 ±0,22 | 16,85± 0,15 |
| 3 | 19,11 ± 0,27 | 14,85 ±0,15 | 17,14± 0,20 |
| 4 | 17,62 ± 0,43 | 16,88 ±0,27 | 17,15± 0,37 |
| 5 | 18,11 ± 0,34 | 16,96 ±0,28 | 20,44±0,37 |
| 6 | 18,60 ± 0,42 | 16,75 ±0,28 | 18,66±0,57 |
| 7 | 18,42 ± 0,53 | 16,49 ±0,47 | 16,80±0,08 |
| 8 | 18,60 ±0,31 | 15,84 ± 0,28 | 14,51± 0,24 |
| 9 | 20,16 ± 0,39 | 15,55 ±0,52 | 17,15 ±0,29 |
| 10 | 19,68 ± 0,24 | 14,57 ±0,41 | 16,37 ±0,34 |
| 11 | 16,74 ±0,43 | 12,67 ±0,16 | 11,99± 0,04 |
| 12 | 17,06 ±0,54 | 15,89 ±0,23 | 15,52± 0,17 |

Los datos son expresados como la media ± D.E. (n=3)

Figura 4-4: Contenido de fenoles totales de los extractos de cálices de *Physalis peruviana* de las tres regiones



Los datos son expresados como la media ± D.E. (n=3)

El contenido de fenoles totales encontrado en los extractos tuvo una variación desde $11,99 \pm 0,04$ mg A.G. /g para el extracto 11 de la región de Granada hasta $22,44 \pm 0,13$ mg A.G. /g para extracto 1 de la región de Silvia (Tabla 4-4).

Estudios previos realizados por Vasco *et al.*, evaluaron el contenido de fenoles totales de 27 frutas cultivadas en Ecuador. Los resultados oscilaron entre 26 y 2100 mg A.G. / 100 g de peso fresco. *P. peruviana* fue clasificada en el grupo de frutas con un contenido < 100 mg A.G. / 100 g de peso fresco, el cual fue bajo con respecto a las otras frutas evaluadas (Vasco *et al.*, 2008).

Wu y colaboradores llevaron a cabo la cuantificación de fenoles totales en hojas de *P. peruviana*. Los resultados fueron variables y dependientes del método de extracción aplicado. Encontraron contenidos desde 19,64 mg A.G. / g extracto para el material vegetal cuya extracción se realizó con agua hirviendo, 88,81 mg A.G. / g para el proceso llevado a cabo con etanol al 95% hasta 90,80 mg A.G. / g extracto para la extracción con CO₂ supercrítico (Wu *et al.*, 2006).

Estos estudios se relacionan con los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que el solvente de extracción cumple un papel importante para la obtención de los mejores resultados, el dato más alto fue el extracto 1 de la región de Granada, en el cual el solvente de extracción fue etanol al 70%. La polaridad del solvente puede ser uno de los factores claves para lograr extraer mayor cantidad de fenoles totales.

En estudios realizados por Soto *et al.*, las mezclas hidroalcohólicas agua / metanol y agua / etanol (50:50) proporcionaron el mayor contenido de fenoles totales en la extracción de hojas de *Peumus boldus* con respecto a los solventes puros, dentro de los compuestos presentes en *Peumus boldus* se encuentran glicósidos de quercetina, derivados de kaempferol y ácidos fenólicos (Soto *et al.*, 2013).

Trabelsi *et al.*, determinaron que la mezcla de metanol, etanol o acetona y agua en el proceso de extracción de las hojas de *Limonias trummono petalum*, permite extraer los compuestos fenólicos 10 veces más que los solventes puros (Trabelsi *et al.*, 2010).

Respecto al tiempo de percolación, se puede observar en la Figura 4-4 que los ensayos 1, 5 y 9 tuvieron los mejores resultados, con un tiempo de percolación de 72 horas,

mientras que los ensayos 3, 8 y 11 en los cuáles el tiempo de percolación fue de 48 horas, los resultados de fenoles totales fueron más bajos.

Estudios llevados a cabo por Mussatto *et al.*, sobre la optimización del proceso de extracción de la planta de café determinaron que el tiempo de extracción tuvo influencia sobre el contenido de fenoles totales, el estudio se realizó con tiempos de 30 – 90 minutos y los mejores resultados en cuanto a fenoles totales se obtuvieron con 90 minutos (Mussatto *et al.*, 2011).

El contenido de fenoles totales puede presentar variaciones en los resultados ya que depende de diversos factores, los métodos y las condiciones de extracción tienen una influencia importante sobre ésta variable.

4.4 Cuantificación de rutina por cromatografía líquida de alta eficiencia

Los perfiles de los extractos obtenidos de los cálices de *P. peruviana* se llevaron a cabo utilizando las condiciones cromatográficas descritas en la metodología (3.2.4). Para el análisis de los mismos se tuvieron en cuenta los tiempos de retención y la absorción a la longitud de onda de 340 nm.

En la Figura 4-5 se presenta uno de los cromatogramas obtenidos para los extractos de cálices de *P. peruviana*, bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Se puede observar que predomina el pico correspondiente a rutina con tiempo de retención entre 10,0 – 11,0 min. Este tiempo de retención es comparable con el del patrón de rutina, (Figura 4-6), ambos ensayos se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones cromatográficas.

Figura 4-5: Cromatograma obtenido para los extractos de cálices de *Physalis peruviana* a 340 nm, fase móvil Solución A (Agua: Ácido acético 0,5 %), Solución B (Metanol: Ácido acético 0,5 %), columna C – 18

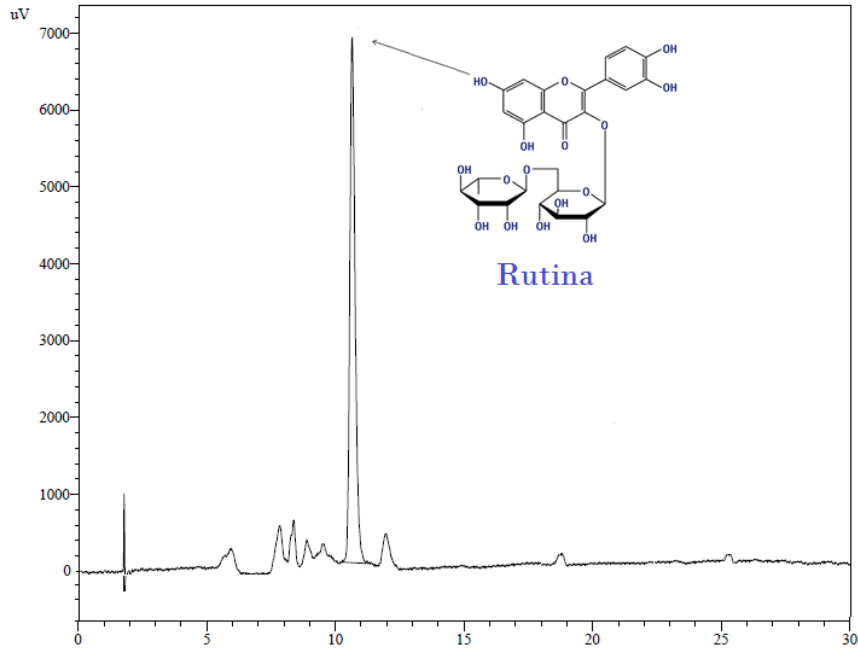
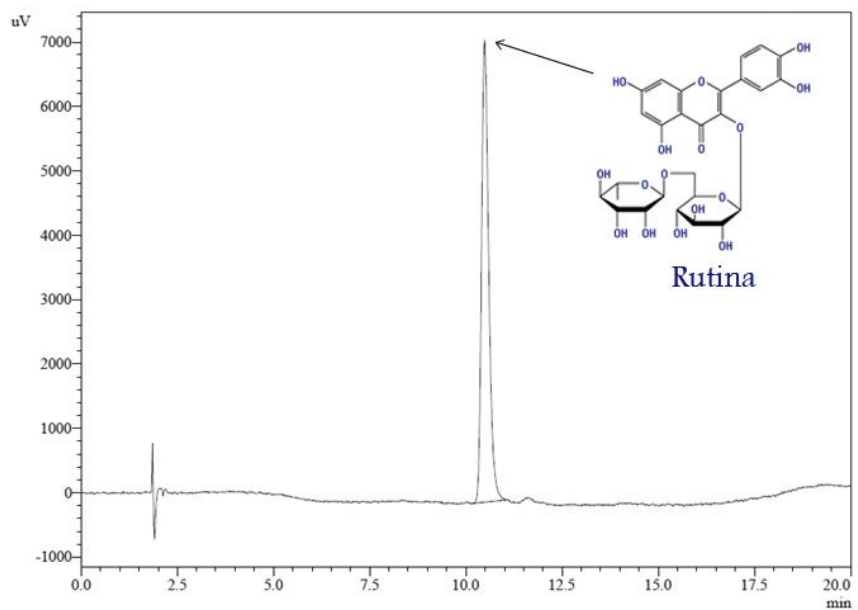


Figura 4-6: Cromatograma obtenido para el estándar de rutina a 340 nm, fase móvil Solución A (Agua: Ácido acético 0,5 %), Solución B (Metanol: Ácido acético 0,5 %), columna C – 18



Para la cuantificación de rutina en los extractos de cálices de *P. peruviana* se usó la ecuación de la curva de calibración, obtenida en el proceso de validación de la metodología analítica (Ecuación 4.2).

$$Y = 17374 X + 3223 \quad (4.2)$$

Los resultados obtenidos en la cuantificación rutinaria para los extractos se presenta en Tabla 4-5.

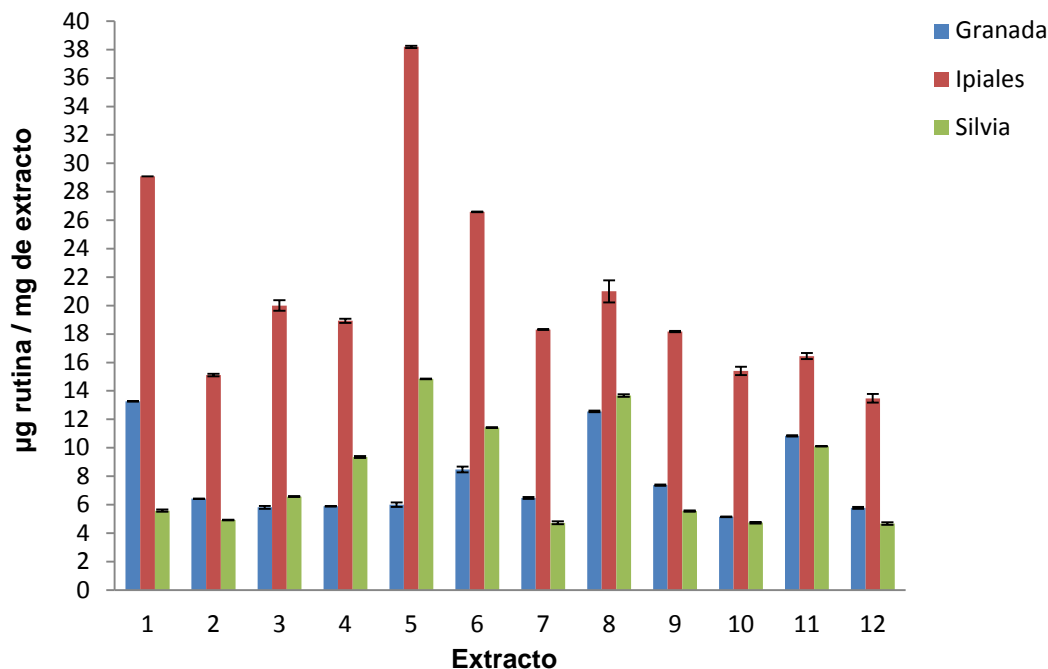
Tabla 4-5: Contenido de rutina de los extractos de cálices de *Physalis peruviana* de las tres regiones, expresado en μg de rutina / mg de extracto

| Extracto | μg rutina / mg extracto | | |
|----------|------------------------------------|------------------|------------------|
| | Ipiales | Silvia | Granada |
| 1 | 29,09 \pm 0,00 | 5,52 \pm 0,07 | 13,25 \pm 0,02 |
| 2 | 15,18 \pm 0,09 | 4,89 \pm 0,02 | 6,42 \pm 0,00 |
| 3 | 19,91 \pm 0,44 | 6,59 \pm 0,02 | 5,74 \pm 0,10 |
| 4 | 19,04 \pm 0,15 | 9,30 \pm 0,06 | 5,88 \pm 0,02 |
| 5 | 38,24 \pm 0,08 | 14,85 \pm 0,03 | 6,42 \pm 0,15 |
| 6 | 26,58 \pm 0,02 | 11,43 \pm 0,02 | 8,33 \pm 0,21 |
| 7 | 18,29 \pm 0,04 | 4,79 \pm 0,09 | 6,52 \pm 0,07 |
| 8 | 21,03 \pm 0,77 | 13,73 \pm 0,09 | 13,00 \pm 0,05 |
| 9 | 18,15 \pm 0,04 | 5,57 \pm 0,04 | 7,41 \pm 0,05 |
| 10 | 15,19 \pm 0,29 | 4,69 \pm 0,06 | 5,12 \pm 0,03 |
| 11 | 16,30 \pm 0,21 | 10,09 \pm 0,02 | 10,81 \pm 0,05 |
| 12 | 13,27 \pm 0,29 | 4,61 \pm 0,09 | 5,72 \pm 0,07 |

Los datos son expresados como la media \pm D.E. (n=3)

Como se observa en la Tabla 4-5, los extractos 1 y 5 de la región de Ipiales presentaron el mayor contenido de rutina. En todas las regiones se puede observar que los mejores resultados se obtuvieron con etanol al 70% mientras que las otras variables no fueron determinantes, el comportamiento en las tres regiones se presenta en la Figura 4-7.

Figura 4-7: Contenido de rutina de los extractos de cálices de *Physalis peruviana* de las tres regiones evaluadas



Los datos son expresados como la media \pm D.E. (n=3)

Los resultados obtenidos se pueden explicar por la polaridad del etanol al 70%, la cual es más cercana a la polaridad de rutina, esto permite extraer mejor éste compuesto que con etanol al 96%.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Xie *et al.*, quienes determinaron que el solvente de extracción es el factor clave del éxito en la extracción de rutina, de acuerdo al principio “lo similar disuelve lo similar”. En este estudio fueron los solventes con mayor polaridad los cuales lograron los mejores resultados (Xie *et al.*, 2011).

Estudios realizados por Kim *et al.*, establecieron que usando de etanol como solvente de extracción a una concentración de 50 y 60%, se logró obtener una mayor contenido de rutina en la planta entera de *Fagopyrum esculentum Moench*, comparado con etanol más concentrado y con otros solventes (Kim *et al.*, 2005).

El tiempo de percolación también tuvo influencia en los resultados, debido a que el contenido más alto de rutina obtenido en las tres regiones se logró con un tiempo de percolación de 72 horas, (Tabla 4-5). Los ciclos de extracción también cumplen un papel importante en éste proceso; en el presente estudio se llevaron a cabo 2 ciclos para el tiempo de extracción de 48 horas y tres ciclos para el de 72 horas. Estudios llevados a cabo por Yang y Zhang., en la optimización del proceso de extracción por ultrasonido de rutina y quercetina de los tallos de *Euonymus alatus* (Thunb.), demuestran que el rendimiento en la extracción de rutina es altamente dependiente del tiempo, siendo de 90 minutos el tiempo con el cual se obtuvieron los mejores rendimientos, comparado con 30 minutos. El estudio sugiere que la extracción de rutina con tres cambios de solvente durante 90 minutos permitió obtener mejores resultados que un tiempo fijo de 90 minutos sin cambio de solvente, concluyendo que las condiciones óptimas para la extracción de rutina de los tallos de *Euonymus alatus* (Thunb) fueron: etanol al 70%, tiempo de extracción de 30 x 3 minutos y una proporción solvente/muestra 40/1 (v/m) (Yang y Zhang., 2008).

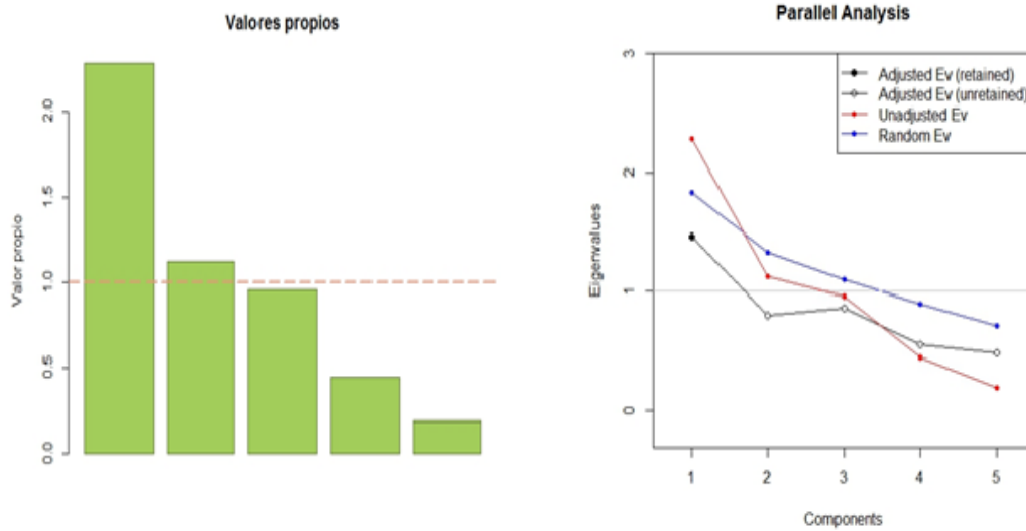
4.5 Análisis estadístico de las condiciones de extracción

4.5.1 Análisis estadístico de las tres regiones

Los datos de las tres regiones se analizaron por medio de la metodología análisis en componentes principales (ACP), con el fin de evaluar la influencia de la región de origen del material vegetal sobre las variables de respuesta analizadas.

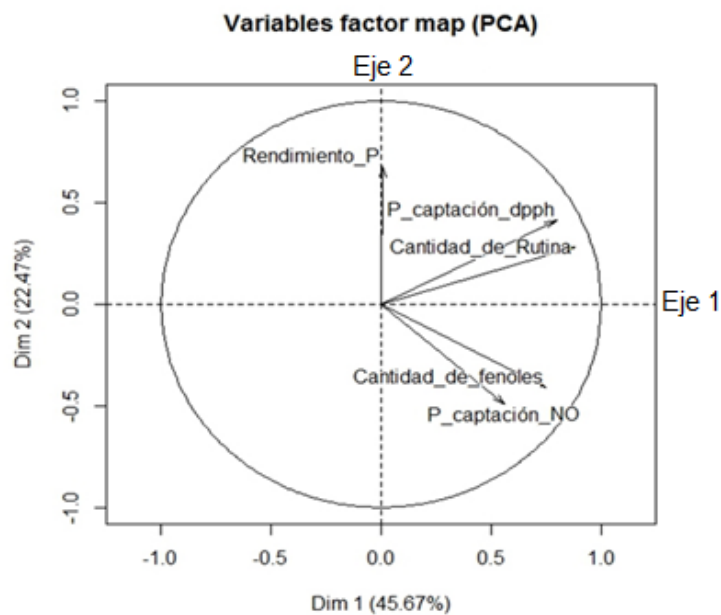
El primer paso para llevar a cabo el análisis es determinar cuántos ejes formarán el plano factorial de trabajo, lo cual está soportado en el histograma de valores propios. En éste caso se decidió utilizar los dos primeros ejes ya que son mayores que 1, lo cual indica que éstos dos acumulan la mayor inercia y por lo tanto permiten una buena representación geométrica, (Figura 4-8).

Figura 4-8: Histograma de valores propios de las tres regiones



Teniendo en cuenta los ejes a retener, se realizó la proyección de las variables sobre el círculo de correlaciones (primer plano factorial de las variables del ACP), Figura 4-9.

Figura 4-9: Círculo de correlaciones de todas las regiones (primer plano factorial de las variables del ACP)



En la **Figura 4-9** se observa que en el primer eje las coordenadas hacia la derecha indican: mayor porcentaje de captación de DPPH, contenido de rutina, contenido de fenoles totales y porcentaje de captación de óxido nítrico. En el segundo eje la coordenada hacia arriba indica mayor rendimiento.

Adicional a lo anterior el círculo de correlaciones (primer plano factorial de las variables ACP), también permite determinar la relación entre las variables; las variables más correlacionadas entre sí mostrarán un ángulo pequeño y las menores un ángulo cercano a los noventa grados.

En la Figura 4-9 se observa una clara relación entre los pares de variables contenido de rutina y porcentaje de captación de DPPH, y entre contenido de fenoles totales y porcentaje de captación de óxido nítrico. Todas ellas están bien representadas en el primer plano factorial, el cual retiene más del 68% de la varianza.

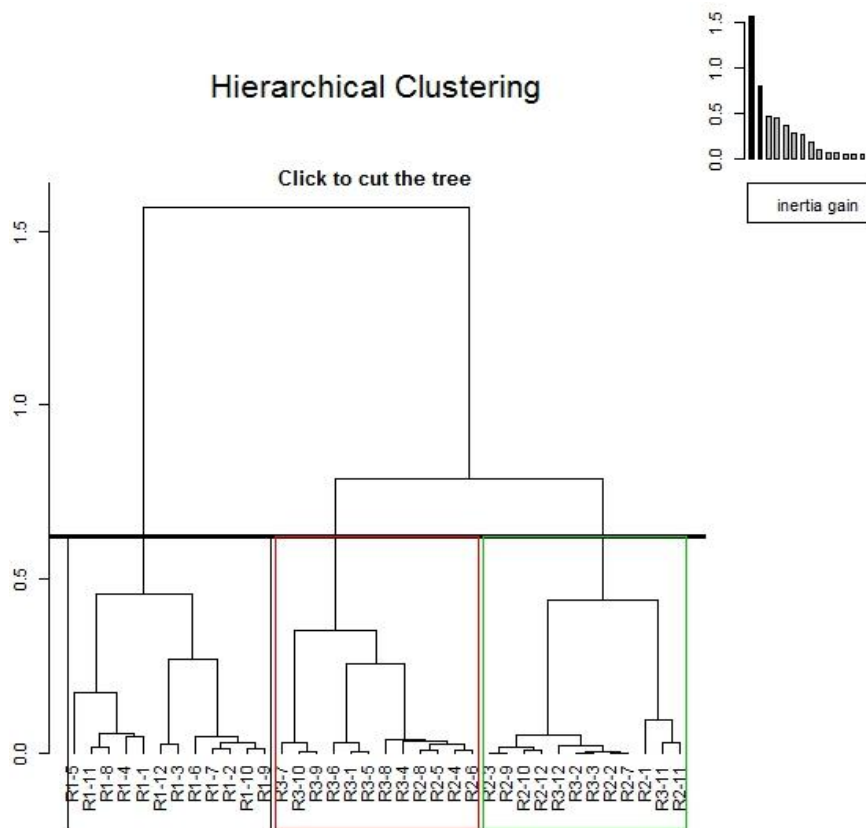
Estudios previos realizados por Yang *et al.*, mostraron una elevada correlación entre rutina y la actividad de captación del radical DPPH•, a una concentración de rutina de 0,05 mg / mL se obtuvo una captación de DPPH• de 90,4 %. Los resultados obtenidos sugieren que éste compuesto tiene una potente capacidad para donar hidrógeno a éste radical libre con el fin de estabilizarlo y transformarlo en una molécula relativamente estable, mitigando la reacción en cadena generada por el mismo. Como se mencionó anteriormente, la estructura química de rutina permite dicha capacidad debido a los grupos hidroxilo, los cuales pueden donar hidrógeno para prevenir la oxidación (Yang *et al.*, 2008).

El contenido de fenoles totales presentó una importante correlación con el porcentaje de captación de óxido nítrico. Rop *et al.*, realizaron estudios con extractos etanólicos de los frutos de *P. peruviana*, encontrando una elevada correlación $r^2= 0,9232$ entre ambas variables (Rop *et al.*, 2012). Es posible observar diversos mecanismos que pueden ser responsables de la actividad antioxidante, lo cual está relacionado con los compuestos fenólicos característicos.

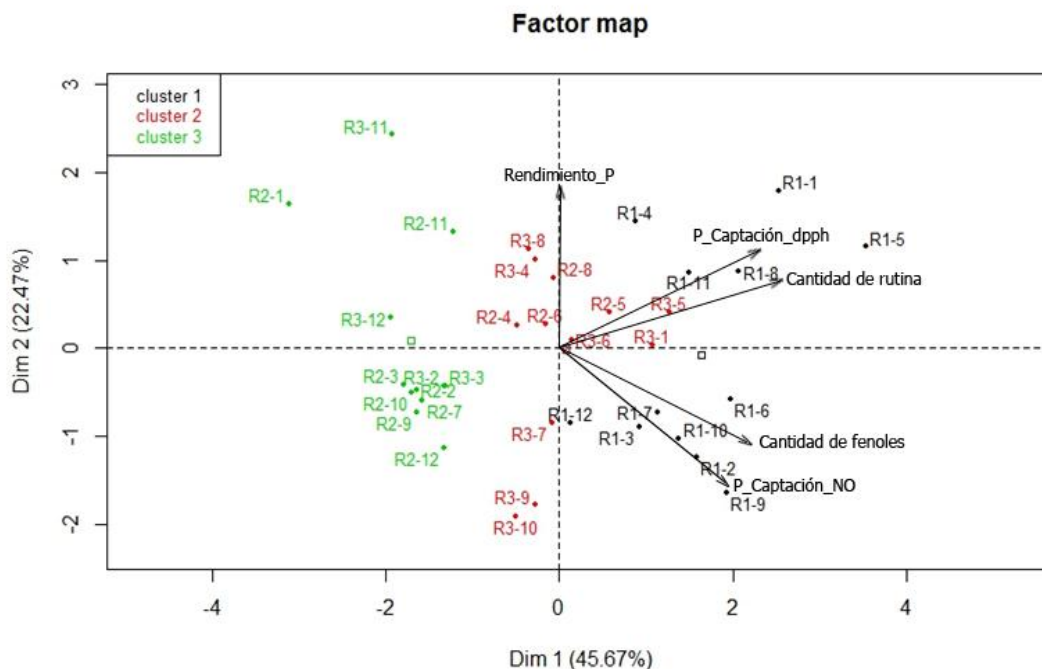
Posteriormente se realizó un procedimiento de clasificación (Clustering), que permite establecer grupos homogéneos de extractos. Para llevar a cabo ésta clasificación es

necesario examinar mediante un dendograma el punto de corte para la selección del número de clusters, la escogencia de este punto debe hacerse en el lugar donde hay un “mayor salto”. El software utilizado ofrece una ayuda gráfica, mostrando donde se debe cortar el árbol, escogiendo para este caso tres clusters para llevar a cabo el análisis como se ilustra en la Figura 4-10.

Figura 4-10: Figura de punto de corte para la selección del número de clusters



Una vez determinado el número de clusters en los cuales se van a repartir los extractos, se llevó a cabo la proyección de individuos (extractos) y variables (porcentaje de captación de DPPH, porcentaje de captación de óxido nítrico, contenido de fenoles totales, contenido de rutina y rendimiento) en el plano 2D que mejor información proporciona, (figura 4-11).

Figura 4-11: Primer plano factorial con modalidades ilustrativas de todas las regiones

En la Figura 4-11: R1 pertenece a la región de Ipiales, R2 a la región de Silvia y R3 a la región de Granada. Como se puede observar los extractos que se encuentran en el cluster 1 poseen mayor actividad antioxidante, mayor contenido de fenoles totales y de rutina, éste grupo está conformado en su totalidad por los extractos provenientes de la región de Ipiales.

En el cluster 2, se encuentran aquellos extractos que poseen menor actividad antioxidante, contenido de fenoles totales y de rutina con respecto al cluster 1. Sin embargo, presentan el mayor porcentaje de rendimiento, el 66% de los extractos de este cluster está conformado por extractos provenientes de las regiones de Granada mientras el otro 44% pertenecen a la región de Silvia.

Finalmente, en la tercera agrupación cluster 3, se encuentran los extractos que se puede decir tienen la menor actividad antioxidante, fenoles totales y contenido de rutina, puesto que su localización es contraria a la dirección de las variables proyectadas en el plano factorial. Estos provienen de la región de Silvia y Granada pero en su mayoría (66%), pertenece a la región de Silvia además en un 75% están conformados por aquellos extractos cuyo proceso de extracción se llevó a cabo con etanol al 96%.

De acuerdo a los resultados del análisis estadístico ACP y clasificación cluster, la región de la cual provienen los cálices de *P. peruviana* resulta ser un factor importante a la hora de evaluar el rendimiento, la actividad antioxidante, el contenido de fenoles totales y de rutina. En este análisis se encontró que los cálices provenientes de la región de Ipiales, son los que presentan un mejor comportamiento en cuanto a actividad antioxidante, contenido de fenoles totales y de rutina. También es importante destacar que la variable que al parecer otorga mejores resultados es la concentración de etanol, siendo más favorable el uso de etanol al 70% como solvente de extracción.

Un estudio reciente realizado por Carrillo *et al.*, comparó el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de *Theobroma cacao* proveniente de tres regiones de Colombia. De acuerdo con los resultados obtenidos, el contenido de cafeína y la actividad antioxidante de *Theobroma cacao* se ven afectados por las condiciones climáticas, siendo la altitud el factor que tuvo mayor influencia (Carrillo *et al.*, 2014).

Otros estudios también han determinado la influencia de la región de los cultivos sobre la actividad antioxidante y los fenoles totales. Andre *et al.*, evaluaron dicha influencia en plantas de papa y determinaron que éstas plantas pueden ajustar su contenido de polifenoles en respuesta al cambio en las condiciones ambientales. El genotipo también se ve afectado por los efectos del medio ambiente (Andre *et al.*, 2009).

Lachman *et al.*, también basaron su investigación en la región del cultivo de papa y su impacto en la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales. Los resultados demuestran diferencias significativas en el contenido de fenoles totales entre cultivos provenientes de cuatro regiones, las cuales difieren en las condiciones climáticas, altura y estado nutricional del suelo. El contenido de fenoles totales más alto se encontró en las regiones que tienen una alta altitud, baja temperatura anual y baja fertilidad del suelo. Las temperaturas bajas durante el período vegetativo podrían explicar un elevado rendimiento, actividad antioxidante y contenido de fenoles totales (Lachman *et al.*, 2008).

Algunos autores han propuesto que existe una relación proporcional entre el contenido y la actividad de los compuestos que son parte del sistema de defensa antioxidante de la planta (polifenoles), con cambios en la altura donde se da el crecimiento del cultivo. Dichas variaciones también han demostrado mejorar la síntesis de fenilalanina amonio

liasa en la plantas, lo que conlleva a una mayor producción de compuestos fenólicos incluyendo los flavonoides (Carrillo *et al.*, 2014).

Existen varios factores internos y externos que afectan la calidad y/o la cantidad de los compuestos bioactivos en las plantas, estos incluyen la diversidad genética, origen geográfico, fecha de recolección, condiciones ambientales tales como la intensidad lumínica, humedad, temperatura, altitud, la precipitación, el uso de fertilizantes, condiciones del suelo, infecciones u otros factores de estrés (Carrillo *et al.*, 2014).

P. peruviana es una planta que se adapta fácilmente a una amplia gama de condiciones agroecológicas, pero los mejores cultivos se ubican a una altura entre los 1.800 y 2.800 m.s.n.m, con una temperatura promedio que oscila entre los 13 y 18°C y una pluviosidad entre 1000 y 2000 mm anuales, bien distribuidos. Además, requiere de una humedad relativa promedio de 70% a 80%, así como de suelos bien drenados con un pH entre 5.5 y 7.0 y ricos en materia orgánica. La calidad de los frutos de uchuva depende de factores ambientales como la altura, la temperatura, la luminosidad (duración, intensidad y calidad de la luz), la precipitación, el viento, las características del suelo y la humedad relativa (Zapata *et al.*, 2002). El contenido de sólidos solubles (°Brix), azúcares (sacarosa) y la provitamina A del fruto disminuyen con la altitud creciente, mientras que la concentración de vitamina C no se afecta por elevaciones entre 2.300 y 2.700 m.s.n.m (Flórez *et al.*, 2000).

Según los datos obtenidos los extractos la región de Ipiales tuvieron los mejores resultados en cuanto al contenido de fenoles totales, contenido de rutina y actividad antioxidante, teniendo en cuenta las características de localización y geomorfología. El municipio de Ipiales presenta un clima tropical de alta montaña, el cual posee una temperatura que fluctúa muy poco, porque existe una alta humedad relativa promedio (83%) y también elevada precipitación que constituyen un aporte a la vegetación y a los suelos de la zona (Coral, 2007). Sin embargo, se necesitan más investigaciones para concluir el o los aspectos que tuvieron principal influencia en los resultados ya que son muchas las variables que pueden afectar el contenido de fenoles totales, la actividad antioxidante y el contenido de rutina, los cuales no solo son factores ambientales sino también agronómicos, sin olvidar la fecha de recolección del material vegetal.

4.5.2 Análisis estadístico de la región de Ipiales

Se realizó el análisis ACP y clasificación clustering por regiones, con el fin de determinar el factor clave durante el proceso de extracción para obtener los mejores resultados en cada región.

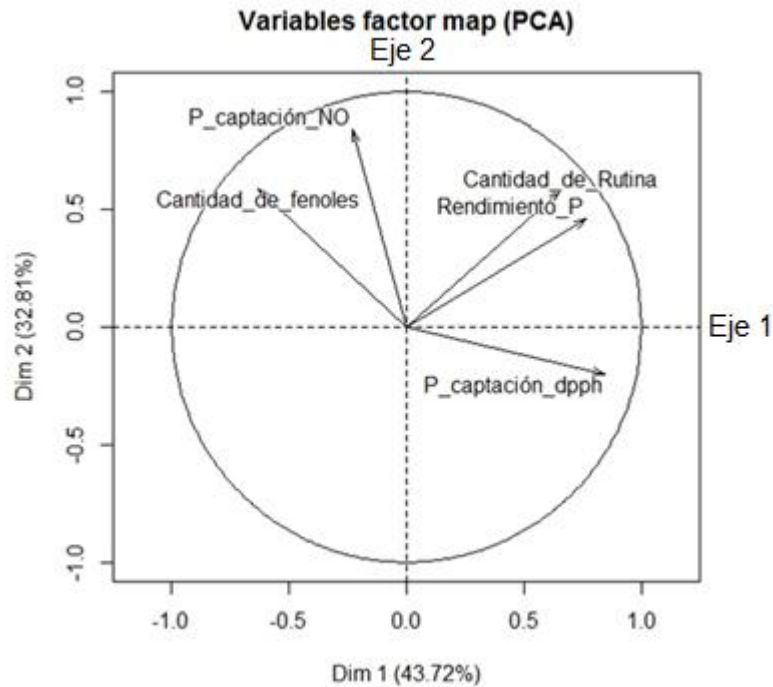
Inicialmente es importante determinar el número de ejes que formarán el plano factorial de trabajo, lo cual está soportado en el histograma de valores propios. En éste caso se decidió utilizar los dos primeros ejes ya que son mayores que 1, Figura 4-12.

Figura 4-12: Histograma de valores propios de la región de Ipiales



Teniendo en cuenta los ejes a retener, se realizó la proyección de las variables sobre el círculo de correlaciones (primer plano factorial de las variables del ACP), (Figura 4-13).

Figura 4-13: Círculo de correlaciones de la región de Ipiales (primer plano factorial de las variables del ACP)

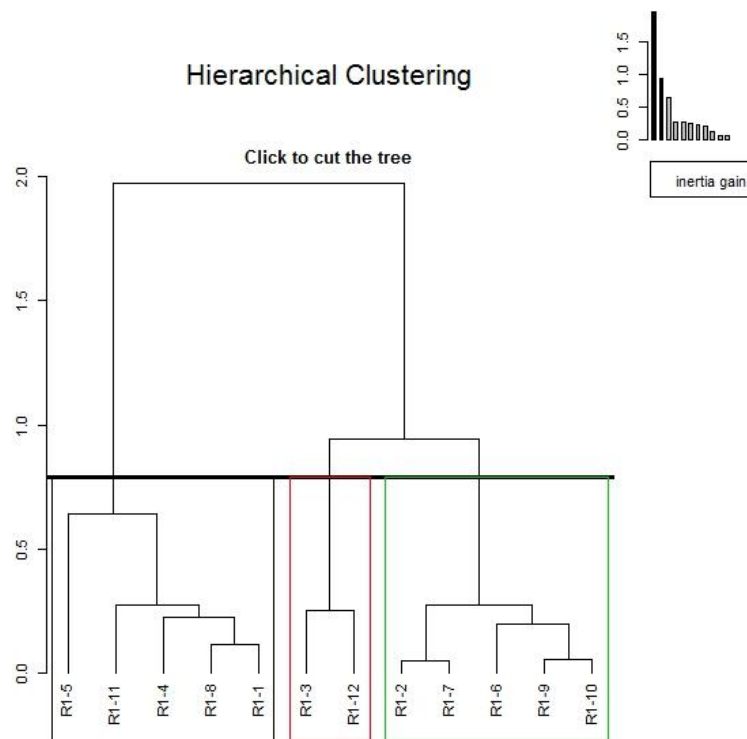


En la Figura 4-13 se observa que en el primer eje las coordenadas hacia la derecha indican: mayor contenido de rutina, rendimiento y porcentaje de captación de DPPH, mientras que hacia la izquierda indican mayor porcentaje de captación de óxido nítrico y contenido de fenoles totales.

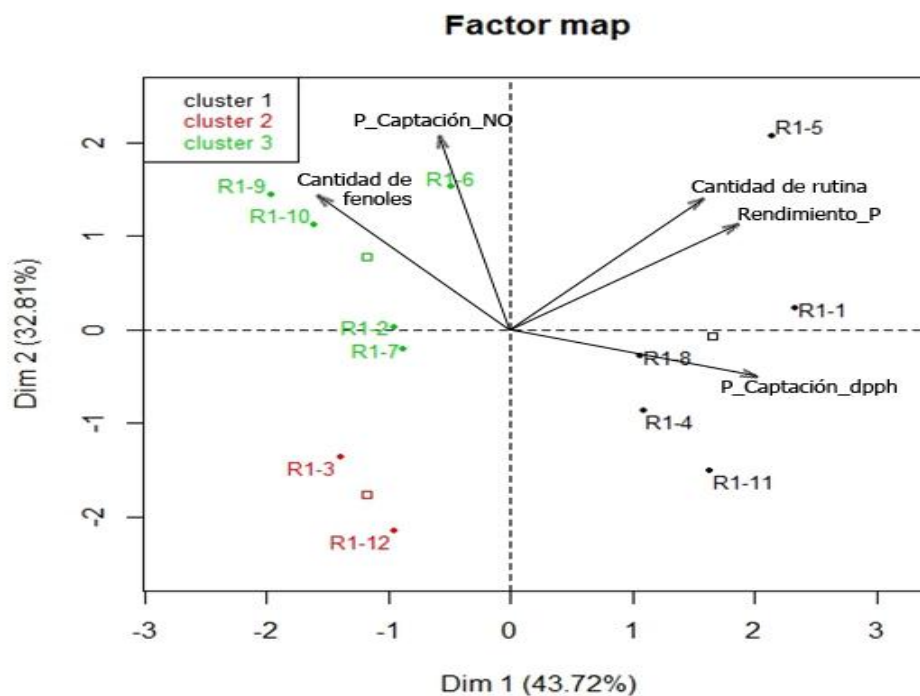
Con respecto a la relación de variables en la región de Ipiales, como se ilustra en la Figura 4-13, el comportamiento de las variables resulta tener ciertas diferencias con el círculo de correlaciones del análisis general. Sin embargo, el contenido de fenoles totales y el porcentaje de captación de óxido nítrico siguen teniendo buena correlación.

Posteriormente se realizó la clasificación clustering para la región de Ipiales, escogiendo tres clusters para llevar a cabo el análisis como se ilustra en la Figura 4-14.

Figura 4-14: Punto de corte para la selección del número de clusters en la región de Ipiales



Una vez determinada el número de clusters en los cuales se van a repartir los extractos, se llevó a cabo la proyección de individuos (extractos) y variables (porcentaje de captación de DPPH, porcentaje de captación de óxido nítrico, contenido de fenoles totales, contenido de rutina y rendimiento) en el plano factorial, (Figura 4-15).

Figura 4-15: Primer plano factorial con modalidades ilustrativas de la región de Ipiales

En la Figura 4-15 se observa: el primer grupo, cluster 1, se encuentra conformado por los extractos 1, 4, 5, 8 y 11, los cuales presentaron la mayor captación de DPPH, contenido de rutina y rendimiento; los extractos pertenecientes a este cluster son aquellos obtenidos empleando etanol al 70% como solvente de extracción.

El segundo grupo, cluster 2, está caracterizado por tener un bajo porcentaje de rendimiento; los extractos 3 y 12 presentes en éste grupo se obtuvieron con etanol al 96% y tiempo de percolación de 48 horas.

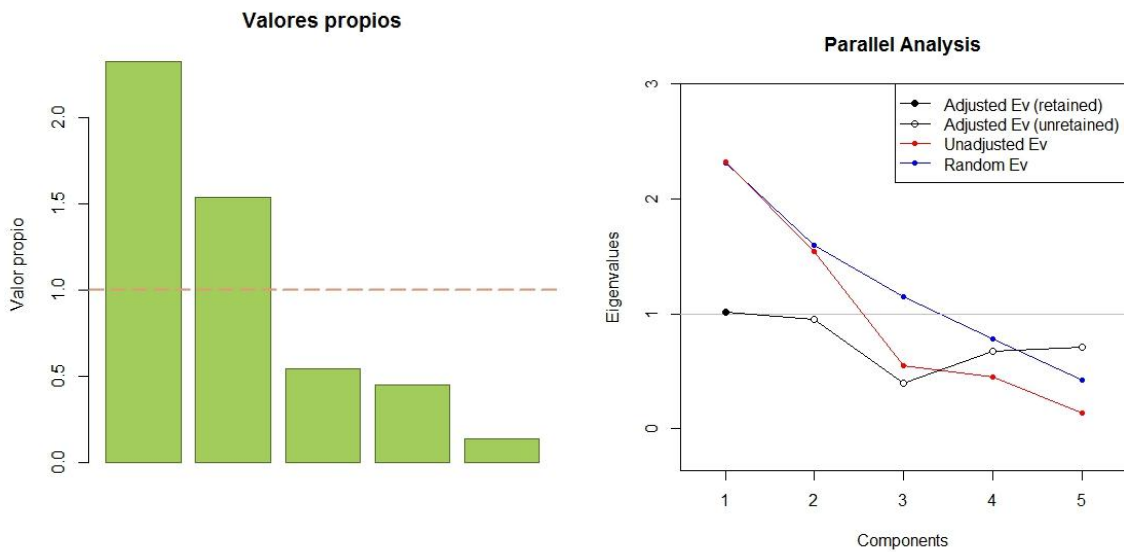
El tercer grupo, cluster 3, tiene mayor porcentaje de captación de óxido nítrico y contenido de fenoles totales; el grupo 3 se encuentra conformado en un 80% por los extractos obtenidos con un tiempo de percolación de 72 horas.

4.5.3 Análisis estadístico de la región de Granada

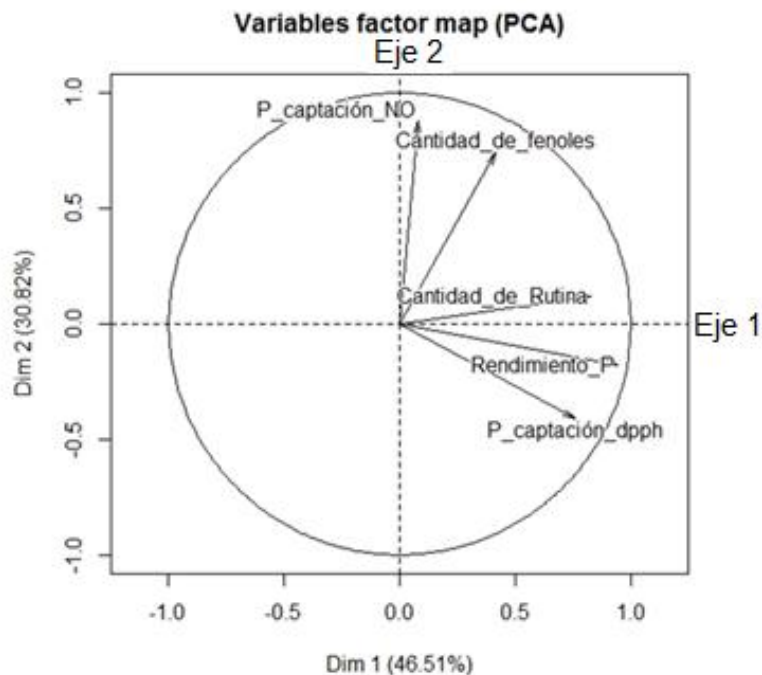
Se realizó el mismo análisis, únicamente para los datos provenientes de Granada.

Inicialmente es importante determinar el número de ejes que formarán el plano factorial de trabajo, lo cual está soportado en el histograma de valores propios. En éste caso se decidió utilizar los dos primeros ejes ya que son mayores que 1, (Figura 4-16).

Figura 4-16: Valores propios para la región de Granada



Teniendo en cuenta los ejes a retener, se realizó la proyección de las variables sobre el círculo de correlaciones (primer plano factorial de las variables del ACP), Figura 4-17.

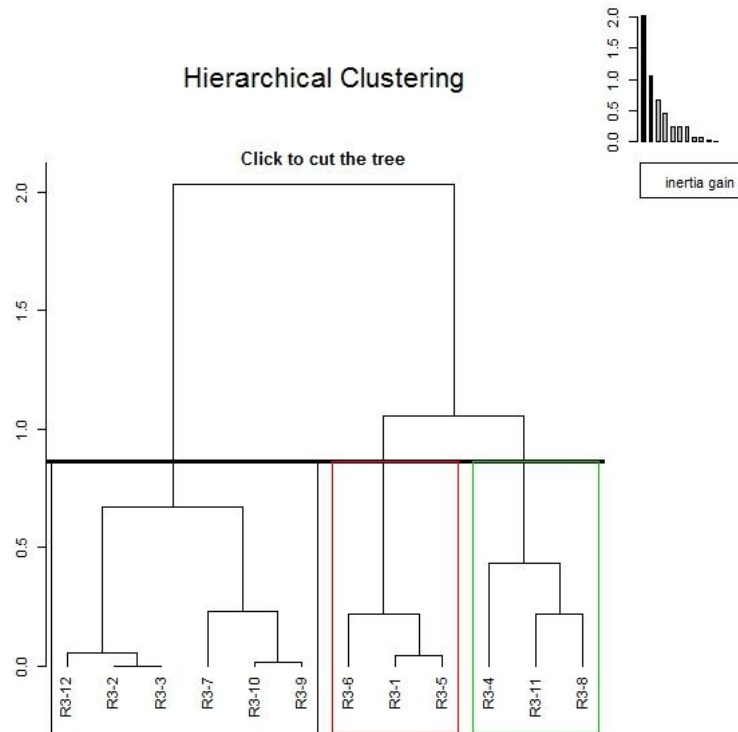
Figura 4-17: Círculo de correlaciones de la región de Granada

En la Figura 4-17 se observa, que en el primer eje las coordenadas hacia la derecha indican: mayor contenido de fenoles totales, contenido de rutina, rendimiento y captación de DPPH y captación de óxido nítrico.

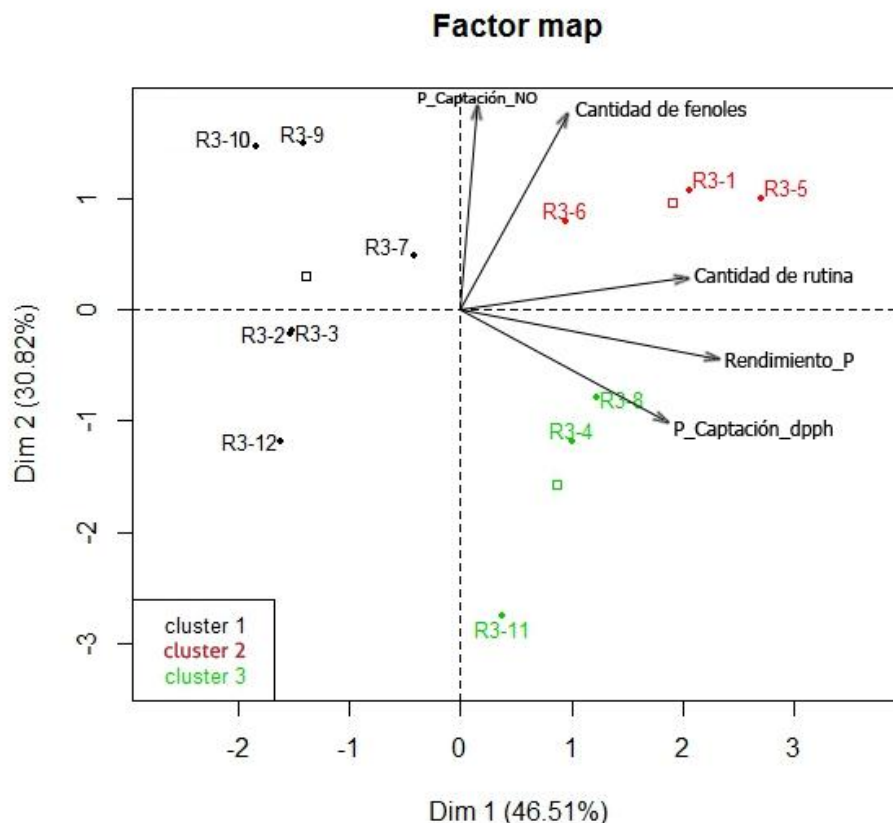
También se observa un comportamiento con ciertas diferencias al análisis general. Se encuentran claras relaciones entre las variables contenido de rutina, rendimiento y captación de DPPH. La combinación de estas tres parece resultar en la construcción del primer eje factorial. Las variables captación de óxido nítrico y el contenido de fenoles totales se encuentran relacionados y son más cercanos al segundo eje factorial. Todas ellas parecen estar bien representadas en el primer plano factorial.

Posteriormente se realizó la clasificación clustering para la región de Granada, escogiendo tres clusters para llevar a cabo el análisis como se ilustra en la Figura 4-18.

Figura 4-18: Punto de corte para la selección del número de clusters para la región de Granada



Al igual que en los casos anteriores, luego de determinar el número de clusters en los cuales se van a repartir los extractos, se llevó a cabo la proyección de individuos (extractos) y variables (porcentaje de captación de DPPH, porcentaje de captación de óxido nítrico, contenido de fenoles totales, contenido de rutina y rendimiento) en el plano factorial, (Figura 4-19).

Figura 4-19: Primer plano factorial con modalidades ilustrativas de la región de Granada

En la Figura 4-19 el primer grupo, cluster 1, está conformado por los extractos con menor contenido de rutina, captación de DPPH y rendimiento; está totalmente conformado por aquellos extractos en los cuales el proceso de extracción se llevó a cabo con etanol al 96%.

En el segundo grupo, cluster 2, se encuentran los extractos que presentan mayor contenido de fenoles totales y de rutina, está conformado por extractos en los cuales el proceso de extracción se llevó a cabo con etanol al 70% y 72 horas en el tiempo de percolación.

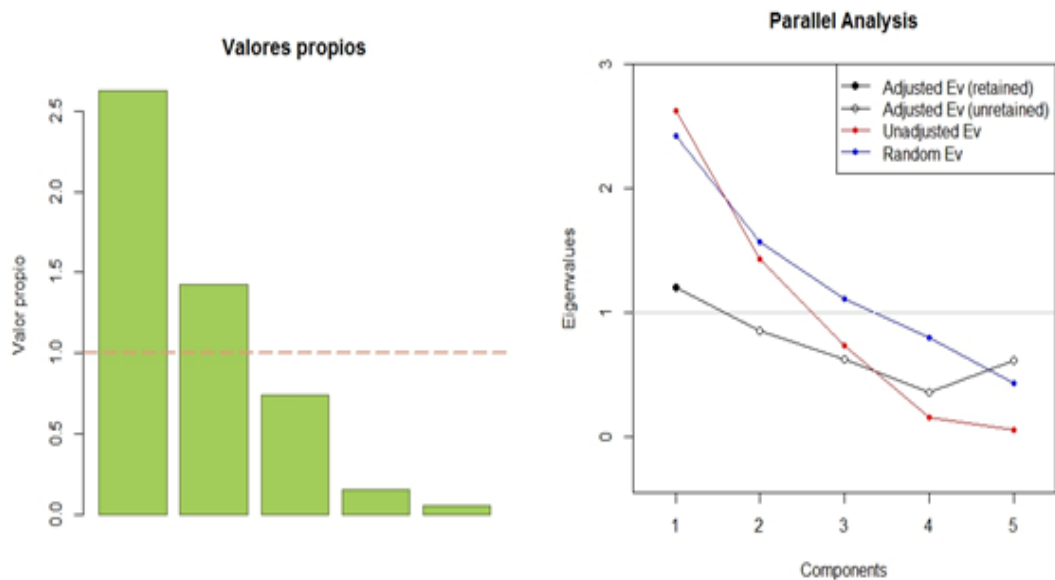
Finalmente el cluster 3 está caracterizado por extractos que resultaron tener alto porcentaje de captación DPPH. Ninguna de las condiciones de extracción resultó tener una influencia significativa ya que ninguna de ellas es un factor común entre los individuos pertenecientes a éste cluster.

4.5.4 Análisis estadístico de la región de Silvia

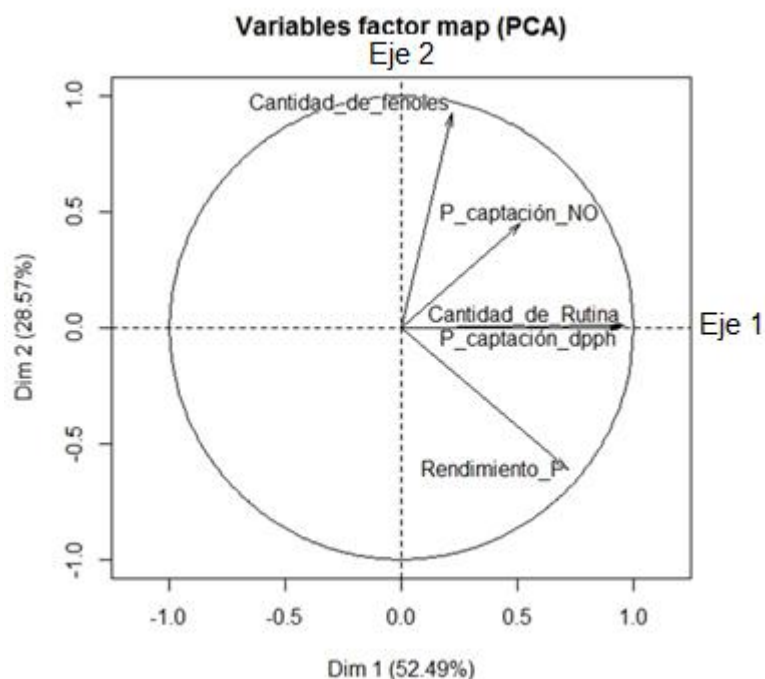
Se realizó nuevamente el mismo análisis únicamente para los datos provenientes de Silvia.

Se determinaron el número de ejes que formarán el plano factorial de trabajo, lo cual está soportado en el histograma de valores propios. En éste caso se decidió utilizar los dos primeros ejes ya que son mayores que 1, Figura 4-20.

Figura 4-20: Valores propios para la región de Silvia



Después de haber determinado los ejes a retener en el primer plano factorial, se realizó la proyección de las variables sobre el círculo de correlaciones (primer plano factorial de las variables del ACP), Figura 4-21.

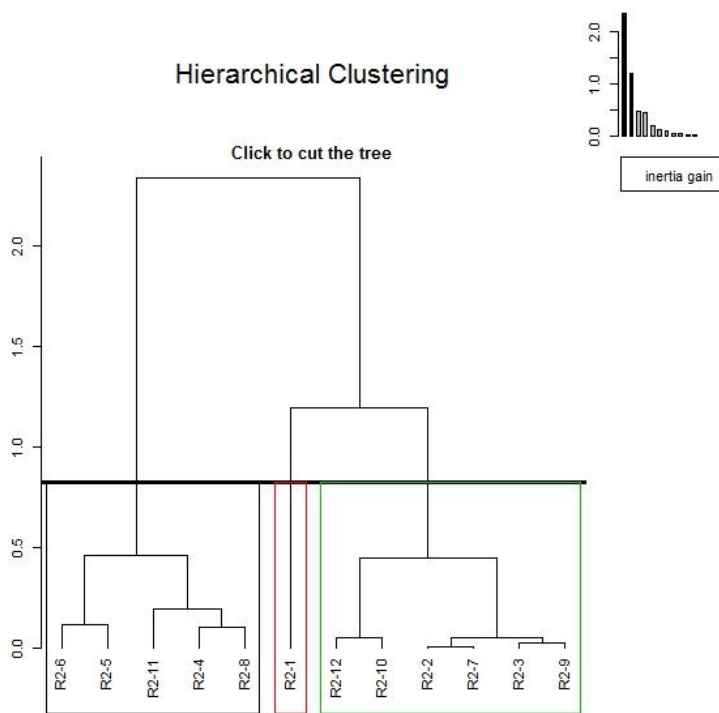
Figura 4-21: Círculo de correlaciones de la región de Silvia

En la Figura 4-21 se observa que en el primer eje, las coordenadas hacia la derecha indican: mayor contenido de fenoles totales, contenido de rutina, rendimiento, captación de DPPH y captación de óxido nítrico. También se observa, que en éstos extractos provenientes de la región de Silvia, el contenido de rutina y el porcentaje de captación de DPPH, se proyectan sobre el primer eje factorial, lo cual indica una muy buena relación entre ambas variables.

El contenido de fenoles totales y el porcentaje de rendimiento muestran poca relación, al igual que el rendimiento y el porcentaje de captación de óxido nítrico. Todas las variables están bien representadas en el primer plano factorial.

Posteriormente se realizó la clasificación clustering para la región de Silvia, escogiendo tres clusters para llevar a cabo el análisis como se ilustra en la Figura 4-22.

Figura 4-22: Punto de corte para la selección del número de clusters para la región de Silvia



Con dicha información se realiza la proyección de las variables sobre la nube de individuos, (Figura 4-23).

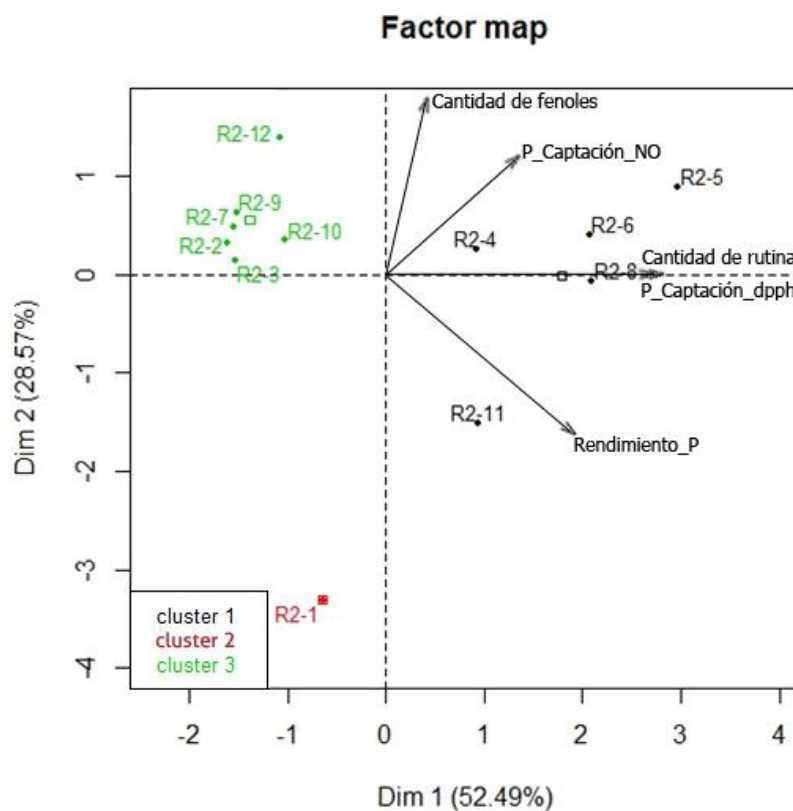
En la Figura 4-23 se observa el primer grupo, cluster 1, al cual pertenecen los extractos con alto porcentaje de captación de DPPH, contenido de rutina, porcentaje de captación de óxido nítrico y rendimiento; resulta estar conformado en un 83% por extractos en los cuales el proceso de extracción se llevó a cabo con etanol 70%. El tiempo de extracción y la presencia de luz no fueron factores determinantes en éstos resultados.

El segundo grupo, cluster 2, está caracterizado por un bajo contenido de fenoles totales, en éste grupo solo se encuentra el extracto obtenido con la condición 1, por lo tanto ninguna de las variables en el proceso de extracción tuvo una influencia significativa para la agrupación de los individuos en éste cluster.

El tercer grupo, cluster 3, al contrario del cluster 1. Está conformado por extractos cuyos niveles de porcentaje de captación de DPPH, contenido de rutina, porcentaje de captación de óxido nítrico y rendimiento son mucho más bajos que los generales. Este

cluster contiene en su totalidad, extractos en los cuales el proceso de extracción se llevó a cabo con etanol al 96%. Por otro lado, es posible sugerir que el tiempo de percolación y la presencia de luz no tuvieron una influencia significativa sobre dicho resultados.

Figura 4-23: Primer plano factorial con modalidades ilustrativas de Silvia



Según el análisis estadístico de componentes principales (ACP) en las tres regiones, los resultados de la actividad antioxidante, el contenido de fenoles totales, el rendimiento y el contenido de rutina se ven afectados durante el proceso de extracción principalmente por el solvente utilizado. En éste caso los mejores resultados en las variables mencionadas se obtuvieron con etanol al 70% mientras que los resultados más bajos siempre tuvieron en común como solvente de extracción etanol al 96%, éste comportamiento fue el mismo en las tres regiones, (Tabla 4-6).

Tabla 4-6: Resumen del análisis estadístico para cada una de las regiones

| Extracto | Ipiales | | | Granada | | | Silvia | | |
|-----------|--|-----------|-----------|--|-----------|-----------|--|-----------|-----------|
| | Cluster 1 | Cluster 2 | Cluster 3 | Cluster 1 | Cluster 2 | Cluster 3 | Cluster 1 | Cluster 2 | Cluster 3 |
| 1 | x | | | | x | | | X | |
| 2 | | | x | x | | | | | x |
| 3 | | X | | x | | | | | x |
| 4 | x | | | | | x | x | | |
| 5 | x | | | | x | | x | | |
| 6 | | | x | | x | | x | | |
| 7 | | | x | X | | | | | x |
| 8 | x | | | | | x | x | | |
| 9 | | | x | X | | | | | x |
| 10 | | | x | X | | | | | x |
| 11 | x | | | | | x | X | | |
| 12 | | X | | x | | | | | x |
| | | | | | | | | | |
| Cluster 1 | Mayor contenido de rutina Mayor rendimiento Mayor captación DPPH | | | Menor contenido de rutina Menor rendimiento Menor captación DPPH Menor contenido de fenoles totales | | | Mayor contenido de rutina Mayor captación DPPH Mayor rendimiento Mayor captación de óxido nítrico Mayor contenido de fenoles totales | | |
| Cluster 2 | Menor contenido de rutina Menor rendimiento | | | Mayor contenido de fenoles Mayor contenido de rutina | | | Menor captación de óxido nítrico | | |
| Cluster 3 | Mayor captación de óxido nítrico Mayor contenido de fenoles totales | | | Mayor rendimiento Mayor captación DPPH | | | Menor contenido de fenoles totales Menor captación de óxido nítrico Menor contenido de rutina Menor captación DPPH | | |

La elección del solvente es un factor determinante en los procesos de extracción y su influencia se ve reflejada en la actividad antioxidante, el contenido de fenoles totales y rendimiento de la extracción, el principal factor de dicha influencia es la polaridad del solvente. Solventes con mayor polaridad, como mezclas de solvente hidroalcohólicas, pueden permitir una mejor extracción de flavonoides glicosidados y fenoles de elevado peso molecular por lo cual se obtiene un mayor rendimiento de fenoles totales (Soto *et al.*, 2013).

Estudios llevados a cabo por Soto *et al.*, sobre la influencia de las condiciones de extracción sobre la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales en los extractos de hojas de *Peumus boldus*, determinaron que la polaridad lograda en las mezcla hidro alcohólicas (50:50) de metanol y etanol permitieron una mejor extracción de los compuestos fenólicos que el etanol y metanol puros, con respecto a la actividad antioxidante los resultados también mostraron una mayor actividad antioxidante con las mezcla hidro alcohólicas (50:50) de metanol y etanol que con dichos solventes puros (Soto *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo con respecto al solvente de extracción coinciden con diversos estudios mencionados anteriormente, los cuáles evaluaron la influencia del solvente de extracción sobre el contenido de fenoles totales, la actividad antioxidante y el contenido de rutina siendo las mezclas hidro alcohólicas las mejores opciones para obtener los mejores resultados en la variables mencionadas (Soto *et al.*, 2013; Zuorro y Lavecchia, 2013; Kim *et al.*, 2005).

El tiempo de percolación de 72 horas tuvo influencia para la obtención de los resultados más altos en el contenido de fenoles totales y en el contenido de rutina en la región de Granada. También influyó en el contenido de fenoles totales y en la captación de óxido nítrico en la región de Ipiales, lo cual indica que aunque su influencia no fue significativa en los resultados de rendimiento y captación de DPPH, es un factor a tener en cuenta para obtener los mejores resultados en cuanto al contenido de fenoles totales, contenido de rutina y captación de óxido nítrico.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo con respecto al tiempo de percolación, coinciden con estudios en los cuáles, determinaron que un mayor tiempo de extracción permite obtener mejores resultados en el contenido de fenoles totales y de rutina (Mussatto *et al.*, 2011; Yang y Zhang., 2008).

La presencia o ausencia de luz no fue un factor determinante sobre ninguna de las variables respuesta evaluadas, por facilidad en el proceso es más conveniente realizar el proceso de extracción con luz.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos las condiciones de extracción óptimas para lograr los mejores resultados en rendimiento, contenido de fenoles totales, contenido de

rutina y actividad antioxidante son: solvente de extracción etanol al 70%, tiempo total de extracción 72 horas y presencia de luz.

4.6 Estandarización del proceso de extracción de los de cálices de *Physalis peruviana* en términos de contenido fenoles totales, contenido de rutina y actividad antioxidante

Teniendo en cuenta las condiciones de extracción con las que se obtuvieron los mejores resultados solvente de extracción etanol al 70%, tiempo de percolación 72 horas y con presencia de luz se llevó a cabo la obtención de tres extractos de cálices de *P. peruviana* partiendo del mismo lote, en éste caso se trabajó con el material vegetal de la región de Granada ya que era con el que se contaba en mayor cantidad. A cada extracto se le evaluaron las variables respuesta que se presentan a continuación:

4.6.1 Evaluación de la actividad antioxidante de los tres extractos obtenidos con las mejores condiciones de extracción

▪ Captación de óxido nítrico

En la Tabla 4-7 se puede observar los resultados obtenidos de la captación de óxido nítrico de los tres extractos de la región de Granada.

Tabla 4-7: Captación de óxido nítrico de los tres extractos obtenidos con las mejores condiciones de extracción

| Extracto | Captación de NO (%) |
|------------|---------------------|
| Extracto 1 | 52,7 ± 0,11 |
| Extracto 2 | 52,8 ± 0,18 |
| Extracto 3 | 52,4 ± 0,90 |

Los datos son expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Tukey, *p<0,05, para comparaciones múltiples

Como se puede observar en la Tabla 4-7 los datos de captación de óxido nítrico no presentan diferencias significativas entre los tres extractos elaborados bajo las mismas condiciones. Lo cual indica que el proceso de extracción se encuentra estandarizado frente a ésta variable.

▪ DPPH

En la Tabla 4-8 se pueden observar los resultados obtenidos de la captación de DPPH• de los tres extractos de la región de Granada.

Tabla 4-8: Captación de DPPH• de los tres extractos obtenidos con las mejores condiciones de extracción

| Extracto | Captación de DPPH• (%) |
|------------|------------------------|
| Extracto 1 | 48,94 ±1,92 |
| Extracto 2 | 48,16 ±1,13 |
| Extracto 3 | 49,54 ±1,22 |

Los datos son expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Tukey, *p<0,05, para comparaciones múltiples

Como se puede observar en la Tabla 4-8 los resultados de la captación de DPPH no mostraron una diferencia significativa entre ellos, lo cual indica que las condiciones de extracción óptimas permitieron obtener resultados uniformes en los tres extractos analizados.

4.6.2 Cuantificación de fenoles totales de los tres extractos obtenidos con las mejores condiciones de extracción

En la Tabla 4-9 se pueden observar los resultados obtenidos en la cuantificación de fenoles totales de los tres extractos de la región de Granada.

Tabla 4-9: Cuantificación de fenoles totales de los tres extractos obtenidos con las mejores condiciones de extracción

| Extracto | Fenoles totales mg A.G / g |
|------------|----------------------------|
| Extracto 1 | 20,30 ±0,40 |
| Extracto 2 | 19,66 ±0,20 |
| Extracto 3 | 20,16±0,48 |

Los datos son expresados como su media ± D.E. (n=3) Test de Tukey, *p<0,05, para comparaciones múltiples

Según los resultados obtenidos, el contenido de fenoles totales en los tres extractos no presentó diferencias significativas entre los tres extractos elaborados bajo las mismas condiciones. Esto nos indica que el proceso de extracción se encuentra estandarizado frente a ésta variable.

4.6.3 Cuantificación de rutina en los tres extractos obtenidos con las mejores condiciones de extracción

En la Tabla 4-10 se pueden observar los resultados obtenidos en la cuantificación de rutina los tres extractos de la región de Granada.

Tabla 4-10: Cuantificación de rutina de los tres extractos obtenidos con las mejores condiciones de extracción

| Extracto | μg rutina / mg extracto |
|------------|------------------------------------|
| Extracto 1 | $16,41 \pm 0,15$ |
| Extracto 2 | $15,52 \pm 0,12$ |
| Extracto 3 | $15,45 \pm 0,58$ |

Los datos son expresados como la media \pm D.E. (n=3) Test de Tukey, * $p < 0,05$, para comparaciones múltiples

Como se puede observar en la Tabla 4-10, el contenido de rutina en los tres extractos no presentó diferencias significativas entre ellos, lo cual indica que el proceso de extracción se encuentra estandarizado frente a ésta variable.

Según los resultados obtenidos en todas las variables evaluadas no se presentaron diferencias entre los tres extractos obtenidos con las condiciones de extracción etanol al 70%, tiempo de percolación 72 horas y en presencia de luz. Este hecho indica que el proceso de extracción es reproducible y que las condiciones son adecuadas y permiten obtener los resultados esperados.

4.7 Estudio de condiciones de almacenamiento

Los extractos de cálices de *P. peruviana* fueron sometidos a diferentes condiciones de almacenamiento, el proceso extracción se llevó a cabo con las condiciones: 72 horas,

etanol al 70% como solvente de extracción y con luz. Se trabajó con el material vegetal de la región de Granada.

El estudio de condiciones de almacenamiento se llevó a cabo bajo dos condiciones de temperatura y humedad $14 \pm 8^\circ\text{C}$, $72 \pm 5\%$ HR y $30 \pm 2^\circ\text{C}$, $65 \pm 5\%$ HR, en ambos casos las muestras se almacenaron durante 4 semanas protegidas de la luz.

Posteriormente fue evaluada la influencia de dichas condiciones de almacenamiento sobre las variables respuesta que se presentan a continuación:

4.7.1 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos sometidos a condiciones de almacenamiento

▪ Captación de óxido nítrico

En la Tabla 4-11 se pueden observar los resultados obtenidos de la captación de óxido nítrico, tanto de las muestras que se almacenaron en cámara, como de las que se almacenaron a condiciones ambientales comparadas, con la muestra inicial, la cual pertenece a tiempo cero.

Tabla 4-11: Captación de óxido nítrico de las muestras sometidas a condiciones de almacenamiento

| Ensayo | Captación de NO (%) |
|--|---------------------|
| Muestra inicial tiempo cero | $52,68 \pm 0,20$ |
| Muestra bajo condiciones ($14 \pm 8^\circ\text{C}$, 72% HR) después de un mes | $52,38 \pm 0,12$ |
| Muestra bajo condiciones ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, $65 \pm 5\%$ HR) después de un mes | $52,37 \pm 0,06$ |

Los datos son expresados como la media \pm D.E. (n=3) Test de Dunnett', *p<0,05 comparado con la muestra a tiempo cero

Como se presenta en la Tabla 4-11, la captación de óxido nítrico tanto en condiciones de $14 \pm 8^\circ\text{C}$, 72% HR como $30 \pm 2^\circ\text{C}$, $65 \pm 5\%$ HR no presentó una disminución significativa estadísticamente con respecto a la muestra inicial. Este resultado indica que los extractos se mantienen estables frente a ésta variable en dichas condiciones de almacenamiento durante 4 semanas.

▪ Captación de DPPH

Los resultados se presentan en la Tabla 4-12 donde se observa la captación de DPPH• de las muestras que se almacenaron en cámara como de las que se almacenaron a condiciones ambientales comparadas con la muestra inicial la cual pertenece a tiempo cero.

Tabla 4-12: Captación de DPPH• de las muestras sometidas a condiciones de almacenamiento

| Ensayo | Captación DPPH (%) |
|--|--------------------|
| Muestra inicial tiempo cero | 48,8 ± 0,69 |
| Muestra bajo condiciones (14 +/- 8°C, 72HR) después de un mes | 48,6 ± 0,68 |
| Muestra bajo condiciones (30+/- 2°C, 65 +/- 5% HR) después de un mes | 47,7 ± 0,22 |

Los datos son expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Dunnett', *p<0,05, comparado con la muestra a tiempo cero

Como se presenta en la Tabla 4-12, la captación de DPPH tanto en condiciones de 14 ± 8°C, 72 % HR como 30 ± 2°C, 65 ± 5% HR presentó una disminución que no fue significativa estadísticamente con respecto a la muestra inicial. Este resultado indica que los extractos, se mantienen estables frente a la captación de DPPH en dichas condiciones de almacenamiento durante 4 semanas.

4.7.2 Evaluación fenoles totales de los extractos sometidos a condiciones de almacenamiento

El análisis de fenoles totales para las muestras sometidas a condiciones de almacenamiento se puede observar en la Tabla 4-13.

Tabla 4-13: Fenoles totales de las muestras sometidas a condiciones de almacenamiento.

| Ensayo | Fenoles totales mg A.G. / g extracto |
|---|--------------------------------------|
| Muestra inicial tiempo cero | 20,08 ± 0,38 |
| Muestra bajo condiciones (14 +/- 8°C, 72 HR) después de un mes | 18,60 ± 0,60 |
| Muestra bajo condiciones (30 +/- 2°C, 65 +/- 5% HR) después de un mes | 14,50 ± 1,80** |

Los datos son expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Dunnett', *p<0,05, comparado con la muestra a tiempo cero

Como se presenta en la Tabla 4-13, el contenido de fenoles totales en condiciones de 14 ± 8°C, 72 % HR presentó una disminución de 7,37 % con respecto a la muestra inicial, sin embargo esta disminución no resultó ser estadísticamente significativa. Sin embargo, bajo las condiciones de 30 ± 2°C, 65 ± 5% HR si se presentó disminución estadísticamente significativa con respecto a la muestra inicial.

Este resultado indica que los extractos no se mantuvieron estables frente al contenido de fenoles totales bajo las condiciones de almacenamiento de 14 +/- 8°C, 72 % HR y 30 +/- 2°C, 65 +/- 5% HR durante 4 semanas.

4.7.3 Cuantificación de rutina de los extractos sometidos a condiciones de almacenamiento

La cuantificación de rutina se llevó a cabo por medio de cromatografía CLAE, tanto de las muestras que se almacenaron en cámara como las que se almacenaron a condiciones ambientales. En la Tabla 4-14 se presentan los resultados obtenidos para las muestras analizadas.

Tabla 4-14: Contenido de rutina de las muestras sometidas a condiciones de almacenamiento

| Ensayo | Concentración de rutina $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto |
|---|---|
| Muestra inicial tiempo cero | 16,4 \pm 0,15 |
| Muestra bajo condiciones (14 \pm 8°C, 72 HR) después de un mes | 15,9 \pm 0,32 |
| Muestra bajo condiciones (30 \pm 2°C, 65 \pm 5% HR) después de un mes | 15,3 \pm 0,23* |

Los datos son expresados como la media \pm D.E. (n=3) Test de Dunnett', *p<0,05, comparado con la muestra a tiempo cero

Como se presenta en la Tabla 4-14, el contenido de rutina en condiciones de almacenamiento de 30 \pm 2°C, 65 \pm 5% HR presentó una disminución significativa con respecto a la muestra inicial. Mientras que a 14 \pm 8°C, 72 % HR no se presentó una diferencia significativa con respecto a la muestra a tiempo cero.

Según los resultados obtenidos de las condiciones de almacenamiento, se evidencia que el extracto de cálices de *P. peruviana* no presentó disminución significativa en la actividad antioxidante, fenoles totales y contenido de rutina bajo las condiciones de almacenamiento 14 \pm 8°C, 72 % HR comparado con la muestra a tiempo cero. Sin embargo, se observaron cambios significativos en el contenido de rutina y de fenoles totales bajo las condiciones de almacenamiento 30 \pm 2°C, 65 \pm 5% HR con respecto a la muestra inicial.

Teniendo en cuenta la variación presentada en el contenido de rutina y de fenoles totales, se podría inferir que los extractos pueden ser almacenados a una temperatura < 30 \pm 2°C – 65% \pm 5% HR durante un mes, sin presentar una disminución estadísticamente significativa en la variables evaluadas con respecto a la muestra a tiempo cero. Sin embargo, es necesario un estudio de estabilidad completo ya que en la presente investigación el tiempo fue de un mes, variaciones mayores se podrían presentar con un tiempo mayor de almacenamiento lo cual determinaría las condiciones de almacenamiento definitivas más adecuadas.

4.8 Ensayos bajo condiciones de estrés

Los estudios de estrés se llevan a cabo bajo condiciones extremas con el fin de evaluar la estabilidad intrínseca del ingrediente activo, lo cual proporciona información importante en la etapa de formulación. Por medio de éste estudio también es posible evaluar la especificidad el método analítico para distinguir el analito de interés de los productos de degradación (Rolim *et al.*, 2009).

4.8.1 Hidrólisis

Los extractos fueron sometidos a condiciones de hidrólisis ácida HCl y alcalina NaOH a diferentes concentraciones del reactivo y temperatura.

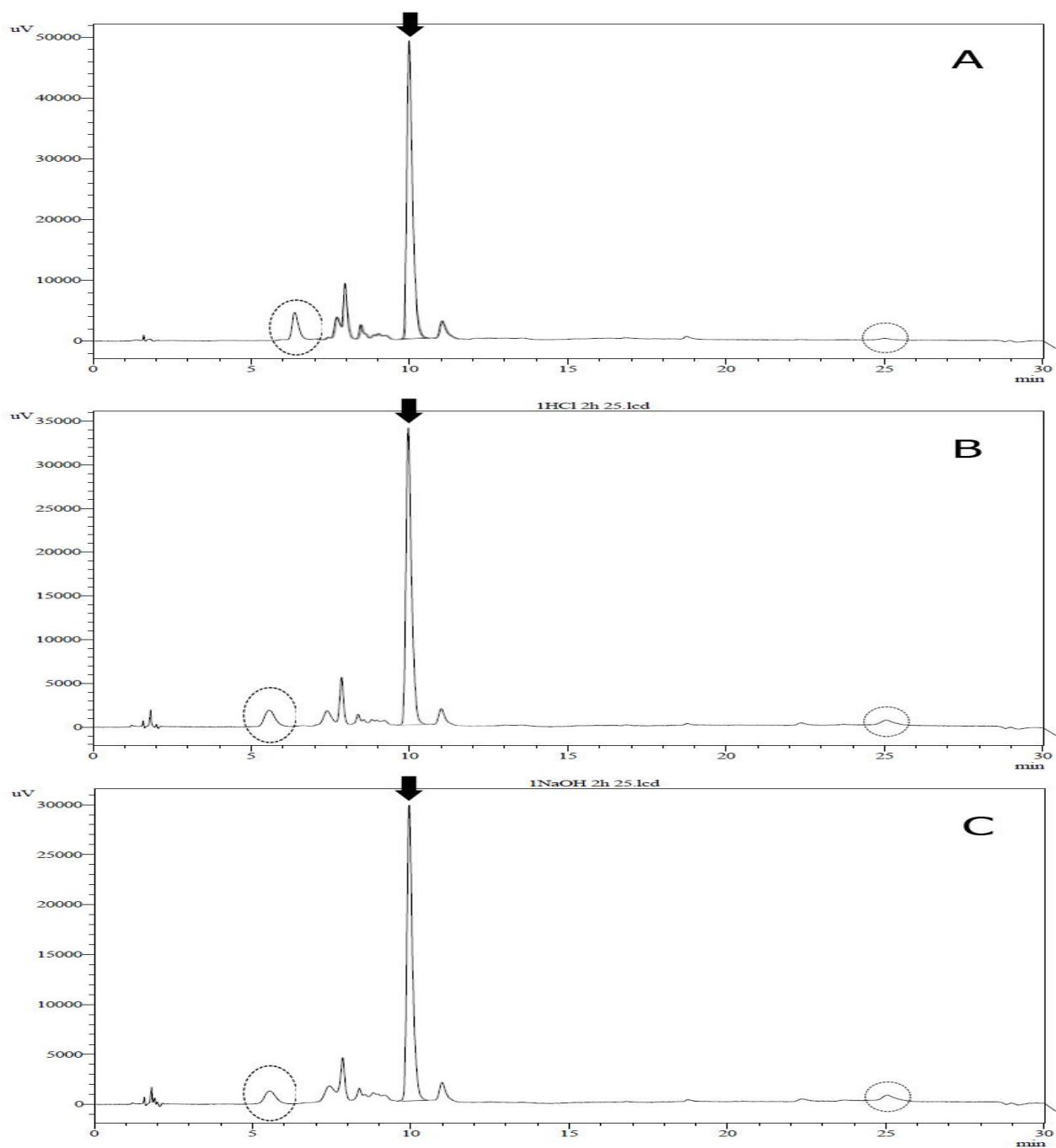
El análisis tanto de hidrólisis ácida como básica, a una concentración de 0,1N HCl / NaOH, durante 8 horas a 100°C en reflujo, mostró una degradación total de rutina en el análisis realizado por cromatografía CLAE. Por lo tanto no fue una condición adecuada para evaluar las variables respuesta ya que los ensayos de estrés no están destinados a degradar completamente el compuesto sino a promover una pequeña degradación (10-30%). Estudios llevados a cabo por Zhou *et al.*, determinaron que la rutina empieza a degradarse a partir de los 75°C lo cual podría explicar los resultados obtenidos en el presente trabajo bajo éstas condiciones (Zhou *et al.*, 2000).

Por esta razón, se procedió a realizar el análisis de hidrólisis bajo los siguientes parámetros: HCl/NaOH 0,1N, durante 8 horas a 40°C. Los resultados obtenidos mostraron una degradación de rutina del 76% para la hidrólisis ácida y de 90% para la hidrólisis básica, aunque la degradación de rutina disminuyó significativamente comparado con el análisis inicial los porcentajes obtenidos aún son muy elevados con respecto al esperado en éste tipo de ensayos (10-30%). Siguiendo la ruta propuesta por Singh y Bakshi, 2000, se decidió entonces trabajar con las condiciones de 0,01N HCl/NaOH, durante 2 horas a 25°C. Las variables respuesta evaluadas fueron el contenido de rutina, actividad antioxidante y contenido fenoles totales.

4.8.1.1 Cuantificación de rutina por cromatografía de alta eficiencia CLAE

En la Figura 4-24 se presentan los cromatogramas de la muestra sin degradar y de las muestras sometidas a condiciones de estrés HCl / NaOH 0,01N, durante 2 horas a una temperatura de 25°C. El pico correspondiente a la rutina se observa con un tiempo de retención $T_r = 10$ min.

Figura 4-24: Cromatogramas de los extractos en condiciones normales y bajo condiciones de estrés por hidrólisis



A= Muestra sin degradar ; B= 2 horas de ensayo hidrólisis ácida HCl 0,01 N a 25°C ;

C= 2 horas de ensayo hidrólisis básica NaOH 0,01 N a 25°C.

Según los resultados de los perfiles cromatográficos presentados en la figura 4-16, el compuesto rutina se mostró inestable en las condiciones de hidrólisis, ya que presenta una disminución en el área bajo la curva en las condiciones de hidrólisis ácida y básica, lo cual podría indicar su degradación (Tabla 4-15).

Tabla 4-15: Degradación de rutina bajo condiciones de hidrólisis

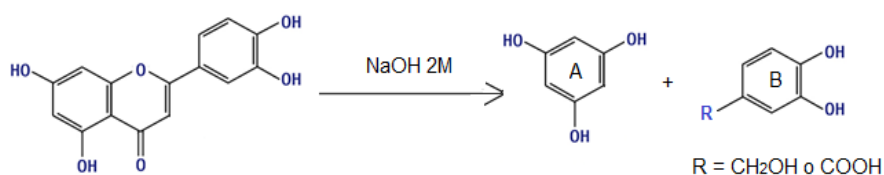
| Ensayo | Concentración de rutina µg/mg de extracto | Degradación de rutina (%) |
|-------------------------------|--|------------------------------|
| Muestra sin degradar | 15 ± 0,20 | 0 |
| HCl 0,01 N, 2 horas, 25°C | 10 ± 0,05*** | 33 |
| NaOH 0,01 N, 2 horas, 25°C | 9 ± 0,02*** | 40 |

Los datos son expresados como su media ± D.E. (n=3) Test de Dunnett',
***p<0,001 comparado con la muestra sin degradar

En la Tabla 4-15 se puede determinar que el porcentaje de degradación de rutina fue mayor en las condiciones de hidrólisis alcalina en comparación con la hidrólisis ácida.

La mayoría de flavonoides son degradados en condiciones alcalinas fuertes, rompiéndose el anillo C, lo cual libera sustancias de menor peso molecular. Por ésta razón no resultan tóxicos para el hombre y los mamíferos, pues son degradados en las condiciones alcalinas a nivel del intestino (Martinez, 2005). (Figura 4-25).

Figura 4-25: Hidrólisis alcalina de flavonoides (Adaptado de Martinez , 2005)



Estudios llevados a cabo por Ortman, determinaron que la hidrólisis alcalina provocó cambios más significativos en los flavonoides C-glicosilados presentes en las fracciones de *Cecropia glaziovii* que la hidrólisis ácida (Ortman, 2013).

La descomposición de rutina en las soluciones alcalinas depende de la concentración del álcali utilizado en el ensayo, la razón de esto puede ser debido a la disminución de los

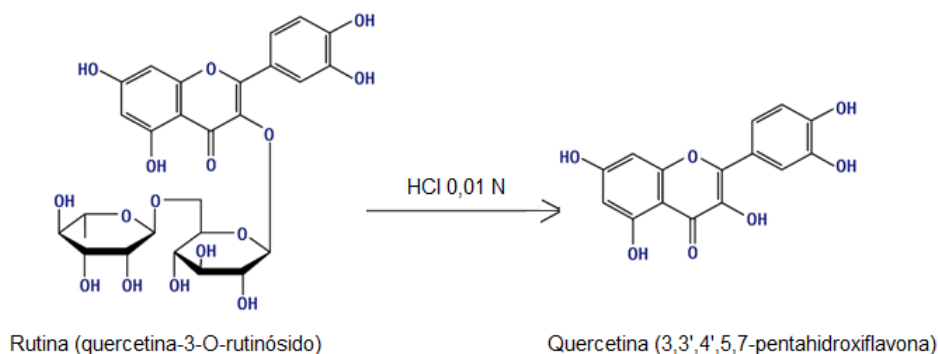
grupos OH del álcali por la reacción de neutralización que se genera con los ácidos fenólicos los cuales se producen durante la degradación de rutina y quercetina (Dechene,1951).

Según Dechene, una considerable degradación de rutina se presenta en soluciones que contienen 17 moles de hidróxido de sodio por mol de rutina, en el análisis cromatográfico de éstas soluciones no se observó la presencia de quercetina. Los autores atribuyen la ausencia de quercetina en las soluciones en las cuales ha ocurrido descomposición de rutina, a que la quercetina se degrada tan rápido como es producida por la hidrólisis de rutina. Los resultados del estudio realizado por Dechene indican la rápida degradación de quercetina con respecto a rutina en condiciones alcalinas lo cual sugiere que su estructura de flavonoide-O-glicosido mantiene a la rutina más estable en dichas condiciones con respecto a quercetina (Dechene,1951).

Por el contrario, el análisis cromatográfico de las soluciones bajo condiciones ácidas sí mostró un importante contenido de quercetina lo cual indica que bajo condiciones ácidas la hidrólisis de rutina ocurre fácilmente. Sin embargo, la degradación de la quercetina producida es menor en condiciones ácidas que en condiciones alcalinas (Dechene,1951).

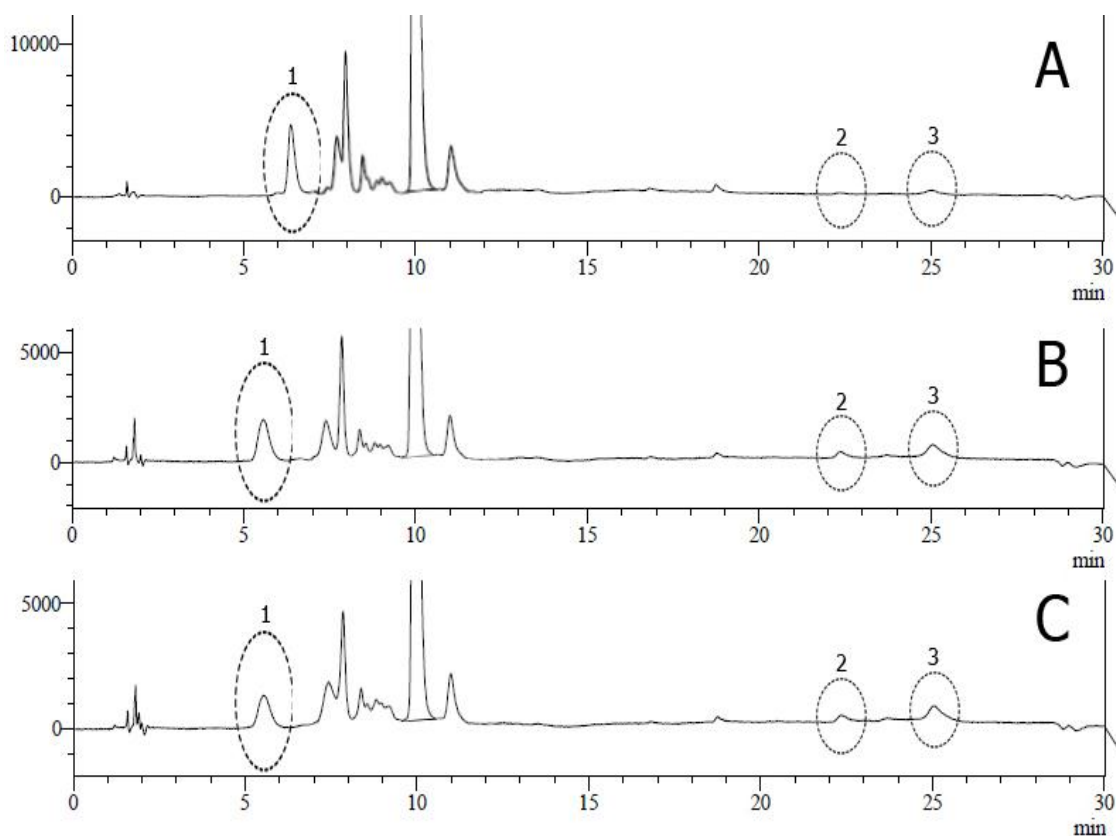
Los flavonoides O-glicósidos se pueden hidrolizar en presencia de ácidos para liberar los carbohidratos ligados y la correspondiente aglicona flavonoide. En general se utiliza HCl (Martínez, 2005) (Figura 4-26).

Figura 4-26: Degradación de rutina por hidrólisis ácida



En los cromatogramas de la hidrólisis de rutina presentado en la Figura 4-24, también se puede observar la formación y disminución de nuevas señales, para detallar con mayor claridad dichas variaciones se realizó una ampliación del cromatograma, (Figura 4-27).

Figura 4-27: Ampliación de los cromatogramas de los extractos en condiciones normales y bajo condiciones de estrés por hidrólisis.



A= Muestra sin degradar ; B= 2 horas de ensayo hidrólisis ácida HCl 0,01 N a 25°C ; C= 2 horas de ensayo hidrólisis básica NaOH 0,01 N a 25°C.

En la Figura 4-27 es posible observar que el compuesto 1 (el cuál es más polar que la rutina) presentó una disminución en su señal en las hidrólisis ácida y básica comparado con la muestra sin degradar. Sin embargo, su disminución se hace más notoria bajo las condiciones NaOH 0,01 N a 25°C.

Contrario a lo anterior los compuestos 2 y 3 (menos polares que la rutina) con tiempos de retención de 22,5 y 25,0 minutos respectivamente, presentaron un aumento en su señal en las hidrólisis ácida y básica con respecto a la muestra sin degradar. En especial el

compuesto 2, el cual es casi imperceptible en la muestra que no fue sometida a condiciones de degradación, esto podría indicar la presencia de productos que se forman por la degradación de rutina como es el caso de quercetina. Sin embargo, es necesario llevar a cabo un estudio más detallado para identificar dichos compuestos y comprender el proceso de degradación.

4.8.1.2 Fenoles totales

El análisis de fenoles totales se llevó a cabo para las muestras sometidas a condiciones de hidrólisis HCl / NaOH 0,01 N, durante 2 horas a una temperatura de 25°C. En la Tabla 4-16 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 4-16: Contenido de fenoles totales de las muestras sometidas a condiciones de hidrólisis HCl/NaOH 0,01N, durante 2 horas, a una temperatura de 25°C

| Ensayo | Fenoles totales mg A.G. / g extracto | Disminución de fenoles totales(%) |
|-------------------------------|---|--------------------------------------|
| Muestra sin degradar | 21,8 ± 0,74 | 0 |
| HCl 0,01 N, 2 horas, 25°C | 11,7 ± 0,27*** | 46,0 |
| NaOH 0,01 N, 2 horas, 25°C | 15,2 ± 0,16*** | 30,2 |

Los datos son expresados como su media ± D.E (n=3) Test de Dunnett', ***p<0.001 comparado con la muestra sin degradar

El contenido de fenoles totales también tuvo una disminución importante y estadísticamente significativa, en éste caso la mayor disminución se presentó con la hidrólisis ácida.

4.8.1.3 Evaluación de la actividad antioxidante

▪ Captación de óxido nítrico

La captación de óxido nítrico se determinó para las muestras sometidas a condiciones de hidrólisis HCl / NaOH 0,01N, durante 2 horas, a una temperatura de 25°C. En la Tabla 4-17 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 4-17: Captación de óxido nítrico de las muestras sometidas a condiciones de hidrólisis HCl / NaOH 0,01N, durante 2 horas a una temperatura de 25°C

| Ensayo | Captación de óxido nítrico (%) | Disminución de la actividad (%) |
|----------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Muestra sin degradar | 54,62 ± 0,57 | 0 |
| HCl 0,01 N, 2 horas, 25°C | 31,38 ± 1,31*** | 42,5 |
| NaOH 0,01 N, 2 horas, 25°C | 29,76 ± 0,66*** | 45,5 |

Los datos son expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Dunnett', ***p<0,001 comparado con la muestra sin degradar

Como se observa en la Tabla 4-17 la captación de óxido nítrico tuvo una disminución importante y estadísticamente significativa luego de someter las muestras a las condiciones de estrés, lo cual puede indicar la degradación de los compuestos responsables de dicha actividad como los fenoles totales ya que ambas variables se encuentran correlacionadas.

▪ DPPH

La captación de DPPH• también fue evaluada para las muestras sometidas a condiciones de hidrólisis HCl / NaOH 0,01N, durante 2 horas a una temperatura de 25°C. En la Tabla 4-18 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 4-18: Captación de DPPH• de las muestras sometidas a condiciones de hidrólisis HCl/NaOH 0,01N, durante 2 horas a una temperatura de 25°C

| Ensayo | Captación de DPPH• (%) | Disminución de la actividad (%) |
|----------------------------|------------------------|---------------------------------|
| Muestra sin degradar | 63,2 ± 0,03 | 0 |
| HCl 0,01 N, 2 horas, 25°C | 39,2 ± 0,02* | 34,2 |
| NaOH 0,01 N, 2 horas, 25°C | 43,4 ± 0,02* | 39,7 |

Los datos son expresados como la media ± D.E. (n=3) Test de Dunnett', *p<0,05, comparado con la muestra sin degradar

La captación de DPPH• presentó una disminución estadísticamente significativa de la actividad. En el ensayo de hidrólisis básica ésta disminución con respecto a la muestra sin degradar fue mayor, la relación de ésta variable con el contenido de

rutina puede indicar que la disminución de la captación de DPPH• principalmente en condiciones alcalinas puede deberse a la degradación de rutina, la cual también fue mayor en condiciones alcalinas.

Según los resultados y el análisis estadístico, todas las variables evaluadas tuvieron una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la muestra sin degradar. Tanto la hidrólisis ácida como la alcalina tuvieron importante influencia en todas las variables evaluadas. Sin embargo, la hidrólisis alcalina presentó mayor impacto en el contenido de rutina y en la captación de DPPH• que la hidrólisis ácida. (Tabla 4-19).

Tabla 4-19: Influencia de la hidrólisis ácida y alcalina sobre las variables respuesta evaluadas

| Ensayo | % Disminución | | | |
|----------------------------|------------------------------|---------------------|----------------------------|--------------------|
| | Contenido de fenoles totales | Contenido de rutina | Captación de óxido nítrico | Captación de DPPH• |
| Muestra sin degradar | 0 | 0 | 0 | 0 |
| HCl 0,01 N, 2 horas, 25°C | 46,0 | 32,9 | 42,5 | 34,2 |
| NaOH 0,01 N, 2 horas, 25°C | 30,2 | 41,1 | 45,5 | 39,7 |

Adicionalmente, la metodología para la cuantificación de rutina permitió observar el aumento en la señal de ciertos compuestos los cuales podrían ser productos de degradación de rutina. Es importante realizar un estudio más detallado para la identificación de los mismos y determinar el proceso de degradación.

4.8.2 Oxidación

El efecto de peróxido de hidrógeno como agente oxidante se evaluó a una concentración de 1% durante tres horas. Las variables respuesta evaluadas fueron el contenido de rutina, actividad antioxidante y contenido de fenoles totales.

4.8.2.1 Fenoles totales

El análisis de fenoles totales se realizó para las muestras sometidas a oxidación con peróxido de hidrógeno. En la Tabla 4-20 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 4-20: Contenido de fenoles totales de las muestras sometidas a condiciones de oxidación

| Ensayo | Fenoles totales mg A.G. / g extracto | Disminución de la actividad (%) |
|---|---|------------------------------------|
| Muestra sin degradar | 21,8 ± 0,74 | 0 |
| H ₂ O ₂ 1%, 3 horas | 12,7 ± 0,32**** | 41,7 |

Los datos son expresados como la media ± D.E. (n=3) T test, ****p<0.0001 comparado con la muestra sin degradar

Los datos obtenidos indican una disminución estadísticamente significativa de los fenoles totales en las muestras sometidas a oxidación con peróxido de hidrógeno, comparada con las muestras sin degradar, lo cual indica que se pudo haber presentado degradación de los mismos.

4.8.2.2 Actividad antioxidante

▪ Óxido nítrico

La captación de óxido nítrico se determinó para las muestras sometidas a oxidación con peróxido de hidrógeno. En la Tabla 4-21 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 4-21: Captación de óxido nítrico de las muestras sometidas a condiciones de oxidación.

| Ensayo | Captación NO (%) | Disminución de la actividad (%) |
|---|---------------------|------------------------------------|
| Muestra sin degradar | 54,6 ± 0,57 | 0 |
| H ₂ O ₂ 1%, 3 horas | 58,2 ± 0,45*** | 0 |

Los datos son expresados como la media ± D.E. (n=3) T test, ***p<0.001 comparado con la muestra sin degradar

Como se observa en la Tabla 4-21 las muestras sometidas a oxidación con peróxido de hidrógeno durante tres horas, no mostraron disminución en la captación de NO debido a la oxidación Según estudios llevados a cabo por (Rice- Evans, 2001) los flavonoides poseen actividad antioxidante por medio de mecanismos como el barrido de radicales libres, lo cual podría explicar dicha resistencia a éste ensayo. Estudios llevados a cabo por Ortman, determinaron que la oxidación con peróxido de hidrógeno a concentraciones de 3-10% no provocó cambios significativos en el contenido de flavonoides de ciertas fracciones de *Cecropia glaziovii*. Sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios de oxidación con mayores concentraciones de peróxido de hidrógeno con el fin de determinar si se presenta disminución en la captación de óxido nítrico (Ortman, 2013).

Estudios llevado por He *et al.*, determinaron la formación de diversos productos de degradación después de someter la rutina a oxidación, dichos compuestos podrían tener influencia sobre ésta variable respuesta. (He *et al.*, 2007). Sin embargo, es necesario realizar un estudio más a fondo para poder determinar si ese fue un factor que tuvo influencia el aumento observado en la captación de óxido nítrico.

▪ DPPH

La captación de DPPH• se determinó para las muestras sometidas a oxidación con peróxido de hidrógeno. En la Tabla 4-22 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 4-22: Captación de DPPH• de las muestras sometidas a condiciones de oxidación

| Ensayo | Captación DPPH• (%) | Disminución de la actividad (%) |
|---|---------------------|---------------------------------|
| Muestra sin degradar | 61,0 ± 0,57 | 0 |
| H ₂ O ₂ 1%, 3 horas | 50,9 ± 5,44 | 17 |

Los datos son expresados como la media ± D.E. (n=3) T test, *p<0.05 comparado con la muestra sin degradar

En los resultados presentados se observa una disminución en la captación de DPPH• la cual no es estadísticamente significativa igual que en el caso anterior, esto puede

deberse a la capacidad antioxidante de los flavonoides los cuales se encuentran presentes en los cálices de *P. peruviana*.

4.8.2.3 Cuantificación de rutina

El contenido de rutina fue determinada para las muestras sometidas a oxidación con peróxido de hidrógeno 1%, (Tabla 4-23).

Tabla 4-23: Contenido de rutina de las muestras sometidas a condiciones de oxidación

| Ensayo | Concentración de rutina µg/mg de extracto | Degradación de rutina (%) |
|---|--|------------------------------|
| Muestra sin degradar | 15 ± 0,20 | 0 |
| H ₂ O ₂ 1%, 3 horas | 12 ± 0,75* | 20 |

Los datos son expresados como la media ± D.E. (n=3) T test, *p<0.05 comparado con la muestra sin degradar

Como se observa en la Tabla 4-23 el compuesto analizado, rutina mostró ser sensible a ésta condición de oxidación y se observó una alteración significativa con un porcentaje de degradación de 20% con respecto a la muestra sin degradar.

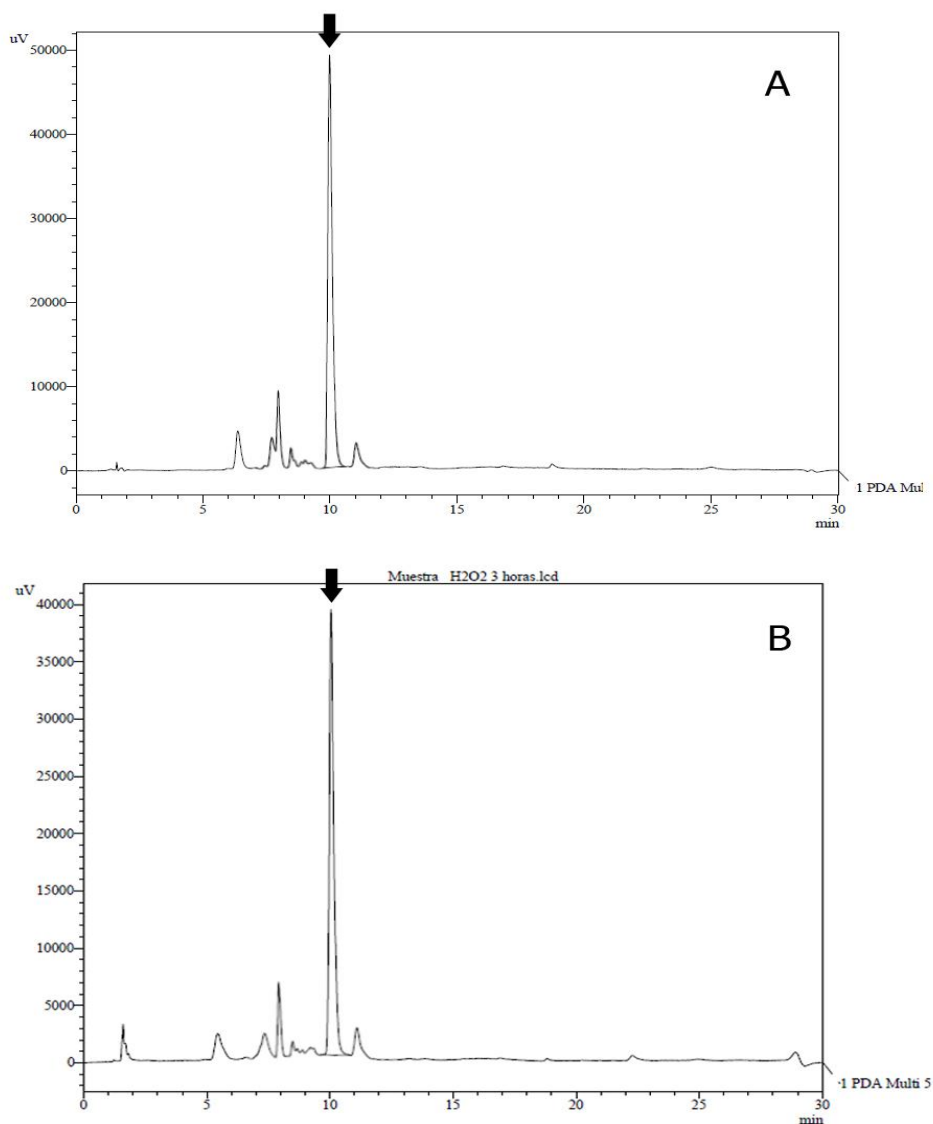
Estudios llevados a cabo por Lin *et al.*, sobre la oxidación de rutina y quercetina indican que el flavonoide rutina requiere mayor concentración de oxígeno que la quercetina para sufrir oxidación y que adicional a esto, la reacción ocurre más lentamente que en el caso de quercetina; los autores atribuyen lo anterior a la presencia de rutinosa en el carbono 3 (Lin *et al.*, 2010).

Según estudios llevados a cabo por He *et al.*, sobre la electro-oxidación de rutina, muestran que los diversos grupos hidroxilo de rutina pueden ser oxidados, lo cual genera la formación de diversos productos de degradación (He *et al.*, 2007).

Con base en los resultados obtenidos fueron detectadas alteraciones significativas en el contenido de rutina, con relación a la muestra sin degradar. Adicionalmente, en el cromatograma se observa una disminución de la señal del compuesto con tiempo de

retención $T_r = 6$ en la muestra sometida a oxidación. Sin embargo, a esta longitud de onda no se observa la formación de nuevos compuestos que podrían ser de productos de la degradación. En la Figura 4-28, se presentan los cromatogramas de la muestra sin degradar y de las muestras sometidas a condiciones de oxidación con H_2O_2 al 1% durante 3 horas.

Figura 4-28: Cromatogramas de la muestra sin degradar y de las muestras sometidas a oxidación con H_2O_2 1% durante 3 horas



A= Muestra sin degradar ; B= 3 horas de ensayo oxidación H_2O_2 1%

El presente estudio se llevó a cabo siguiendo la guía propuesta por Singh y Bakshi, 2000, para los ensayos de estrés. Con base en los resultados obtenidos y siguiendo la clasificación de dicha metodología en cuanto a la hidrólisis ácida y alcalina, es posible realizar una clasificación tentativa de la estabilidad del extracto como extremadamente lábil.

Con respecto a los ensayos de oxidación el extracto mostró disminución significativa en el contenido de fenoles totales y de rutina, mientras que la actividad antioxidante no presentó disminución significativa por lo tanto para dar una clasificación de estabilidad tentativa frente a la oxidación es necesario realizar más estudios con variaciones en el tiempo y en la concentración de peróxido de hidrógeno.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se determinaron las mejores condiciones para llevar a cabo el proceso de extracción de los cálices de *P. peruviana* las cuales fueron: solvente de extracción etanol al 70%, tiempo de percolación 72 horas, con o sin luz.

Se determinó que la región de origen de los cálices de *P. peruviana* tuvo importante influencia sobre el rendimiento, contenido fenoles totales, contenido de rutina y actividad antioxidante, siendo Ipiales la región que obtuvo los mayores resultados.

Se encontró que los extractos etanólicos de cálices de *P. peruviana* poseen buena acción captadora de radicales libres en los ensayos DPPH y óxido nítrico por lo tanto una importante actividad antioxidante.

Los estudios de condiciones de almacenamiento de los extractos de cálices de *P. peruviana*, mostraron que el contenido de fenoles totales, la captación de óxido nítrico y DPPH así como en el contenido de rutina no presentaron una disminución estadísticamente significativa con respecto a la muestra inicial bajo las condiciones de almacenamiento $14 \pm 8^{\circ}\text{C}$, 72 % HR durante un periodo de 4 semanas. Sin embargo, se observaron variaciones significativas en el contenido de rutina y de fenoles totales en las condiciones de almacenamiento $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 65 ± 5 % HR durante el mismo periodo.

Se evidenciaron alteraciones relevantes en el contenido de rutina, fenoles totales y actividad antioxidante bajo las condiciones de estrés por hidrólisis NaOH / HCl 0,01 N durante 2 horas a 25°C , en la condiciones de oxidación con H_2O_2 1% durante 3 horas se presentaron variaciones significativas en el contenido de rutina y el análisis de fenoles totales.

Con base en los resultados de las condiciones de estrés, se determinó una clasificación tentativa del extracto como extremadamente lábil.

Se logró obtener información para la estandarización de un extracto de cálices de *P. peruviana* con actividad antioxidante en cuanto al proceso de extracción para alcanzar los mayores resultados en el contenido de fenoles totales y de rutina, captación de DPPH•, captación de óxido nítrico.

5.2 Recomendaciones

Profundizar en el estudio de la influencia de la región de procedencia de los cálices de *P. peruviana* y la época de colecta sobre el rendimiento, fenoles totales, contenido de rutina y actividad antioxidante con el fin de determinar cuáles factores agronómicos o ambientales influyen directamente sobre las respuestas evaluadas.

Realizar estudios de estabilidad acelerados y a largo plazo para los extractos de cálices de *P. peruviana* que permitan obtener información mucho más completa sobre el mecanismo de degradación de la rutina en el extracto, así como de las condiciones adecuadas de almacenamiento y el tiempo de vida útil.

Realizar extractos de *P. peruviana* empleando solventes más polares con el fin de evaluar si es posible la extracción de mayor contenido de rutina y/o fenoles totales, aumentando así la capacidad antioxidante acá demostrada.

Evaluar la influencia de otras variables tales como tamaño de partícula del material vegetal, relación droga: solvente, tipo de extracción etc., sobre el contenido de rutina en los extractos de cálices de *P. peruviana*.

Bibliografía

Agati G., Azzarello E., Pollastri S., Tattini M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*.196: 67– 76.

Alarcón C., Denicola A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica*. 763: 1-10.

Andre C., Oufir M., Hoffmann L., Hausman J. F., Rogez H., Larondelle Y. (2009). Influence of environment and genotype on polyphenol compounds and in vitro antioxidant capacity of native Andean potatoes (*Solanumtuberosum L.*). *Journal of Food Composition and Analysis*. 22: 517-524.

Baberan F., Ferreres F., Valbuena A., Maceo M. (1994).Estudio sobre el contenido de flavonoides de las mieles de la alcarria: su aplicación a la caracterización geográfico-botánica. Ed. CSIC. pp 9-10-11.

Basey K., McGraw B., Woolley J. (1992). Phygrine, an alkaloid from *Physalis* species. *Phytochemistry*. 31: 4173.

Biesaga M. (2011). Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*. 1218: 2505–2512.

Bilia A., Bergonzi M.C., Morgenni F., Mazzi G., Vincieri F.F. (2001). Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. *International Journal of Pharmaceutics* 213: 199-208.

Blessy M., Patel R., Prajapati P., Agrawal Y.K. (2013). Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. J. Pharm. Anal. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2013.09.003>.

Bokkenheuser V., Shackleton C., Winter J. (1987). Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. Biochem J. 248: 953-956.

Borrego F., Fernández J., López A., Parga V., Murillo M., Carvajal A. (1999). Correlación y componentes principales de variación en variedades de papa *Solanum tuberosum* L. Agronomía Mesoamericana. 10: 01-06.

Bravo L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews .56: 317-333.

Cadenas E., Hauptmann N. (1997). The oxygen paradox: Biochemistry of active oxygen. In: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. J. Scandalios. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 1-20.

Carmona R. (2011). "Uchuva *Physalis peruviana*". Ed. Bayer CropScience. p 9.

Carrillo L., Londoño J., Gil A. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. Food Research International 60: 273-280.

Chua L. (2013). A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. Journal of Ethnopharmacology.150: 805–817.

Coral A. (2007). Ipiates time. Recuperado el 23 de 05 de 2014, de Ipiates time: <http://www.ipitimes.com>.

Cragg G., Newman D. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. Biochimica et Biophysica. 1830: 3670–3695.

Cristiane N., Nervo R., Moura J. (2005). Estandarización de extractos de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) por medio de la determinación del contenido de flavonoides totales. Acta farmacéutica Bonaerense. 24:04.

Cui Z., Kong X., Chen Y., Zhang C., Hua Y. (2014). Effects of rutin incorporation on the physical and oxidative stability of soy protein-stabilized emulsions. Food Hydrocolloids. 41: 1-9.

Debbie S., Graeme L., Pierre D., Elizabeth W., Kelvin C. (2012). Pharmacovigilance of herbal medicine. Journal of Ethnopharmacology. 140: 513-518.

Deng S., West B., Jensen J. (2011). Thermal degradation of flavonol glycosides in Noni leaves during roasting. Advance Journal of Food Science and Technology.3: 155-159.

Dechene E., (1951).The relative stability of Rutin and Quercetin in alkaline solution. Journal of the American Pharmaceutical association. 10.

Ebrahimzadeh M., Nabavi S.M., Nabavi S.F., Bahramian F., Bekhradnia A. (2010). Antioxidant and free radical scavenging activity of *H.Officinalis* L, *Var. Angustifolius*, *V.Odorata*, *B.Hyrcana* and *C.Speciosum*. Pak. J. Pharm. Sci. 23: 29-34.

Fang S., Liu J., Li B. (2012). Ten new withanolides from *Physalis peruviana*.Steroids. 77: 36-44.

Festy D. (2007). "Antioxidantes: guía práctica". Ed. Intermedio editores. pp 12-13.

Flórez V., Fischer G., Sora A. (2000). "Producción, poscosecha y exportación de la uchuva". Ed. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Universidad Nacional de Colombia. p 9, 11, 19,22, 23.

Franco L. (2006). Estudio de la actividad antiinflamatoria de los principios activos de los cálices de *Physalis peruviana*. Tesis doctoral. Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. p 221-222.

Franco L., Melo G., Bolívar I., Estrada H. (2013). Actividad Antibacteriana *in vitro* de Extractos y Fracciones de *Physalis peruviana* L. y *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas 12. (3): 230-237.

He J., Wang Y., Deng N., Zha Z., Lin X. (2007). Cyclic voltammograms obtained from the optical signals: Study of the successive electro-oxidations of rutin. *Electrochimica Acta*. 52: 6665–6672.

Heing M., Tan S., Yong J., Ong E. (2013). Emerging green technologies for the chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *Trends in Analytical chemistry*. 50: 1–10.

Heim K., Tagliaferro A., Bobilya D. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 13: 572–584.

Hounsome N., Hounsome B., Tomos D., Edwards-Jones G. (2008). Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal of Food Science*. 73: R48-R65.

Izquierdo S., Hernández O., Sanabia M. (2011). Desarrollo de una tecnología para la obtención de extracto acuoso de *Momordica charantia* L. *Rev Cubana Plant Med*. 16: 4.

Johanson H., Svartström O., Phadnis P., Engman L., Ott M. (2010). Exploring a synthetic organoselenium compound for antioxidant pharmacotherapy—toxicity and effects on ROS-production. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 18: 1783–1788.

Kim K., Lee K., Kim D., Park H., Kwon I., Lee H. (2005). Optimal recovery of high-purity rutin crystals from the whole plant of *Fagopyrum esculentum* Moench (buckwheat) by extraction, fractionation, and recrystallization. *Bioresource Technology* 96 : 1709–1712.

Kumar N., Michra K., Ojha H. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*. 130: 1036 -1043.

Lachman J., Hamouz K., Orsa'k M., Pivec V., Dvor'a'k P. (2008). The influence of flesh colour and growing locality on polyphenolic content and antioxidant activity in potatoes. *Scientia Horticulturae*. 117: 109-114.

Licodiedoff S., Koslowski L., Ribani R. (2013). Flavonols and antioxidant activity of *Physalis peruviana* L. fruit at two maturity stages. *Acta Scientiarum Technology*. 35: 393-399.

Li Y., Liu H., Wang Z. (2005). A validated stability-indicating HPLC with photodiode array detector (PDA) method for the stress tests of *Monascus purpureus fermente drice*, red yeast rice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 39: 82.

Lin L., Wu H., Li W., Chen W., Lee Y., Wu D., Li P., Yeh A. (2010). Kinetic studies of the oxidation of quercetin, rutin and taxifolin in the basic medium by thylene diamine tetra acetate. *Inorganic Chemistry Communications*. 13: 633-635.

Macheix J., Fleuriet A., Billot J. (1990). *Fruit Phenolics*. Boca Raton, FL: CRC.

Mansour H., Yatouji S., Mbarek S., Houas I., Delai A., Dridi D. (2011). Correlation between antibutryl choline esterase and antioxidant activities of three aqueous extracts from Tunisian *Rhus pentaphyllum*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 10: 32.

Martinez A. (2005). Flavonoides. *Farmacognosia*. Universidad de Antioquia. Septiembre.

Ministerio de protección social. Resolución 2514 de 1995. "por el cual se reglamenta la guía para el desarrollo y presentación de los estudios de estabilidad". República de Colombia. 2006. Disponible en: <http://www.minsalud.gov.co>.

Ministerio de protección social. Circular externa DG-100-007-07. "por la cual se especifican las condiciones de temperatura y humedad para estudios de estabilidad a largo plazo". República de Colombia. 2007.

Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 26: 211–219.

Mussatto S., Ballesteros L., Martins S., Teixeira J. (2011). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds .*Separation and Purification Technology*.83: 173 -179.

Nguyen T., Liu B., Zhao J., Thomas D., Hook J. (2013). An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. *Food Chemistry*.136: 186–192.

Ortman C. (2013). Avaliação da estabilidade de extratos, frações e flavonoides C-glicosídeos presentes em *Cecropia glaziovii*. (2013). Tesis posgrado en farmacia. Universidad federal de santa Catarina. p 83.

Pardo J., Fontanilla R., Ospina L.F., Espinosa L. (2008). Determining pharmacological activity of *Physalis peruviana* fruit juice on rabbit eyes and fibroblast primary cultures. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 49: 3074.

Parr A., Bolwell G. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 985-1012.

Patel D., Patel K., Dhanabal S. (2012). Phytochemical standardization of *Aloe Vera* extract by HPTLC techniques. *Journal of Acute Disease*. 47-50.

Petronilhoa S., Maraschinb M., Coimbraa M., Rochaa S. (2012). In vitro and in vivo studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricariarecutita L*).*Industrial Crops and Products*. 40: 1-12.

Puente L., Pinto-Muñoz C., Castro E., Cortés M. (2011). *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. Food Research International. 44:1733–1740.

Pyrzynska K., Biesaga M. (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. Trends in Analytical Chemistry. 28: 7.

Ramadan M. (2011). Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): An overview. Food Research International. 44:1830–1836.

Reina T. (2014). Propuesta de un marcador analítico como herramienta en la microencapsulación de un extracto con actividad antioxidante de cálices de *Physalis peruviana*. Tesis de maestría no publicada. Universidad Nacional. Bogotá. Colombia.

Rice-Evans C., Miller N., Paganga G. (1995). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology & Medicine. 20: 933-956.

Rice-Evans C. (2001). Flavonoid antioxidants. Current Medicinal Chemistry. 8: 797-807.

Robins., Kumar., Cotran. "Patología Humana". Séptima Edición. Elsevier. España.

Rop O., Mlcek J., Jurikova T., Valsikova M. (2012). Bioactive content and antioxidant capacity of Cape gooseberry fruit. Cent. Eur. J. Biol. 7: 672-679.

Rolim A., Haroutiounian C., Sarrut F., Tavane R., Claudinea V., Zigzag V., Pinheiro E., Kaneko M., Velasco M. (2008). Estabilidad y en el estudio de la penetración in vitro de rutina incorporada en una emulsión cosmética a través de un modelo de biomembrana alternativa. Revista Brasileña de Ciencias Farmacéuticas. 44.

Schijlen., E.G.W.M., Ric de Vos, C.H., van Tunen, A.J., Bovy, A.G. (2004). Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. Phytochemistry. 65: 2631-2648.

Sen S., Chakraborty R., De B. (2011). Challenges and opportunities in the advancement of herbal medicine: India's position and role in a global context. *Journal of herbal medicine*. 1: 67-75.

Singh S., Bakshi M. (2000). Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs .*Pharmaceutical Technology On-Line*. 1-14.

Soto C., Caballero E., Pérez E., Zúñiga M.E. (2013).Effect of extraction conditions on total phenolic content and antioxidant capacity of pretreated wild *Peumusboldus* leaves from Chile. *Food and bioprocess processing*. 409:6.

Stalikas C. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*. 30: 3268-3295.

Tao Y., Wu D., Zhang Q., Sun D. (2014). Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: Modeling, optimization and stability of extracts during storage. *Ultrasonics Sonochemistry*. 21:706-715.

Thakur L., Ghodasra U., Patel N., Dabhi M. (2011).Novel approaches for stability improvement in natural medicines .*Pharmacogn. Rev*.5:48-54.

Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Falleh H., Oueslati S.,Soumaya B., Hajlaoui H., Abdelly C.(2010). Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT – Food Sci. Technol*. 43: 632–639.

Vasco C., Ruales J., Kamal-Eldin A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador.*FoodChemistry*.111: 816–823.

Vilaplana A., Baenas N., Villaño D.,Speisky H., García-Viguera C., Moreno D. (2014). Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects. *Journal of functional foods*. 7: 599-608.

Wills R., Lee T., Mcglasson W., Hall E. (1984).Fisiología y manipulación de hortalizas pos/-recolección. Ed. Acribia. p 3-41.

Wiseman H., Halliwell B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J.* 13:17-29.

Wu S., Ng L., Huang Y., Lin D., Wang S., Huang S., Lin C. (2005). Antioxidant Activities of *Physalis peruviana*. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 963 - 966.

Wu S., Tsai J., Chang S., Lin D., Wang S., Huang S., Ng L. (2006). Supercritical carbon dioxide extract exhibits enhanced antioxidant and anti-inflammatory activities of *Physalis peruviana*. *Journal of Ethnopharmacology.* 108: 407-413.

Xie J., Shi L., Zhu X., Wang P., Zhao Y., Su W. (2011). Mechanochemical-assisted efficient extraction of rutin from *Hibiscus mutabilis L.* *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 12: 146–152.

Yang J., Guo J., Yuan J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT.* 41: 1060-1066.

Yang Y., Zhang F. (2008). Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrasonics Sonochemistry* 15 : 308–313.

Zapata J., Saldarriaga A., Londoño M., Díaz C. (2002). “Manejo del cultivo de uchuva en Colombia”. Ed. Tiraje. pp 34-35.

Zavala D., Quispe A., Posso M., Rojas J., Vaisberg A. (2006). Efecto citotóxico de *Physalis peruviana* (capulí) en cáncer de colon y leucemia mieloide crónica. *Ann FacMed Lima.* 67: 283.

Zhou Q., Sun S., Du D., Liang X., Yang X. (2000). Real time monitor of rutin stability during heating by Fourier transform infrared spectroscopy. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen X.* 20: 8-195.

Zuorro A., Lavecchia R. (2013). Influence of extraction conditions on the recovery of phenolic antioxidants from spent coffee grounds. *American Journal of Applied Sciences* 10: 478-486