



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Polifenoles, flavonoides y actividades antioxidante,
anticolagenasa, y antielastasa *in vitro* del extracto
hidroalcohólico de tallos y hojas de *Krapfia
weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr “Rima
Rima”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Lourdes VICTORIA TINOCO

ASESOR

Dr. Américo Jorge CASTRO LUNA

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Victoria L. Polifenoles, flavonoides y actividades antioxidante, anticolagenasa, y antielastasa in vitro del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr “Rima Rima” [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2022.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Lourdes Victoria Tinoco
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	47599255
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-7359-9913
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Américo Jorge Castro Luna
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25455526
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-8012-967X
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Pablo Enrique Bonilla Rivera
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07212707
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Carlos Alejandro Bell Cortez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Mónica Guadalupe Retuerto
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09481617
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Bertran Santiago Trujillo
Tipo de documento	DNI

Número de documento de identidad	07186287
Datos de investigación	
Línea de investigación	Recursos y productos naturales con potencial farmacéutico, alimentario, cosmético y terapéutico.
Grupo de investigación	No aplica
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio; (Instituto de investigación en Ciencias farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM) Jr. Puno 1002, Jardín Botánico- Lima 1- Perú. Longitud: 12.0558007 Latitud: 77.0257352,17
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Agosto 2019 – Noviembre 2021
URL de disciplinas OCDE	Química orgánica https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.04.01 Bioquímica https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Polifenoles, flavonoides y actividades antioxidante, anticolagenasa, y antielastasa in vitro del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr "Rima Rima"

Que presenta la Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

LOURDES VICTORIA TINOCO

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, ha obtenido la siguiente calificación final:

17 Aprobado con mención honrosa

de conformidad con el Art. 14.º del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la obtención del Título Profesional de Químico Farmacéutico (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

JURADO EXAMINADOR Y CALIFICADOR (R.D. N.º 000436-2022-D-FFB/UNMSM)

- Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera
- Dr. Carlos Alejandro Bell Cortez
- Mg. Mónica Guadalupe Retuerto Figueroa
- Mg. Bertran Santiago Trujillo

Lima, 08 de noviembre de 2022.

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera
Presidente



INFORME DE EVALUACIÓN DE CRITERIOS DE ORIGINALIDAD

1	Facultad	FARMACIA Y BIOQUÍMICA
2	Escuela	FARMACIA Y BIOQUÍMICA
3	Autoridad que emite el informe de originalidad	Director de la Escuela Profesional
4	Apellidos y nombres de la autoridad académica	Luis Miguel V. Felix Veliz
5	Operador del programa informático de similitudes	Luis Miguel V. Felix Veliz
6	Documento evaluado	Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico: Polifenoles, flavonoides y actividades antioxidante, anticolesterol, y antielastasa <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de <i>Krapfia weberbaueri</i> (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr "Rima Rima"
7	Autor(es) del documento	Br. Victoria Tinoco Lourdes
8	Fecha de recepción del documento	27/09/2022
9	Fecha de aplicación del programa informático de similitudes	28/09/2022
10	Software utilizado	Turnitin
11	Configuración del programa detector de similitudes	Excluye: - Textos entrecomillados - Bibliografía - Cadenas menores de 40 palabras
12	Porcentaje de similitud según programa detector de similitudes	10 % (El % de similitud debe ser \leq 10%)
13	Fuentes originales de las similitudes encontradas	<ul style="list-style-type: none">• Fuentes de internet varias 10 %• Publicaciones 7 %• Trabajo de estudiantes entregados a otras universidades 4 %
14	Observaciones	Realizar la edición final de la tesis. Procede la sustentación.
15	Calificación de originalidad	Documento cumple con los criterios de originalidad.
16	Fecha del informe	28/09/2022

Nota: se adjunta archivo de reporte del sistema Turnitin en el que se resaltan las similitudes detectadas.



UNMSM

Firmado digitalmente por FELIX
VELIZ Luis Miguel Visitacion FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 28.09.2022 11:15:28 -05:00

Dr. Luis Miguel V. Felix Veliz

DEDICATORIA

Agradezco a Dios por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida; y por lo que día a día pone en mi camino.

A mi madre, el motor de mi vida, por ser mi soporte y fortaleza, por todo su apoyo y amor incondicional, por los valores que me ha inculcado, y por sus sabios consejos que me han conllevado a ser una persona de bien y profesional.

A mi familia por darme todo su amor, apoyo, durante toda mi carrera profesional, y siempre demostrarme que todo es posible.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento especial al Dr. Américo Castro Luna, mi asesor de tesis, por sus grandes enseñanzas, confianza, apoyo y gran orientación profesional en la elaboración y culminación de la presente tesis.

A mi Grupo de Investigación “Recursos Naturales”, a los profesores por sus enseñanzas brindadas, a los asistentes y tesistas de por los momentos compartidos de apoyo, conocimiento y amistad que me permitieron enrumbar mi investigación.

A los distinguidos miembros del Jurado Examinador y Calificador por sus conocimientos, sugerencias y correcciones brindadas en la presente investigación.

A mis profesores y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM por impartirme sus grandes enseñanzas y brindarme una formación profesional correcta y con principios.

ÍNDICE

RESUMEN ABSTRACT

Pág.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis	3
1.2 Objetivos	3
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Antecedentes de la investigación	4
2.2 Aspecto botánico	5
2.3 Aspecto químico general	9
2.4 Compuestos bioactivos	11
2.5 Radicales libres y antioxidantes	13
2.6 La piel y el envejecimiento	17
2.7 Métodos de determinación de actividad antioxidante y antienzimática	21
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	22
3.1 Tipo y diseño de investigación	22
3.2 Flujograma del trabajo experimental	22
3.3 Materiales, equipos y reactivos	23
3.4 Colecta e identificación botánica	24
3.5 Procesamiento de la muestra	24
3.6 Determinación de polifenoles totales y flavonoides	25
3.7 Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i>	28
3.8 Determinación de la actividad antienzimática <i>in vitro</i>	32
3.9 Análisis estadístico	35
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	36
4.1 Tamizaje fitoquímico	36
4.2 Rendimiento del extracto	37
4.3 Solubilidad del extracto	37
4.4 Determinación de compuestos fenólicos y flavonoides	38
4.5 Actividad antioxidante <i>in vitro</i>	38
4.6 Actividad antienzimática <i>in vitro</i>	42
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	45
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	56
CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES	57
CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
CAPÍTULO IX. ANEXOS	74

LISTA DE ABREVIATURAS

AAEAC	Capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico
ABTS^{•+}	2,2'-azinobis (3-ácido etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ANOVA	Análisis de varianza de un solo factor
ADN	Acido desoxirribonucleico
BHA	Butilhidroxianisol
CT	Catalasa
CC	Cromatografía en columna abierta
CPDs	Dímeros de ciclobutanopirimidina
CR	En Peligro Crítico
CV	Coefficiente de variación
DE	Desviación estándar
DPPH[•]	2,2-difenil-1-picrihidrazil
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGCG	Galato de epigallocatequina
EN	En Peligro
FRAP	Poder antioxidante reductor del hierro
GAE	Equivalentes a ácido gálico
GP	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión y polaridad
IC 50	Concentración mínima inhibitoria

MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinasas
NF-kB	Factor nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
O₂⁻	Superóxido
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
OH⁻	Hidroxilo
QE	Equivalentes a quercetina
RL	Radicales libres
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente a trolox
TLC	Cromatografía en capa fina preparativa
TROLOX®	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico
UV	Radiación ultravioleta (A, B, C)
VU	Vulnerable
XO	Xantina oxidasa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hidrolisis del ranunculósido Ranunculina.....	10
Figura 2. Ácidos fenólicos en alimentos: Ácidos benzoicos y ácidos cinámicos. .	12
Figura 3. Estructura base y tipos de flavonoides.....	13
Figura 4. Factores intrínsecos y extrínsecos del envejecimiento cutáneo.....	20
Figura 5. <i>Krapfia weberbaueri</i> (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr “Rima Rima”.....	24
Figura 6. Obtención del extracto hidroalcohólico. A. Filtración al vacío, B. Concentración en evaporador rotatorio, C. Extracto obtenido	25
Figura 7. Mecanismo sugerido de formación del complejo aluminio-flavonoide...	27
Figura 8. Reacción química en el ensayo DPPH•	28
Figura 9. Reacción química en el ensayo ABTS ^{•+}	29
Figura 10. Reducción del complejo [Fe(TPTZ)] ⁺³ por la adición de antioxidantes	31
Figura 11. Curva de inhibición del radical DPPH• del extracto hidroalcohólico de <i>Krapfia weberbaueri</i> (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr.....	39
Figura 12. Curva de inhibición del radical ABTS ^{•+} del extracto hidroalcohólico de <i>Krapfia weberbaueri</i> (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr.....	40
Figura 13. Curva de reducción del Fe ⁺³ del extracto hidroalcohólico de <i>Krapfia weberbaueri</i> (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr.	41
Figura 14. Curva de inhibición de la enzima colagenasa del extracto hidroalcohólico de <i>Krapfia weberbaueri</i> (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr.....	43
Figura 15. Curva de inhibición de la enzima elastasa del extracto hidroalcohólico de <i>Krapfia weberbaueri</i> (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr.....	44
Figura 16. Solubilidad del extracto en solventes polares y apolares	79
Figura 17. Solubilidad del extracto en mezcla de solventes (7:3).....	79
Figura 18. Curva de calibración de ácido gálico.....	80
Figura 19. Curva de calibración de quercetina.....	81
Figura 20. Inhibición del radical DPPH• del estándar Trolox [®]	82
Figura 21. Inhibición del radical ABTS ^{•+} del estándar Trolox [®]	83
Figura 22. Curva de calibración de ácido ascórbico.....	84
Figura 23. Curva de inhibición enzimática de colagenasa de EGCG.....	85
Figura 24. Curva de inhibición enzimática de elastasa de EGCG	86
Figura 25. Espectrofotómetro UV-VIS. Marca: Thermo Scientific. Modelo: GENESYS 10S UV-Vis	92

Figura 26. Centrifuga. Marca: Hettich. Modelo: ROTOFIX 32	92
Figura 27. Vórtex. Marca: SCILOGEX. Modelo: MX-S	92
Figura 28. Potenciómetro. Marca: Milwaukee. Modelo: Mi 151	93
Figura 29. Balanza Analítica. Marca: A&D Company, Limited. Modelo: HR-250AZ	93
Figura 30. Laboratorio de Semisíntesis Orgánica	94
Figura 31. Desarrollo de ensayos.....	94
Figura 32. Reactivos DPPH• y ABTS	95
Figura 33. Estándar de Quercetina y Trolox®	95
Figura 34. Reactivo Folin & Ciocalteu y Carbonato de sodio anhidro	96
Figura 35. Homogenización en Vórtex y Centrifuga	96
Figura 36. Método Folin-Ciocalteu en estándar ácido gálico.....	97
Figura 37. Resultados de Método Folin-Ciocalteu en extracto de “Rima Rima” ...	97
Figura 38. Método de formación de complejo con tricloruro de aluminio del estándar de quercetina	98
Figura 39. Método de formación de complejo con tricloruro de aluminio en “Rima Rima”	98
Figura 40. Resultados de Metodología DPPH• en “Rima Rima”	99
Figura 41. Resultados de Metodología ABTS en “Rima Rima”	99
Figura 42. Estándar ácido ascórbico y preparación de reactivos FRAP.....	100
Figura 43. Resultados de Metodología FRAP en “Rima Rima”	100
Figura 44. Preparación de reactivos actividad anticlagenasa.....	101
Figura 45. Reactivos de actividad anticlagenasa. Buffer Tris Glycine, sustrato y enzima	101
Figura 46. Reactivos actividad antielastasa, sustrato y enzima	102
Figura 47. Preparación de reactivos de actividad antielastasa.....	102

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Flavonoides identificados en tallos y hojas de especies <i>Ranunculus</i>	9
Tabla 2. ROS más importantes, lugar de origen y reactividad.....	14
Tabla 3. Antioxidantes endógenos.....	16
Tabla 4. Antioxidantes exógenos.....	17
Tabla 5. Protocolo de cuantificación de polifenoles totales	26
Tabla 6. Protocolo de cuantificación de flavonoides	27
Tabla 7. Protocolo de capacidad antioxidante frente al radical DPPH•.....	29
Tabla 8. Protocolo de capacidad antioxidante frente al radical ABTS ⁺⁺	30
Tabla 9. Protocolo de capacidad antioxidante FRAP	32
Tabla 10. Protocolo de actividad anticolagenasa.....	33
Tabla 11. Protocolo de actividad antielastasa.....	34
Tabla 12. Tamizaje Fitoquímico del extracto hidroalcohólico de <i>Krapfia weberbaueri</i> (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr	36
Tabla 13. Rendimiento del extracto hidroalcohólico de <i>Krapfia weberbaueri</i> (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr.....	37
Tabla 14. Ensayo de solubilidad del extracto hidroalcohólico de <i>Krapfia weberbaueri</i> (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr	37
Tabla 15. Cuantificación de metabolitos secundarios.....	38
Tabla 16. Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de <i>Krapfia weberbaueri</i> (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr frente al radical DPPH•	38
Tabla 17. Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de <i>Krapfia weberbaueri</i> (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr frente al radical ABTS ⁺⁺	39
Tabla 18. Poder reductor férrico del extracto hidroalcohólico de <i>Krapfia weberbaueri</i> (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr.	40
Tabla 19. Capacidad antioxidante total de <i>Krapfia weberbaueri</i> (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr.	41
Tabla 20. Actividad inhibidora de la enzima colagenasa del extracto hidroalcohólico de <i>Krapfia weberbaueri</i> (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr.....	42
Tabla 21. Actividad inhibidora de la enzima elastasa del extracto hidroalcohólico de <i>Krapfia weberbaueri</i> (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr.....	43
Tabla 22. Resultados de Pruebas Fitoquímicas	75
Tabla 23. Resultado de absorbancias-ácido gálico.....	80

Tabla 24. Resultado de absorbancias-quercetina.....	81
Tabla 25. Captación del radical DPPH• por el estándar Trolox®.....	82
Tabla 26. Captación del radical ABTS ^{•+} del estándar Trolox®.....	83
Tabla 27. Poder reductor del ácido ascórbico	84
Tabla 28. Inhibición de la enzima colagenasa del estándar EGCG.....	85
Tabla 29. Inhibición de la enzima elastasa del estándar EGCG.....	86

RESUMEN

Krapfia weberbaueri (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr “Rima Rima” es una planta endémica peruana conocida por crecer en la alta montaña, y su uso medicinal tradicional. Actualmente no presenta estudios fitoquímicos, antioxidantes o enzimáticos, por tal motivo, el objetivo de este estudio fue evaluar polifenoles, flavonoides, actividad antioxidante, anticolagenasa y antielastasa *in vitro* del extracto hidroalcohólico de sus tallos y hojas. Mediante pruebas fitoquímicas se identificaron polifenoles, flavonoides, triterpenoides, lactonas, glucósidos, antraquinonas y taninos. Los métodos de Folin-Ciocalteu y formación del complejo de flavonoides con tricloruro de aluminio, cuantificaron $5,7459 \pm 0,0127$ mg GAE/g y $86,7086 \pm 0,0656$ mg QE/g de compuestos fenólicos y flavonoides, respectivamente. En la medición de actividad antioxidante los resultados demostraron inhibición de radicales libres en los métodos DPPH•, ABTS^{•+}, reducción del hierro férrico en el método FRAP ($p < 0,05$) y se expresaron en capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC-DPPH• y ABTS^{•+}) y ácido ascórbico (AAEAC-FRAP), obteniéndose 31,2018 mg/g, 87,7822 mg/g y 315,3846 μ mol AA/g de extracto, respectivamente. La evaluación de la actividad antienzimática se realizó por inhibición de las enzimas colagenasa y elastasa; obteniéndose buena actividad anticolagenasa superior al estándar de galato de epigallocatequina con un IC 50 de 50,9573 μ g/mL y frente a la enzima elastasa no se obtuvo inhibición mayor del 50 % de enzima. En conclusión, el extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr “Rima Rima” exhibió actividad antioxidante y anticolagenasa dependiente de su concentración, esta capacidad *in vitro* podría relacionarse con la presencia de los compuestos fenólicos y flavonoides identificados en esta especie.

Palabras clave: *Krapfia*, “Rima Rima”, antioxidante, antienzimática.

ABSTRACT

Krapfia weberbaueri (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr "Rima Rima" is a Peruvian endemic plant known for growing in the high mountains, and its traditional medicinal use. Currently there are no phytochemical, antioxidant or enzymatic studies, therefore, the objective of this study was to evaluate polyphenols, flavonoids, antioxidant, anticollagenase and antielastase activity *in vitro* of the hydroalcoholic extract of its stems and leaves. Phytochemical tests identified polyphenols, flavonoids, triterpenoids, lactones, glycosides, anthraquinones and tannins. The Folin-Ciocalteu and aluminum trichloride flavonoid complex formation methods quantified $5,7459 \pm 0,0127$ mg GAE/g and $86,7086 \pm 0,0656$ mg QE/g of phenolic compounds and flavonoids, respectively. In the measurement of antioxidant activity, the results showed inhibition of free radicals in the DPPH•, ABTS^{•+} methods, reduction of ferric iron in the FRAP method ($p < 0,05$) and were expressed as antioxidant capacity equivalent to trolox (TEAC-DPPH• and ABTS^{•+}) and ascorbic acid (AAEAC-FRAP), obtaining 31,2018 mg/g, 87,7822 mg/g and 315,3846 μ mol AA/g of extract, respectively. The evaluation of the antienzymatic activity was carried out by inhibition of collagenase and elastase enzymes; obtaining good anticollagenase activity superior to the standard of epigallocatechin gallate with an IC 50 of 50,9573 μ g/mL and against the elastase enzyme, inhibition of more than 50 % of the enzyme was not obtained. In conclusion, the hydroalcoholic extract of stems and leaves of *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr "Rima Rima" exhibited concentration-dependent antioxidant and anticollagenase activity, this *in vitro* capacity could be related to the presence of phenolic and flavonoid compounds identified in this species.

Keywords: *Krapfia*, "Rima Rima", antioxidant, antienzymatic.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido utilizadas desde la antigüedad por el ser humano por sus propiedades medicinales, actualmente son empleadas para el alivio, prevención y tratamiento de enfermedades; muchas de ellas poseen actividades digestivas, genitourinarias, respiratorias, analgésicas, antibacterianas, cicatrizantes, etc. A nivel mundial, la industria farmacéutica utiliza las plantas medicinales como fuentes naturales para extraer, identificar, aislar y producir principios activos destinados a la producción de medicamentos.

En los últimos años han aumentado las investigaciones sobre el efecto oxidante celular ocasionado por radicales libres (RL). Estudios recientes¹⁻³ dilucidan los daños celulares producidos por los RL en el tejido conectivo, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, membranas lipídicas, fibras colágenas, leucocitos, etc.; que conllevan a la producción de enfermedades degenerativas y cardio-cerebrovascular. Las radiaciones ultravioletas incrementan la producción de estas especies reactivas, desencadenando enfermedades cutáneas como envejecimiento, cáncer de piel y una gran variedad de fotolesiones. De igual forma concluyen que los metabolitos secundarios participan en la prevención y tratamiento de algunas enfermedades, estos protegen a las células neutralizando el exceso de los RL y disminuyen el daño celular producido.

El Perú es un país megadiverso, donde el conocimiento de nuestras especies vegetales ha ido aumentando como resultado de nuevos registros y descripciones. Parte de nuestra riqueza floral, es *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr, una planta altoandina conocida por sus vistosas flores rojas, y por el uso de sus flores en los niños tímidos o que tienen dificultades al hablar y el uso de las hojas para el alivio de los dolores reumáticos, caracterizada también por habitar en condiciones climáticas muy variables. Los pobladores expresan que “el poder medicinal de las plantas proviene de nuestros antepasados que aún están presentes en las altas montañas” y las plantas silvestres que crecen entre los pedregales han “sobrevivido a los periodos de cataclismo”, es decir representa un

conjunto de creencias ancestrales que prevalecen y son relevantes en nuestra cultura andina.

“Rima Rima” es una planta endémica del género *Ranunculus* que no presenta estudios en relación con sus compuestos bioactivos, y actividades biológicas; no obstante en revisiones fitoquímicas y etnofarmacológicas⁴ exponen el interés por la identificación y evaluación de los componentes químicos de las especies de este género, han encontrado en ellas actividades antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria y la presencia de polifenoles, alcaloides, terpenoides, entre otros.

Con la finalidad de contribuir e incentivar la investigación de nuestras plantas medicinales, se realizó el presente estudio del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr “Rima Rima”, donde se evaluó la presencia de polifenoles, flavonoides y actividades antioxidante, anticolagenasa, y antielastasa *in vitro*. Los resultados indican la presencia de compuestos bioactivos con actividad antioxidante, y acción preventiva del envejecimiento cutáneo. Al contrarrestar los efectos de los RL, pueden tener actividades terapéuticas prometedoras y, posteriormente, podrían convertirse en parte de las fuentes naturales de productos farmacéuticos y cosméticos. Es importante resaltar también que estas actividades enzimáticas no han sido evaluadas en otras especies de este género endémico, lo que otorga mayor valor al presente estudio, por lo que es importante mantener, preservar y desarrollar una cadena de valor en la investigación y el uso sostenible de nuestras plantas medicinales.

1.1 Hipótesis

El extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr “Rima Rima” presenta polifenoles, flavonoides y actividades antioxidante, antielastasa, y anticologenasa *in vitro*.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Evaluar polifenoles, flavonoides, actividad antioxidante, anticologenasa y antielastasa del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr “Rima Rima”.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Determinar el contenido de polifenoles y flavonoides del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr “Rima Rima”, mediante el método de Folin-Ciocalteu y formación de un complejo de flavonoides con el tricloruro de aluminio respectivamente.
2. Determinar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr “Rima Rima”, mediante los métodos de captación del radical 2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH•), radical ácido 2,2'-azinobis (3-etilbezotiazolin)-6-sulfónico (ABTS^{•+}) y poder reductor férrico (FRAP).
3. Determinar la actividad anticologenasa y antielastasa del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr “Rima Rima” mediante la inhibición enzimática de las enzimas colagenasa y elastasa en una reacción enzima-sustrato.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

En diversos países, las especies *Ranunculus* han sido objetivo de estudios de actividades biológicas; no obstante, faltan estudios completos de aislamiento, y evaluación de las propiedades de sus extractos. *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr “Rima Rima”, planta endémica peruana perteneciente a este género, no presenta estudios relacionados a su composición química y actividades farmacológicas.

En un estudio de desarrollo reproductivo a condiciones de luz y temperatura controlada, Roca et al.⁵ evaluaron la diferencia en características morfológicas y aspectos reproductivos de *Krapfia weberbaueri* Standl. & J.F. Macbr recolectada en el distrito de Chacas (Ancash-Perú) durante los meses de mayo, agosto y setiembre. Las plantas del mes de mayo obtuvieron mayor número de pistilos, aquenios, estambres y fertilización, por consiguiente, concluyeron que estos factores ejercen resultados favorables en el desarrollo floral y proceso reproductivo de la especie.

Roca⁶ en un estudio morfohistológico de *Ranunculus weberbaueri* (Ulbr.) Lourteig observó que esta planta altoandina adapta sus características morfológicas como estrategia para paliar las condiciones climáticas restrictivas: tallos floríferos con epidermis uniestratificada e hipodermis, hojas con tejido empalizado y raíz con epidermis gruesa y suberificada que podría deberse a las condiciones frías del suelo.

En el Perú, Lehnebach et al.⁷ realizaron estudios filogenéticos de los géneros *Krapfia* y *Laccopetalum*, mediante la secuenciación matK del cpDNA encontraron que estos géneros conforman un mismo clado y comparten caracteres morfológicos: flores grandes subglobosas, androginóforo con región estaminal y carpelar, hojas coriáceas, sépalos gruesos y receptáculos carnosos. En otros países también han realizado análisis moleculares en la familia Ranunculaceae con

el fin de establecer una clasificación completa en la que se informen todos los cambios evolutivos y caracteres compartidos a través del tiempo⁸.

El extracto etanólico de flores de *Laccopetalum giganteum*⁹ e hidroalcohólico de raíces de *Ranunculus praemorsus* H.B.K. ex DC¹⁰, plantas estudiadas en Lima-Perú, han demostrado *in vivo* efectos estimulante de la actividad reproductiva y propiedades cicatrizantes en ratas, respectivamente.

En otros lugares además de la identificación de metabolitos secundarios, se han evaluado y reportado algunas actividades farmacológicas y antimicrobianas: capacidad antioxidante en *Ranunculus muricatus*¹¹, *Ranunculus bulbosus*¹², *Ranunculus macrophyllus*¹³, *Ranunculus sardous*, *Ranunculus ficaria*¹⁴; actividad antiinflamatoria *in vivo* en *Ranunculus sceleratus*¹⁵ e *in vitro* en *Ranunculus japonicum*; actividad antibacteriana contra *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Echerichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, en *Ranunculus marginatus* y *Ranunculus laetus*⁴, en *Ranunculus aestivalis* actividad frente a *Klebsiella pneumoniae* y actividades citotóxicas *in vitro* en células tumorales de *Ranunculus sieboldii* y *Ranunculus ternati*⁴.

Investigaciones similares realizadas en los extractos hidroalcohólicos de *Bixa orellana*, *Oenothera rosea*¹⁶, *Myrciaria dubia*, *Caesalpinia spinosa*¹⁷, *Leissonia nigrescens* Bory¹⁸, y *Eisenia cokeri*¹⁹ han demostrado una relación directa dependiente entre la inhibición *in vitro* de radicales libres y de las metaloproteinasas colagenasa y elastasa con la presencia moderada de diversos tipos de compuestos fenólicos.

2.2 Aspecto botánico

Krapfia D.C es un género reducido a su sinónimo de *Ranunculus* L^{20,21}, *Ranunculus weberbaueri* es conocida con el nombre de “Rima Rima” que significa “hablar”²².

2.2.1 Taxonomía

De acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist (1988), el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos realizó la identificación y clasificación taxonómica de la especie (Anexo 1).

División	:	MAGNOLIOPHYTA
Clase	:	MAGNOLIOPSIDA
Subclase	:	MAGNOLIDAE
Orden	:	RANUNCULALES
Familia	:	RANUNCULACEAE
Género	:	<i>Krapfia</i>
Especie	:	<i>Krapfia weberbaueri</i> (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr

Nombre vulgar: “Rima Rima”

2.2.2 Descripción morfológica

Planta herbácea perenne, con rizoma corto y de hasta 15 cm de altura en floración. Tallo vegetativo subterráneo y tallo florífero con longitud de 3,4 cm y 22 cm, respectivamente. Flores globulares, grandes y llamativas en una variedad de tonos, desde rojos hasta amarillo verdoso, generalmente, se encuentra una flor por planta. El fruto (aquenio) mide con 2,7 mm de largo, se dispersa en los periodos de senescencia, y su coloración es de verde oscuro a guinda. La floración anual es mayor entre los meses de mayo y agosto. Sus hojas son pecioladas, ascendentes, de color verde intenso con 178 mm de longitud^{6,23}.

2.2.3 Distribución geográfica y hábitat

La familia Ranunculaceae se encuentra distribuida ampliamente en muchos países, comprende alrededor de 59 géneros, 2 500 especies y 19 géneros monotípicos. Mayormente, sus géneros prefieren el clima templado o frío y crecen en zonas

alpinas²⁴. En el Perú es reconocida por presentar 8 géneros y 50 especies, principalmente hierbas²⁵, uno de los géneros endémicos ubicados en Los Andes Peruanos es el género *Krapfia* D.C, distribuido a una altitud de 3 500 m en América del Sur (Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú)⁶. El género *Ranunculus* es el género que aporta mayor riqueza de especies a esta familia, y se ha caracterizado como cosmopolita por su distribución en regiones templadas y frías del hemisferio norte, en las partes altas de las montañas del trópico y del hemisferio sur²⁶.

Krapfia weberbaueri (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr ha sido reportada en los departamentos de Ancash, Junín, Huánuco y San Martín²². Habita en laderas rocosas húmedas⁶, crece en la montaña y montaña alta en las regiones de los Andes peruanos entre los 3 000 y 4 500 msnm²³. Esta planta endémica peruana se clasificó como Vulnerable en el 2006, y en la actualidad se encuentra en la categoría de En Peligro según los Criterios de la International Union for Conservation of Nature (IUCN)²⁷. Actualmente su extensión de presencia estimada es menor a 5 000 km², tiene una población severamente fragmentada, y una reducción continúa del número de individuos maduros²⁸. La extracción en medio silvestre y el cambio climático son sus principales amenazas^{6,29}.

Ancash es un departamento del Perú caracterizado por sus grandes rangos altitudinales y especies endémicas²⁷. Cano³⁰ realizó un análisis de la riqueza taxonómica, encontrando además de “Rima Rima” otras especies resaltantes como *Laccopetalum giganteum* (género endémico departamental) y *Ranunculus limoselloides* entre roquedales y bofedales, respectivamente. Ramírez, D³¹ en los humedales de Conocha-Ancash reportó al género *Ranunculus* como uno de los géneros con mayor número de especies: *Ranunculus limoselloides* Turcz., *Ranunculus cimbalaria* Pursh, *Ranunculus flagelliformis* Smith, *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC., y *Ranunculus trichophyllus* Chaix ex Vill (plantas hidrofitas).

En otros departamentos del Perú, se han reportado la presencia de especies pertenecientes a la familia Ranunculaceae: *Ranunculus haemanthus*, *Ranunculus limoselloides*, *Ranunculus macropetalus*, *Ranunculus praemorsus*, *Clematis*

seemani, *Thalictrum decipiens* en Huancayo (Junín-Perú)³². *Ranunculus peruvianus*, *Ranunculus praemorsus*, *Ranunculus psychophilus*, *Ranunculus podocarpum*, *Clematis haenkiana*, *Anemone helleborifolia* en Pulan (Cajamarca-Perú)³³. En Ayacucho-Perú se ha descubierto otra especie del género *Krapfia* llamada *Krapfia grace-servatae*³⁴.

2.2.4 Uso medicinal tradicional

Cerca de la Cordillera Blanca (Ancash-Perú), tradicionalmente es usada en los niños que tienen dificultades para hablar o son muy tímidos, se cree que cuando sus flores se golpean tres veces en los labios del niño, el habla fluye desde el interior del cuerpo hasta la boca. Las hojas son utilizadas para el alivio de los dolores reumáticos, los pobladores mencionan que “el reumatismo es causado por acumulación de agua en los huesos y articulaciones”, y por aplicación tópica de sus hojas, previamente trituradas y hervidas, se forman ampollas que se abren y liberan el líquido interno. Las flores también tienen usos ornamentales por ser muy llamativas, son utilizadas para decorar imágenes sagradas durante las procesiones, y las mujeres las emplean como adornos en sus sombreros³⁵. Anteriormente en el distrito de Conchucos (Ancash-Perú) en épocas de sequías largas, los campesinos recolectaban las hojas y las ponían como ofrenda y las lluvias aparecían³⁶.

Las plantas altoandinas tienen muchas creencias tradicionales, los pobladores consideran que estas plantas han sido campos de cultivo y jardines de nuestros antepasados. Afirman que “las fuerzas de las plantas medicinales provienen de la montaña misma porque los espíritus de nuestros ancestros aún están presentes”.

Otras plantas de Ancash-Perú comparten el mismo uso medicinal de hojas, tallos y flores para enfermedades reumáticas además de afecciones de garganta y pulmón, entre ellas, *Laccopetalum giganteum* (Wedd.) Ulbr., *Ranunculus gusmanii* Humb., *Ranunculus polystachyus* Lourteig³⁷.

En otros países, especies de *Ranunculus* comparten el mismo uso medicinal, usan casi todas las partes de la planta para el tratamiento del reumatismo, fiebre y es preparado como decocción, cabe mencionar que también son usadas como antiespasmódicos, diaforéticos, antihelmínticos y mejora de abscesos internos; las

más estudiadas son *Ranunculus sceleratus*, *Ranunculus bulbosus*, *Ranunculus arvensis*, ubicados en Europa, Asia, India, USA, entre otros⁴.

2.3 Aspecto químico general

2.3.1 Composición química

El género *Ranunculus* y la familia *Ranunculaceae* se caracterizan por la presencia de diferentes tipos de glucósidos y lactonas. Autores afirman que algunos de estos constituyentes son tóxicos, pero estas toxinas pueden eliminarse al calentar o secar la planta^{15,26}. Se han identificado también varios tipos de flavonoides³⁸.

Tabla 1. Flavonoides identificados en tallos y hojas de especies *Ranunculus*

Compuesto	Tipo de flavonoide
Luteolina, apigenina ^{b, c}	Flavona
Schaftósido, isoschaftósido ^c	
Quercetina-7-O-β-D-Glucósido ^{a, c}	Flavonol
Quercetina ^{b, c}	
Rutina, isoquercitrina, miricetina, kaempferol-7-O-β-D-Glucósido	
quercetina-4'-O--β-D-Glucósido	
glucósido de Isorhamnetina-7-O-β-D	
kaempferol, isorhamnetina ^c	
Dihidromiricetina ^c	Dihydroflavonol

^a *Ranunculus muricatus*, ^b *Ranunculus japonicus*, ^c *Ranunculus ternatus*

Fuente: Hao³⁸

Ranunculina.- Es un glucósido característico de la familia *Ranunculaceae*³⁹. Cuando la planta se deja secar o los tejidos se trituran, se hidroliza y se convierte en protoanemonina, esta a su vez se dimeriza en anemonina (lactona inocua)⁴⁰. Es citotóxica frente a las células de leucemia murina P 388⁴¹.

Protoanemonina.- Es una lactona tóxica presente mayormente en flores y tallos⁴². Al masticarlas hojas de *Ranunculus* producen sensaciones de ardor⁴³, en flores de *Ranunculus arvensis* ha producido quemaduras en la piel, por consiguiente,

siempre se recomienda hervir y enfriar las plantas antes de aplicarlas en la zona de dolor⁴⁴. En *Ranunculus bulbosus* ha presentado actividades antimicrobianas frente a aerobios y anaerobios, con mayor actividad para *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y otras especies de Streptococcus⁴⁵. Sus propiedades las atribuyen a su alta lipoficidad y reactividad química⁴⁶.

Anemonina.- No posee propiedades vesicantes; sin embargo, en ensayos *in vitro* a concentraciones mayores de 25 µg/mL disminuyó la proliferación de queratinocitos⁴⁷. Se ha demostrado que es menos sedante y más antipirética que la protoanemonina⁴⁸.

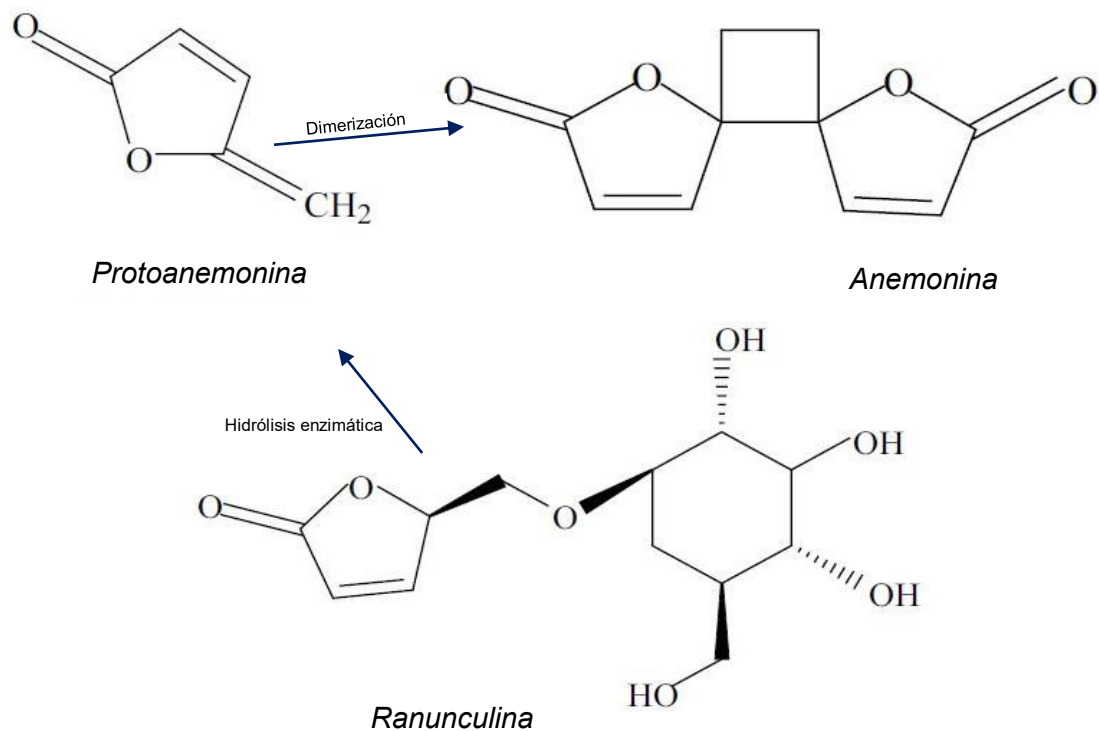


Figura 1. Hidrolisis del ranunculósido Ranunculina

Fuente: Saroya⁴⁰

Se han identificado en los géneros, Coptis, Clematis y Aconitum, alcaloides del tipo berberina y aporfinoides, glucósidos cardiacos, cianogénicos y saponinas terpenoides por cromatografía en capa fina de raíces^{26,49}. En otras plantas pertenecientes a la familia Ranunculaceae, también se han dilucidado glucósidos

diterpénicos (ranunculósidos)⁵⁰. En el polen presentan compuestos lipídicos, incluidos octanos, amidas de ácidos grasos, hidrocarburos saturados e insaturados, compuestos volátiles, ésteres, alcanos, terpenoides³⁸.

2.4 Compuestos bioactivos

Son los metabolitos secundarios obtenidos en las rutas biosintéticas que desarrollan las especies vegetales, se encuentran en pequeñas cantidades y son de sumo interés por sus efectos farmacológicos. Son componentes importantes de las industrias farmacéuticas, cosmética y la química de alta calidad. Se clasifican principalmente en: terpenos-terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos, cada uno de los cuales pueden tener hasta 15000 tipos de compuestos diferentes⁵¹.

2.4.1 Compuestos fenólicos

Son aquellos compuestos que poseen uno o más de un grupo hidroxilo unido a varios anillos aromáticos, se encuentran como glucósidos o agliconas⁵².

Se clasifican en flavonoides y no flavonoides, los no flavonoides poseen solo un anillo aromático en su estructura química y se subdividen en ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos. Los ácidos fenólicos incluyen a los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos⁵³.

2.4.1.1 Mecanismo de acción antioxidante

Tienen la capacidad de neutralizar especies reactivas cuando transfieren sus electrones o átomos de hidrogeno a los radicales e inhiben el proceso de oxidación.

Los factores que influyen en la capacidad antioxidante son: la estructura química (número de grupos hidroxilo y su disposición en la estructura del anillo), formación de enlaces hidrogeno, propiedades quelantes, reducción de iones metálicos, efecto de disolventes cinéticos, y la activación de enzimas antioxidantes⁵⁴.

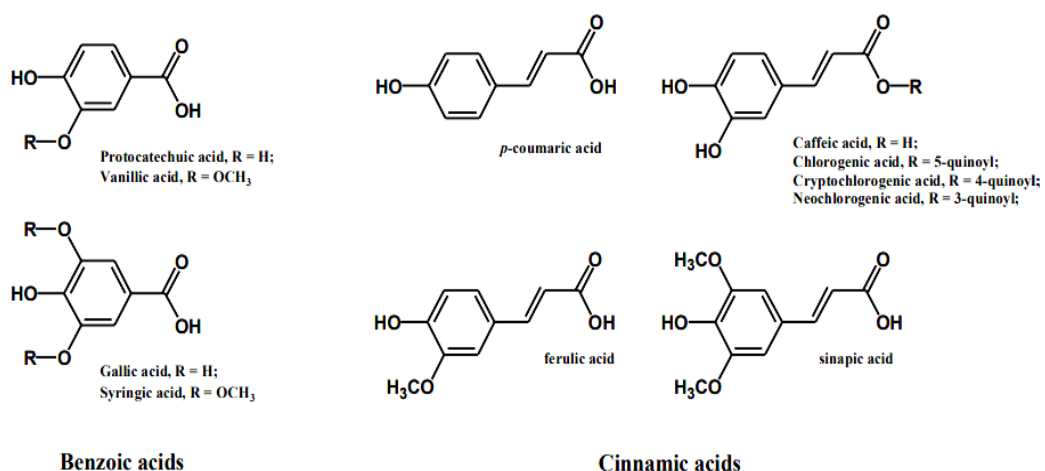


Figura 2. Ácidos fenólicos en alimentos: Ácidos benzoicos y ácidos cinámicos.

Fuente: Rong⁵²

2.4.1.2 Los polifenoles y la piel

Los radicales libres (RL) pueden dañar el tejido conectivo, membranas celulares y la genética del ADN, causando el envejecimiento cutáneo y, en algunos casos, el cáncer de piel. Los polifenoles tienen la capacidad de unirse a las fibras colágenas dañadas restableciendo sus enlaces y la flexibilidad cutánea, protegiéndolas de la acción de los RL y enzimas degradantes de la MEC (elastasas y colagenasas). Las procianidinas u oligómeros procianidólicos (OPC) son los polifenoles con mejores propiedades antioxidantes, presentan actividad antiinflamatoria, descongestiva, antiedema, antieritema, vasoprotectora, antienvjecimiento, y reparadora⁵⁵. Los polifenoles del té verde incluidos en la composición química de un protector solar, previnieron la formación de dímeros de pirimidina y de CPDs ante la exposición a UVB, en piel de ratones⁵⁶, una mutación celular producida por la radiación UV en la epidermis⁵⁷.

2.4.2 Flavonoides

Son los metabolitos más estudiados por sus propiedades antioxidantes frente a los RL⁵⁸. Poseen una estructura general de C6-C3-C6 y dos unidades fenólicas C6 (Anillo A y B). Según el patrón de hidroxilación y la variación del anillo cromano (Anillo C), se pueden dividir en: antocianinas, flavan-3-oles, flavonas, flavononas y flavonoles⁵².

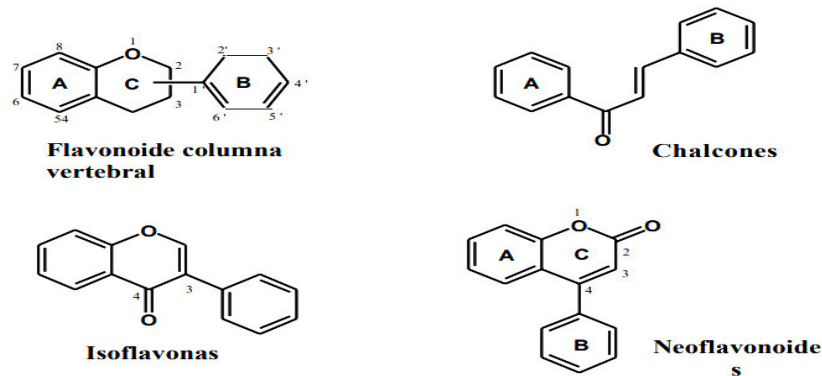


Figura 3. Estructura base y tipos de flavonoides.

Fuente: Rong⁵²

2.5 Radicales libres y antioxidantes

2.5.1 Radicales libres

Un radical libre es una molécula o átomo altamente reactivo e inestable por tener un electrón desapareado en su orbital más externo, interactúan rápidamente para unirse con otras moléculas cediendo su electrón desapareado o aceptando un electrón para completar su orbital. Se pueden formar en los procesos fisiológicos del metabolismo celular (producción de ATP y proceso redox celular), convirtiéndose en especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS)⁵⁹. Producen cambios estructurales y alteraciones funcionales en proteínas, lípidos, carbohidratos y en el ADN⁶⁰.

Pueden formarse a partir de fuentes endógenas: síntesis de prostaglandinas, autooxidación de adrenalina, células fagocíticas, citocromo P₄₅₀, activación de células inmunitarias, inflamación, estrés mental, infección, cáncer, envejecimiento; y de fuentes exógenas: humo de tabaco y la contaminación ambiental, exposición a la luz ultravioleta del sol y de otras formas de radiación⁶¹.

2.5.2 Estrés oxidativo

El organismo puede mantener el equilibrio homeostático o fisiológico-celular entre las concentraciones normales de ROS y la acción protectora de los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos⁶². Las células tienen diversos mecanismos que convierten los RL en productos menos tóxicos o no tóxicos; cuando el equilibrio se

rompe, se produce una sobreproducción excesiva y acumulación de RL que no pueden ser reguladas o neutralizadas, se genera un desequilibrio denominado estrés oxidativo⁶⁰.

Tabla 2. ROS más importantes, lugar de origen y reactividad

Especie reactiva	Símbolo	Origen
Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Mitocondria y en el sistema vascular por fosforilización oxidativa.
Radical hidroxilo	$\cdot OH$	Sobrecarga de hierro
Radical peroxilo	$\cdot OOR$	Daño oxidativo de carbohidratos, ADN y lípidos.
Hidroperóxido orgánico	ROOH	Oxidación de lípidos, y puede reaccionar con metales de transición y formar nuevos radicales.
Oxígeno singlete	1O_2	Fotosensibilización y reacciones químicas.

Fuente: Ortiz⁶²

2.5.2.1 Daños en el ADN

Se producen mutaciones somáticas en la síntesis de proteínas: el radical hidroxilo interactúa con las bases nitrogenadas alterando la información genética⁶³, el oxígeno singlete elimina la guanina del ADN, generando derivados mutagénicos⁶⁰.

2.5.2.2 Daños en los lípidos de membrana

En las membranas celulares, los ácidos grasos poliinsaturados son atacados por el radical hidroxilo, reaccionan con el oxígeno formando el radical peroxilo ($\cdot OOR$), este a su vez se transforma en hidroperóxidos (ROOH)⁶⁰. Estos hidroperóxidos en presencia de complejos metálicos se descomponen en radicales hidroxilo, peroxilos, se produce una peroxidación lipídica continua⁶³.

2.5.2.3 Daños en proteínas

El radical hidroxilo ocasiona entrecruzamientos de tipo covalente y fragmentación de las cadenas polipeptídicas en los residuos de los aminoácidos (tirosina, fenilamina, triptófano, histidina, metionina y cisteína)⁶⁰.

2.5.3 Radicales libres y enfermedades

Todos estos daños celulares generan la pérdida de las funciones enzimáticas, inhibición y acumulación de su degradación, lo que conduce al envejecimiento, diferenciación y apoptosis celular^{63,64}. Por consiguiente, los RL están involucrados en condiciones patológicas: diabetes mellitus, enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, esclerosis múltiple), cáncer (colon, mama, próstata, pulmón, vejiga), enfermedades cardiovasculares (aterosclerosis, hipertensión, catarata), enfermedades respiratorias, enfermedades gastrointestinales, artritis reumatoide, y el proceso de envejecimiento^{3,59,61,63}.

2.5.4 Antioxidantes

Son sustancias químicas que en concentraciones normales inhiben la oxidación producida por los RL manteniendo la homeostasis celular, pueden formar especies reactivas menores y proteger a las células de sus efectos tóxicos.

La acción antioxidante puede darse: previniendo el daño celular, evita el desarrollo de enfermedades degenerativas; y, durante el daño celular, disminuye el estrés oxidativo, neutralizando el exceso de ROS, logrando reducir algunas sintomatologías^{62,65}. Los antioxidantes pueden transferir los RL de sitios diana (sensibles a la oxidación) a lugares donde este grado oxidativo sea menor, de fases hidrófobas a fases acuosas, de la membrana al citosol o de las lipoproteínas a la fase acuosa del plasma⁶⁶. Se clasifican en dos sistemas: antioxidantes endógenos y antioxidantes exógenos¹.

2.5.4.1 Antioxidantes endógenos

Son aquellos que son sintetizados por el propio organismo y son considerados como el primer sistema de defensa. Se conocen también como antioxidantes enzimáticos, son el superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y se encuentran localizados en la mitocondria y el citoplasma^{60,67}.

Tabla 3. Antioxidantes endógenos

Antioxidante endógeno	Mecanismo de defensa	Sitio celular
Superóxido dismutasa (SOD)	Cataliza la oxido-reducción del anión superóxido. $2O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	Sus tres isoformas se encuentran en el espacio citoplasmático, matriz mitocondrial y fluidos extracelulares
Catalasa (CT)	Elimina de peróxido de hidrogeno $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$	Peroxisomas
Glutatión peroxidasa (GP)	Usa al selenio como cofactor en la reacción del glutatión reducido, elimina el peróxido de hidrogeno e hidroperóxidos orgánicos $2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2 H_2O$	Citoplasma y mitocondrias

Fuente: Gonzáles-Torres⁶⁰

2.5.4.2 Antioxidantes exógenos

Son compuestos que no pueden ser producidos en el cuerpo y deben ser proporcionados a través de los alimentos o suplementos (Tabla 4). El consumo de alimentos y verduras ricos en antioxidantes previenen el estrés oxidativo al contrarrestar el efecto de los RL en nuestras células, además nos brindan los micronutrientes necesarios para llevar una vida saludable⁶².

Tabla 4. Antioxidantes exógenos

Antioxidante	Fuente	Acción antioxidante
Vitamina E (tocoferol)	Espárragos, espinacas, tomate, brócoli, zanahoria, aceites (oliva, maíz, soya), frutos secos, cereales, lentejas, yema de huevo.	Mantiene la integridad de la membrana celular y protege los lípidos de membrana.
Vitamina C (ac. ascórbico)	Cítricos, pimientos verdes y rojos, acelgas, perejil, kiwi, fresas, tomates, coliflor.	Regenera a la vitamina E, potenciando su actividad en la membrana lipídica.
β-Caroteno (pro-vitamina A)	Zanahoria, espinacas, pimientos rojos, melocotón, mango, tomate	Inhibe peroxidación lipídica y actúa como fotoprotector.
Flavonoides (polifenólicos)	Té verde, ajo, cítricos, espinacas, cebolla, vino.	Quelación de metales
Oligoelementos (Selenio, Zinc, Manganeso, Cobre)	Pescado, lácteos, carne, brócoli, cereales integrales, cebolla, ajo, frutos secos, cacao y derivados.	Son cofactores de las enzimas antioxidantes

Fuente: Delgado⁶⁵

2.6 La piel y el envejecimiento

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, y posee funciones que son indispensables para la vida: protectoras, termorreguladora, sensitiva, secretora, inmunológica, excretora y produce vitamina D. Actúa como una barrera biológica que separa la homeostasis interna y protege al cuerpo del daño externo. Posee tres capas: epidermis, dermis e hipodermis⁶⁸.

2.6.1 Dermis

Es la capa media compuesta por: células (fibroblastos, mastocitos y macrófagos), fibras (colágeno, elásticas y reticulares), elementos vasculares y anexos (pelos, glándulas sebáceas, ecrinas y apocrinas). Se divide en:

Dermis papilar o superficial: Es una red fina de fibras de colágeno y elastina distribuidas irregularmente⁶⁹.

Dermis media o reticular: El colágeno es más grueso y denso que en la dermis superficial, y las fibras tienden a ir en paralelo a la superficie cutánea⁷⁰.

2.6.2 Fibras de la dermis

Las fibras colágenas y elásticas, representan el 80 % de la matriz extracelular y el 2 % del peso seco de la dermis, respectivamente. Se consideran como las fibras más importantes debido a que proporcionan fuerza, flexibilidad y elasticidad a la piel⁷¹. El fibroblasto (célula más abundante) está encargada de la síntesis de los componentes fibrosos, especialmente del colágeno.

Fibras colágenas: El colágeno es considerada la proteína más importante de la dermis, cada fibra está compuesta por fibrillas o microfibrillas de tropocolágeno que contienen tres cadenas polipeptídicas de triple hélice. Cada cadena polipeptídica contiene hidroxiprolina, hidroxilisina y glicina, siendo la hidroxilisina el aminoácido indispensable para las uniones inter e intramoleculares en la fase extracelular. Las bandas de colágeno antes de los 30 años alcanzan su máxima densidad y disminuyen a partir de los 60 años en un 40 %⁷⁰.

De acuerdo a sus propiedades físicas, composición de aminoácidos y morfología se han descrito 27 tipos de colágeno, siendo los colágenos tipo I (75-85 %), tipo III (15 %) y tipo V (2-4 %) los más presentes en la dermis, estos en conjunto con los colágenos tipo II y XI forman el grupo de colágenos fibrilares, los cuales son específicamente degradados por las colagenasas en la reabsorción⁷⁰.

Fibras elásticas: Las fibras elásticas, los proteoglicanos y las glicoproteínas se encuentran intercaladas en las fibras de colágeno⁷¹. Son fibras constituidas por elastina y microfibrillas periféricas, proteínas fibrosas insolubles que les confieren las propiedades de extensibilidad, elasticidad y estabilidad. Son numerosas en el nacimiento, aumentan significativamente a partir de los 50 años en un 5 % llegando hasta un 8 % en la ancianidad. Son degradadas por las elastasas⁶⁸.

2.6.3 Metaloproteinasas

Dentro de la matriz extracelular (MEC) se encuentran las metaloproteinasas (MMPs), una familia de proteasas que degradan las proteínas de la MEC y se clasifican en grupos según el sustrato sobre el que actúan, son reguladas por los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP). La exposición a la radiación UV aumenta la producción de MMPs. Las colagenasas degradan todo el colágeno del tejido conjuntivo, y las metaloelastasas degradan la elastina insoluble, colágeno IV, fibronectina y los proteoglicanos⁷². El exceso de ROS activa la vía MAPK y el complejo proteico NF-kB, aumentando la actividad de las MMP (MMP-3, MMP-7, MMP-1, MMP-9, MMP-2, MMP-9, MMP-12), por lo tanto, la degradación de colágeno y elastina se incrementan, y la síntesis de procolágeno se inhibe⁷³. Actualmente se vienen realizando la investigación y desarrollo de principios activos nuevos en dermocosmética, como los extractos de plantas naturales como inhibidores de las MMP⁷⁴.

2.6.4 Envejecimiento de la piel

Es un proceso biológico complejo e irreversible que se da progresivamente en el tiempo, es ocasionado por una serie de factores intrínsecos y extrínsecos que actúan en forma simultánea junto con los ROS (Figura 4)⁷⁵.

2.6.4.1 Clasificación del envejecimiento cutáneo

Envejecimiento intrínseco: Es el envejecimiento cronológico (órganos y piel), el que observamos en adultos, determinado por genes que codifican sus diferentes funciones. De forma progresiva y lenta se producen daños tisulares, moleculares, estructurales como laxitud, xerosis, palidez, atrofas y arrugas⁷⁶.

Envejecimiento extrínseco o fotoenvejecimiento: Está determinado por la exposición acumulativa e irreversible de radiación UVA–UVB que producen cambios moleculares y funcionales; también, es producto del desequilibrio entre la acumulación y degradación de los componentes de la MEC, se produce una degradación continua de las proteínas de la MEC (colágeno y elastina) y una disminución de la tasa de renovación/síntesis de colágeno⁷³.

Histopatológicamente, se presenta desorganización en las fibrillas de colágeno y acumulación de cantidades de elastina amorfa⁷⁷. De acuerdo a Sánchez-Saldaña⁷⁶ “la radiación UV causa activación de los receptores de factores de crecimiento, citocinas proinflamatorias (IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8), y moléculas de adhesión (ICAM-1) en la superficie de los queratinocitos y fibroblastos”. Estas reacciones generan un incremento en la transcripción de genes de las enzimas metaloproteinasas e interfieren en la síntesis de colágeno I y III, alterando la integridad estructural, degradación y acumulación del colágeno.

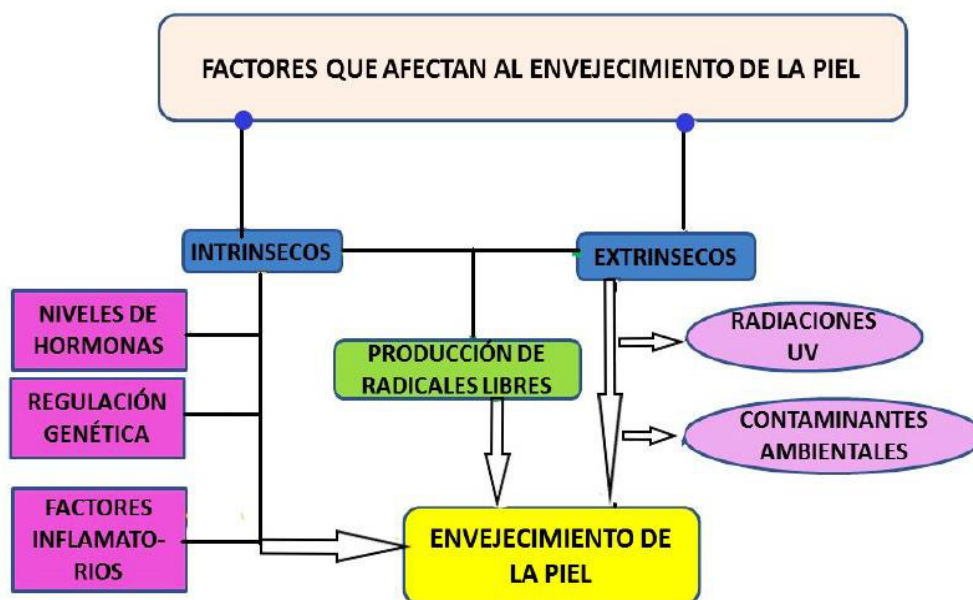


Figura 4. Factores intrínsecos y extrínsecos del envejecimiento cutáneo

Fuente: Martínez⁷⁵

La producción de RL está asociada a ambos tipos de envejecimiento, en el envejecimiento intrínseco la actividad de la CT de los fibroblastos disminuye, lo que ocasiona el aumento de las concentraciones de H₂O₂, la MMP-1 se activa y origina la ruptura de las fibrillas de colágeno. En el envejecimiento extrínseco por la fotoexposición se genera ¹O₂ y otros metabolitos de ROS que dañan el ADN y los lípidos de los queratinocitos y fibroblastos.

Estudios de medición directa de ROS en las enfermedades cutáneas, concluyen que se presentan aumentos de ROS, y una disminución de la actividad de los antioxidantes endógenos. En cáncer de piel, vitíligo vulgaris, urticaria, acné vulgaris, se presenta disminución de actividad del SOD; en dermatitis de contacto, psoriasis vulgaris, disminución de GP. Activación de XO y NADPH oxidasa en alopecia areata, granuloma y cicatrización de heridas, dermatitis de contacto, carcinogénesis respectivamente. En la dermatitis atópica, niveles reducidos de vitamina C en sangre y vitamina E en tejidos de piel; radicales OH· y lipídicos se generan con facilidad⁷⁸.

La cosmética tanto preventiva como reparadora interviene con la finalidad de contrarrestar las alteraciones naturales en el envejecimiento o en la activación de genes que actúan en la síntesis de colágeno y elastina⁷⁵.

2.7 Métodos de determinación de actividad antioxidante y antienzimática

Son métodos espectrofotométricos que determinan la actividad antioxidante y antienzimática *in vitro* de diferentes compuestos mediante el empleo de reactivos químicos y biológicos: radicales (DPPH•, ABTS^{•+}), iones metálicos (FRAP), y sustratos sintéticos (antielastasa, anticolagenasa).

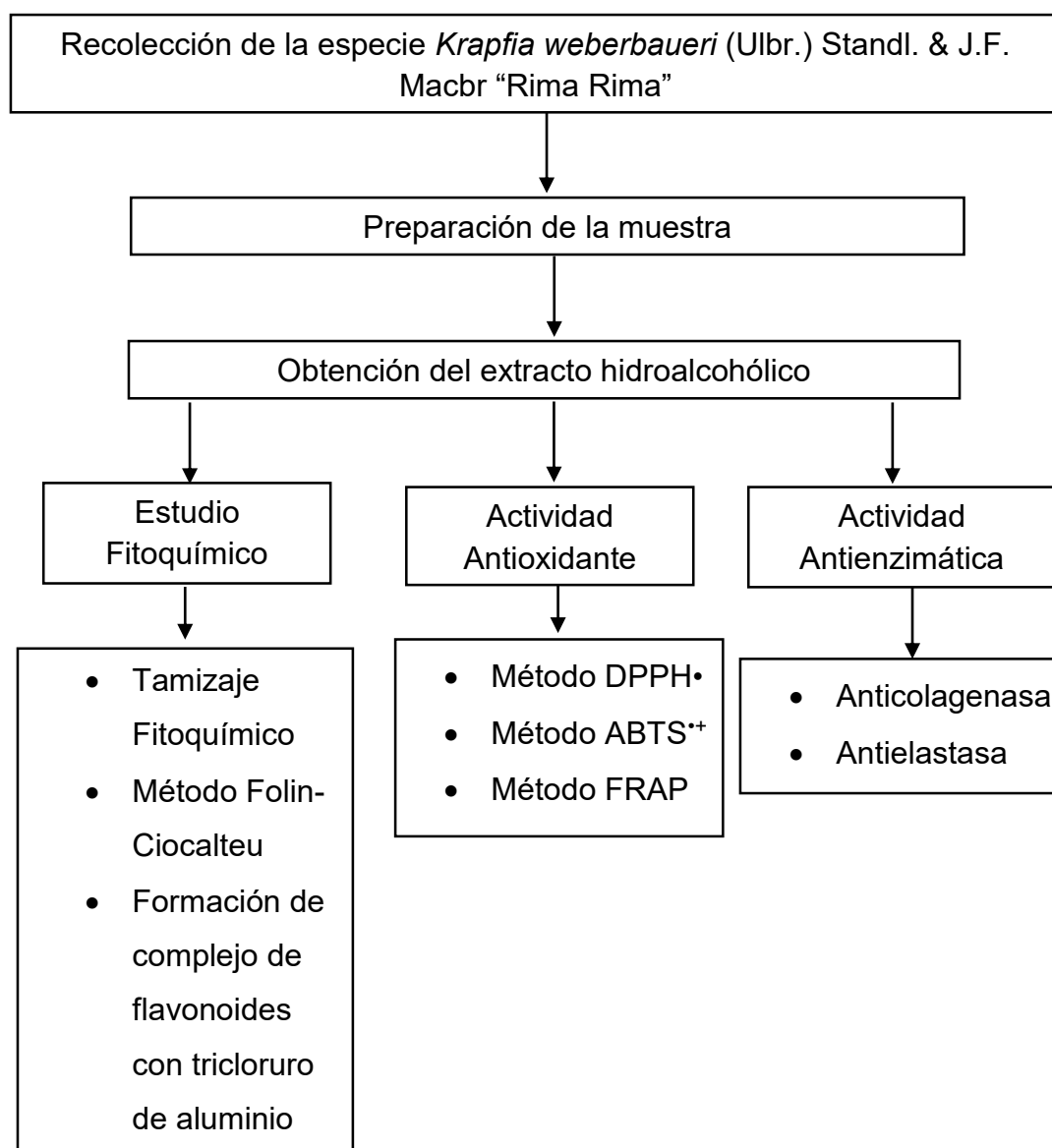
El desarrollo de herramientas analíticas han permitido un gran avance en la identificación de metabolitos secundarios responsables de los efectos terapéuticos como actividades antioxidantes, anticancerígenas, antivirales, antibacterianas, antifúngicas y enzimáticas; diferentes extractos obtenidos de diferentes plantas exhiben efectos beneficiosos frente a estas enfermedades^{2,79}.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1 Tipo y diseño de investigación

Aplicada y experimental

3.2 Flujograma del trabajo experimental



Fuente: Elaboración propia

3.3 Materiales, equipos y reactivos

a. Materiales

Fiolas, beakers, tubos de ensayo, matraces, probetas, pipetas, embudos, luna de reloj, baguetas, cubetas, gradillas, espátulas, papel Whatman N°42, papel filtro, papel de aluminio, algodón, tela, papel kraft, guantes quirúrgicos, mascarillas, mandil.

b. Equipos

Cocinilla eléctrica, estufa con control de calefacción, espectrofotómetro UV-VIS GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Scientific), evaporador rotatorio DLAB RE 100-Pro, bomba de vacío (VAS ÉS FEMIPARI KTSZ SZEGED), vórtex MX-S (SCIOLOGEX), balanza Analítica HR-250AZ (A&D Company, Limited), centrifuga ROTOFIX 32 (Hettich), refrigeradora Samsung ES21HLMR, horno acoplado con termómetro 3511 L-C Oven (LAB-LINE), baño maría (Mettler), potenciómetro Mi 151 (Milwaukee), micropipetas capacidades 20-100µL y 100-1 000µL (CAPP DENMARK).

c. Reactivos químicos

Todos los reactivos fueron de grado analítico. Carbonato de sodio, tricloruro de aluminio, etanol 96°, n-butanol, ácido fórmico, hidróxido de sodio, solución buffer a pH= 4, 7 y 10. Reactivos de la casa comercial Sigma: reactivo de Folin-Ciocalteu, ácido ascórbico, 2,2'-azinobis3- (etilbenzotiazolín)-6-Sulfónico (ABTS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (AAAPVN), N-[3-(2-furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA), 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), ácido gálico. El metanol grado HPLC fue adquirido de la casa comercial Merck.

d. Reactivos biológicos

Enzimas elastasa pancreática porcina y colagenasa de *Clostridium histolyticum* (SIGMA).

3.4 Colecta e identificación botánica

La colecta de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr “Rima Rima” se realizó en el distrito de Paucas, provincia de Huari, en el departamento de Ancash-Perú, por la ruta Paria-Wilcahuain, cerca al cerro San Cristóbal, a 3 000 metros de altitud. La colecta se realizó de forma manual en agosto del 2019. La certificación botánica de la especie se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.



Figura 5. *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr “Rima Rima”.

Fuente: Elaboración propia

3.5 Procesamiento de la muestra

La muestra fue lavada con agua destilada, secada, conservada en papel Kraft y acondicionada a temperatura ambiental. Posteriormente, se procedió a separar los tallos y hojas de la planta, reduciéndose a partículas pequeñas manualmente. Todo el proceso se realizó en el Laboratorio de Síntesis y Semisíntesis Orgánica del Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM.

3.5.1 Obtención del extracto hidroalcohólico

Al producto obtenido se le agregó 400 mL de solvente de extracción alcohol-agua (7:3) en un frasco ámbar con agitación cada doce horas y se mantuvo en oscuridad durante siete días. Posteriormente, utilizando papel Whatman N°42 se filtró al vacío, y luego en un evaporador rotatorio se concentró. En una estufa a 45 °C, se almacenó el producto obtenido hasta sequedad, obteniéndose 4,82 g de extracto sólido.



Figura 6. Obtención del extracto hidroalcohólico.

A. Filtración al vacío, B. Concentración en evaporador rotatorio, C. Extracto obtenido

Fuente: Elaboración propia

3.6 Determinación de polifenoles totales y flavonoides

3.6.1 Método Folin-Ciocalteu

Fundamento: Los polifenoles tienen la capacidad de oxidarse rápidamente en soluciones alcalinas, pueden ceder sus electrones al reactivo Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdotúngstico) formando un complejo de color azul intenso que son los óxidos de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La intensidad de coloración es proporcional al total de compuestos fenólicos presentes en la muestra medidos espectrofotométricamente a 765 nm^{80} .

Procedimiento: En un tubo de ensayo se pesaron $0,2 \pm 0,001 \text{ g}$ de extracto hidroalcohólico, se agregó 5 mL de metanol al 70 %, con bagueta se removió en baño maría a $70 \text{ }^\circ\text{C}$, y se agitó durante 10 minutos en un vórtex hasta que la muestra

este lo más disuelta. Posteriormente, se centrifugó a 3 500 RPM por 10 minutos, y se realizó una segunda extracción. Los sobrenadantes se enrasaron a de 10 mL con metanol al 70 %, 4 mL de este volumen se diluyeron en 100 mL con agua destilada. Finalmente, se realizó el siguiente procedimiento (Tabla 5) para el estándar de ácido gálico y la muestra, el contenido de polifenoles totales se expresó en mg GAE/g extracto⁸¹. Para el estándar de ácido gálico se prepararon concentraciones de 5 a 50 µg/mL.

Tabla 5. Protocolo de cuantificación de polifenoles totales

	Tubo blanco	Tubo extracto	Tubo estándar
Agua destilada	100 µL	-	-
Ácido gálico	-	-	100 µL
Extracto	-	100 µL	-
Reactivo Folin-Ciocalteu 0,2 N	500 µL	500 µL	500 µL
	Agitar y reposar por 5 minutos		
Na₂CO₃ 7,5% w/v	400 µL	400 µL	400 µL
	Agitar y reposar durante una hora en oscuridad. Leer a 765 nm.		

3.6.2 Método de complejo de flavonoides con AlCl₃

Fundamento: Los diferentes tipos de flavonoides tienen la capacidad de formar quelatos con el AlCl₃ a condiciones específicas de pH, grado de ionización, y los sistemas conjugados de los grupos carbonilo e hidroxilo⁸².

En la estructura química del anillo B, los grupos hidroxilo (C2' y C3') se oxidan en carbonilos con la adición de NaNO₂ y se genera HNO₂. Al agregar AlCl₃, el aluminio se une al oxígeno en C4' y forma un enlace coordinado con el carbonilo en C3' adquiriendo un color amarillo oscuro. El NaOH permite al oxígeno del grupo nitrosilo reducirse y formar un complejo de color rosado que puede ser medido espectrofotométricamente a 500 nm^{83,84}.

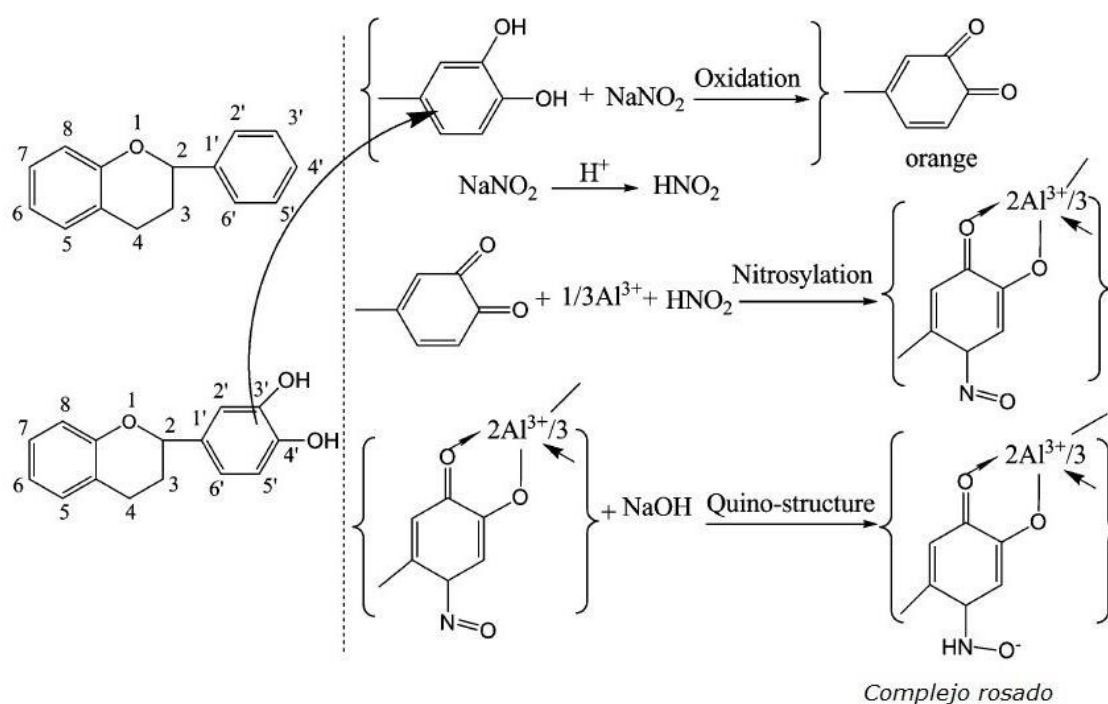


Figura 7. Mecanismo sugerido de formación del complejo aluminio-flavonoide

Fuente: Zhu et al.⁸⁴

Procedimiento: Se preparó una concentración de extracto al 1 mg/mL en metanol⁸⁵. Se realizó el siguiente procedimiento (Tabla 6) y el contenido de flavonoides se expresó en mg QE/g de extracto. Para el estándar de quercetina se prepararon concentraciones de 5 a 50 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 6. Protocolo de cuantificación de flavonoides

	Tubo blanco	Tubo estándar	Tubo extracto
Quercetina	-	400	-
Extracto	-	-	400
Solvente	400	-	-
NaNO₂ 5%	50	50	50
	Agitar y reposar por 5 minutos		
AlCl₃ 2.5%	50	50	50
	Agitar y reposar por 6 minutos		
NaOH 1M	700	700	700
	Agitar y reposar durante 10 minutos. Leer a 500 nm.		

3.7 Determinación de la actividad antioxidante *in vitro*

3.7.1 Método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH•)

Fundamento: El 2,2-difenil-1-picrihidrazil es un radical cromógeno estable a consecuencia de la deslocalización de un electrón sobre su estructura química⁸⁶. Las soluciones de DPPH• son de color violeta intenso, y al aceptar un electrón o átomo de hidrogeno proveniente de sustancias antioxidantes vira a un color amarillo pálido, que es la hidracina formada⁸⁷. Esta reacción es seguida midiendo la disminución de absorbancia después de 30 minutos a 517 nm⁸⁸.

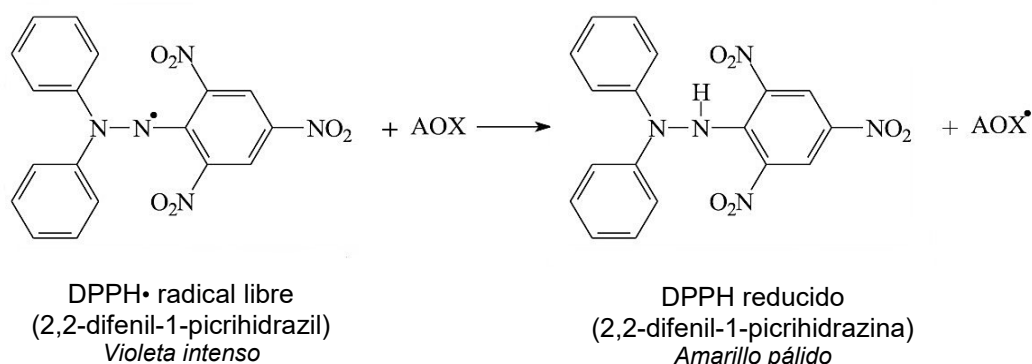


Figura 8. Reacción química en el ensayo DPPH•

Fuente: Becker⁸⁷

Solución stock al 40 % y de trabajo de 2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH•): La solución stock de DPPH• se preparó al 0,4 mg/mL en metanol y se almaceno en refrigeración en un frasco ámbar de vidrio. Para la solución de trabajo, se tomó 2 mL de la solución stock de DPPH• y se le agregó 25 mL de metanol, esta preparación se realizó en un matraz cubierto con papel aluminio para evitar su degradación. A 517 nm la solución de trabajo presentó 0,676 de absorbancia.

Medición de actividad antioxidante: Se preparó una solución madre de 8 mg/mL de extracto y se diluyó a un rango de concentración de 16-160 µg/mL. Se utilizó un blanco, y un blanco de muestra por la coloración amarilla en las diluciones. Las diluciones del estándar de Trolox® (1,2 a 4,8 µg/mL) y del extracto siguieron el procedimiento descrito en la Tabla 7.

Tabla 7. Protocolo de capacidad antioxidante frente al radical DPPH•

	Tubo blanco	Tubo control	Tubo estándar	Tubo blanco de extracto	Tubo extracto
Extracto	-	-	-	400 µL	400 µL
Trolox®	-	-	400 µL	-	-
Solvente	400 µL	400 µL	-	800 µL	-
Sol. Trabajo	-	800 µL	800 µL	-	800 µL
DPPH•	-	800 µL	800 µL	-	800 µL
Metanol	800 µL	-	-	-	-

Agitar y reposar por 30 minutos. Leer a 517 nm.

3.7.2 Método de captación del radical ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS^{•+})

Fundamento: El 2,2'-azinobis (3-ácido etilbenzotiazolina-6-sulfónico) es un radical catiónico azul-verdoso y en presencia de compuestos antioxidantes donantes de electrones simples (SET) o de átomos de hidrogeno (HAT)⁸⁹ es inhibido a una longitud de onda de 734 nm⁹⁰. El radical se decolora y su absorbancia se mide después de 7 minutos de reacción⁸⁷.

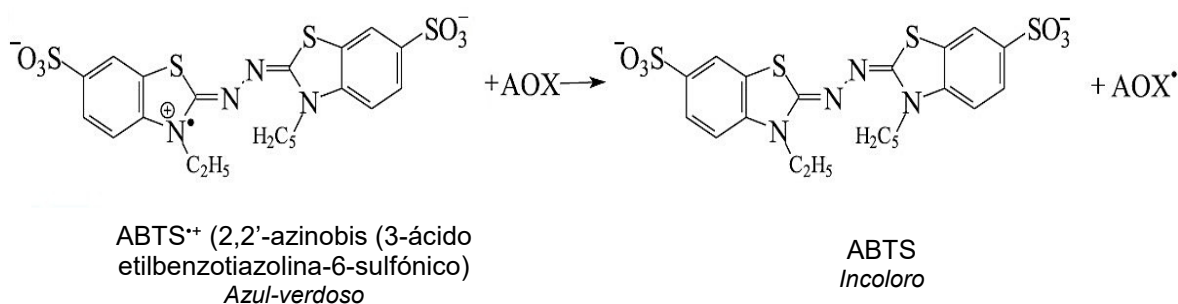


Figura 9. Reacción química en el ensayo ABTS^{•+}

Fuente: Becker⁸⁷

Solución stock 2,45 mM y de trabajo de 2,2'-azinobis (3-etilbezotiazolin)-6-sulfónico (ABTS^{•+}): La solución stock se preparó mezclando en un tubo de ensayo 9,8 mg/mL de ABTS^{•+} con 1,6 mg/mL de persulfato de potasio (soluciones acuosas) y 0,5 mL de agua bidestilada. Después de agitar la mezcla, se dejó en reposo por 16 horas en oscuridad protegido de la luz (Oxidación directa del radical ABTS^{•+})⁹¹. Para la solución de trabajo, se tomó 200 µL de la solución stock de ABTS^{•+} y se agregó 20 mL de agua bidestilada. A una longitud de onda de 734 nm, la solución presentó 0,713 de absorbancia.

Medición de actividad antioxidante: Se preparó una solución madre de 8 mg/mL de extracto y se diluyó a un rango de concentración de 12-76 µg/mL. Se utilizó un blanco para las lecturas. Las diluciones del estándar de Trolox® (0,8 a 4,8 µg/mL) y del extracto siguieron el procedimiento descrito en la Tabla 8.

Tabla 8. Protocolo de capacidad antioxidante frente al radical ABTS^{•+}

	Tubo blanco	Tubo control	Tubo estándar	Tubo extracto
Extracto	-	-	-	20 µL
Trolox®	-	-	20 µL	-
Solvente	20 µL	20 µL	-	-
Sol. Trabajo ABTS^{•+}	-	980 µL	980 µL	980 µL
Agua bidestilada	980 µL	-	-	-

Agitar y reposar por 7 minutos. Leer a 734 nm.

En DPPH• y ABTS^{•+}, los resultados se expresaron en TEAC (capacidad antioxidante equivalente a Trolox®), porcentaje de inhibición y valores de IC 50.

$$\text{TEAC} = \text{IC 50 (Trolox } \mu\text{g/mL)} / \text{IC 50 (DPPH}^\bullet \text{ extracto) mg/mL}$$

$$\% \text{Inhibición} = (\text{Abs.Control} - \text{Abs.Muestra}) / (\text{Abs.Control}) \times 100$$

3.7.3 Método del poder antioxidante de reducción férrica (FRAP)

Fundamento: En medio ácido (pH= 3,6), los compuestos antioxidantes donadores de electrones (SET) reducen el hierro férrico (Fe^{+3}) del complejo 2,4,6-tripiridil-s-triazina $[\text{Fe}(\text{TPTZ})]^{+3}$ hasta su forma ferrosa (Fe^{+2}) $[\text{Fe}(\text{TPTZ})]^{+2}$ después de 15 minutos de reacción. Producto de esta reducción férrica, se observa una coloración azul intensa y su absorbancia es medida a una longitud de onda de 593 nm^{92} .

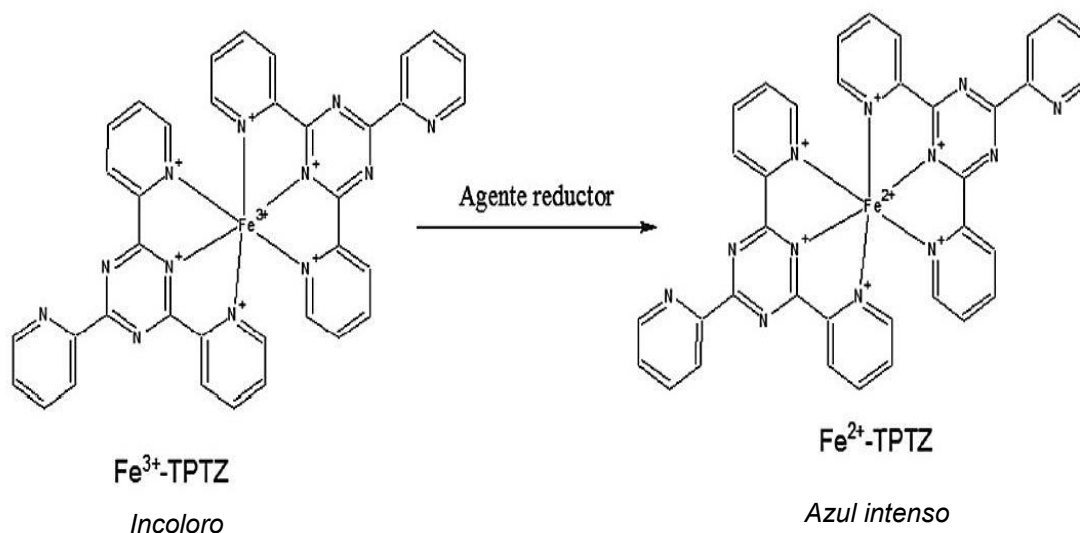


Figura 10. Reducción del complejo $[\text{Fe}(\text{TPTZ})]^{+3}$ por la adición de antioxidantes

Fuente: Londoño⁹³

Reactivo FRAP: Es la mezcla de los reactivos A, B y C en la proporción de 100:1:1. El reactivo A contiene: buffer acetato 300 mM a pH= 3,6; el reactivo B: 2,4,6-Tri (2-piridil)-s-triazina (TPTZ) 10 mM en HCl 40 mM y el reactivo C: FeCl_3 20 mM en metanol.

Medición de actividad antioxidante: Se preparó una solución madre de 2 mg/mL de extracto y se diluyó a un rango de concentración de 12,5-100 $\mu\text{g/mL}$. Las diluciones del estándar de ácido ascórbico (5 $\mu\text{mol/L}$ a 25 $\mu\text{mol/L}$) y del extracto siguieron el procedimiento descrito en la Tabla 9.

Tabla 9. Protocolo de capacidad antioxidante FRAP

	Tubo blanco	Tubo estándar	Tubo extracto
Extracto	-	-	50 µL
Solvente	50 µL	-	-
Ácido ascórbico	-	50 µL	-
Reactivo FRAP	950 µL	950 µL	950 µL

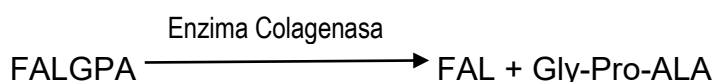
Agitar y dejar reposar 15 min. Leer a 593 nm.

Los resultados se expresaron en capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico (AAEAC), µmol equivalente y mg de Ácido ascórbico/g de extracto⁹⁴.

3.8 Determinación de la actividad antienzimática *in vitro*

3.8.1 Determinación de la actividad anticolagenasa

Fundamento: En una reacción de enzima-sustrato, la enzima colagenasa *Clostridium histolyticum* hidroliza al sustrato N-[3-(2-furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) obteniéndose una determinada cantidad de producto medido a 348 nm⁹⁵.



Donde:

FALGPA: N-[3-(2-furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala

FAL: N-[3-(2-furyl) acryloyl]-Leu

Buffer, sustrato y enzima: El buffer Tris-Glicine pH 7,5, la enzima colagenasa de *Clostridium histolyticum* y el sustrato N-[3-(2-furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA), se prepararon a una concentración de 50 mM, 1,54 unidades/mL y 2,1 mM, respectivamente.

Medición de actividad antienzimática: Se preparó una solución madre de 6 mg/mL de extracto y se diluyó a un rango de concentración de 36-90 µg/mL. Las

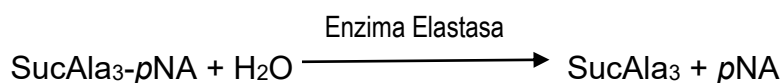
diluciones del estándar de EGCG (80 a 250 µg/mL) y del extracto siguieron el procedimiento descrito en la Tabla 10.

Tabla 10. Protocolo de actividad anticlagenasa

	Tubo estándar	Tubo extracto	Tubo control	Tubo blanco para calibración	Tubo blanco de extracto
Extracto EGCG	-	100 µL	-	-	100 µL
Solvente	100 µL	-	-	-	-
Enzima colagenasa	-	-	100µL	100 µL	-
	210 µL	210 µL	210 µL	-	-
Incubar por 15 min. a 37°C					
Sustrato FALGPA	190 µL	190 µL	190 µL	-	-
Buffer Tris-Glicine	400 µL			400 µL	400 µL
Incubar por 5 min. a 37°C					
Ácido fórmico 10%	1 gota	1 gota	1 gota	-	-
Leer a 348 nm.					

3.8.2 Determinación de la actividad antielastasa

Fundamento: En una reacción enzima-sustrato, la enzima elastasa pancreática porcina actúa sobre el sustrato SucAla₃-pNA, obteniéndose una determinada cantidad de producto medido a 410 nm⁹⁶. Generalmente se observa una coloración amarillo pálido proporcional a la cantidad de p-nitroanilide obtenido.



Donde:

SucAla₃-pNA = N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide

SucAla₃ = N-succinyl-Ala-Ala-Ala

Buffer, sustrato y enzima: Los buffers THAM Sigma 7-9® pH 8 y fosfato pH 6,5 se prepararon a una concentración de 0,1 M. Ambos se utilizaron como solventes para la preparación del sustrato N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (AAPVN) 1,6 mM y enzima elastasa pancreática porcina 0,1 mg/mL (solución stock), respectivamente. De la solución stock se tomó 0,2 mL de y se completó con agua bidestilada hasta obtener una concentración final de 5 µg/mL de solución de trabajo.

Medición de actividad antienzimática: Se preparó una solución madre de 8 mg/mL de extracto y se diluyó a un rango de concentración de 200-960 µg/mL. Las diluciones del estándar de EGCG (4 µg/mL hasta 20 µg/mL) y del extracto siguieron el procedimiento descrito en la Tabla 11.

Tabla 11. Protocolo de actividad antielastasa

	Tubo control	Tubo extracto	Tubo estándar	Tubo blanco para calibración	Tubo blanco de extracto
Buffer THAM	100 µL	100 µL	100 µL	350 µL	350 µL
Extracto EGCG	-	50 µL	-	-	50 µL
Solvente	50 µL	-	50 µL	50 µL	-
Enzima Elastasa	100 µL	100 µL	100 µL	-	-
	Incubar por 15 min. a 34°				
Sustrato AAPVN	250 µL	250 µL	250 µL	-	-
	Incubar por 11 min. a 34°C				
Agua bidestilada	-	-	-	100 µL	100 µL
Ácido fórmico 10%	1 gota	1 gota	1 gota	-	-
	Leer a 410 nm.				

El porcentaje de inhibición enzimática de cada concentración se halló empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{Inhibición} = (\text{Abs. Control} - \text{Abs. Muestra}) / (\text{Abs. Control}) \times 100$$

El IC 50 se calculó como una concentración para reducir el 50% del radical o enzima. El porcentaje de inhibición y el IC 50 son parámetros característicos de los métodos de captación de radicales libres y de inhibición de actividad antienzimática⁹⁷.

3.9 Análisis estadístico

Todas las metodologías *in vitro* se realizaron por triplicado y se analizaron estadísticamente con el programa IBM SPSS 25. Las absorbancias obtenidas se expresaron con promedio ($n = 3$) \pm desviación estándar (DE) y valor de coeficiente de variación (CV). Por el número de datos se utilizó las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk. Para las pruebas paramétricas se realizó el estadístico de prueba análisis de varianza de un solo factor (ANOVA) y HSD Tuckey en las comparaciones múltiples entre grupos, para las pruebas no paramétricas se utilizó el estadístico de Kruskal-Wallis.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1 Tamizaje fitoquímico

Las reacciones de identificación para esteroides, saponinas y alcaloides obtuvieron resultados negativos.

Tabla 12. Tamizaje Fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr

Prueba	Metabolitos Secundarios	Resultado	Calificación
Shinoda	Flavonoides	Coloración rojiza	+++
FeCl₃	Compuestos fenólicos	Coloración verde	+++
Gelatina	Taninos	Amarillo claro	+
Borntrager	Antraquinonas	Coloración rojiza	++
Lieberman-Burchard	Triterpenoides	Coloración rojiza	+++
	Esteroides	No hubo coloración azul	-
Índice de espuma	Saponinas	No formo espuma	-
Vainillina	Glucósidos	Coloración violeta	++
Dragendorff	Alcaloides	No hubo coloración	-
Wagner	Alcaloides	No hubo coloración	-
Bertrand	Alcaloides	No hubo coloración	-
Popoff	Alcaloides	No hubo coloración	-
Mayer	Alcaloides	No hubo coloración	-
Baljet	Lactonas	Coloración rojiza	+++
Hidroxamato Férrico	Lactonas y	Coloración violeta	+

Leyenda: Negativo (-), Presencia Leve (+), Moderada (++), Intensa (+++)

4.2 Rendimiento del extracto

Se obtuvo un porcentaje de rendimiento de 3.36%⁹⁸.

Tabla 13. Rendimiento del extracto hidroalcohólico de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr

Muestra	Muestra fresca (g)	Extracto obtenido (g)	Rendimiento (%)	Tipo de extracto
Tallos y hojas de <i>Krapfia weberbaueri</i> (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr	143,57	4,82	3,36	Pilular ⁹⁹

4.3 Solubilidad del extracto

La mezcla de solventes alcohol-agua mostró solubilidad total del extracto, y se utilizó para la preparación de concentraciones y diluciones.

Tabla 14. Ensayo de solubilidad del extracto hidroalcohólico de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr

Solvente	Solubilidad
Agua	++
Metanol	++
Etanol	++
Etanol-Agua (7:3)	+++
Metanol-Agua (7:3)	++
Glicerina-Agua (7:3)	-
Éter etílico	-
N-butanol	-
1,2-diclorometano	+

Leyenda: Negativo (-), Presencia Leve (+), Moderada (++), Intensa (+++)

4.4 Determinación de compuestos fenólicos y flavonoides

La Tabla 15 presenta las cantidades de compuestos fenólicos y flavonoides obtenidos en los métodos de Folin-Ciocalteu y formación de complejo de flavonoides con tricloruro de aluminio, respectivamente.

Tabla 15. Cuantificación de metabolitos secundarios

Metabolitos secundarios	Cantidad determinada
Polifenoles totales	5,7459 ± 0,0127*
Flavonoides	86,7086 ± 0,0656**

*Expresados en mg GAE/g de extracto ± DE

** Expresados en mg QE/g de extracto ± DE

4.5 Actividad antioxidante *in vitro*

Se tuvo en cuenta el promedio de las absorbancias (Prom. Abs) de cada concentración para efectuar los cálculos de % inhibición, desviación estándar y coeficiente de variación (CV).

4.5.1 DPPH•

En la Tabla 16 y Figura 11, se pueden observar una relación directa entre las concentraciones de extracto hidroalcohólico y la captación del radical DPPH•.

Tabla 16. Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr frente al radical DPPH•

Extracto (µg/mL)	Prom. Abs ± DE	CV del Prom. Abs	%Inhibición DPPH•
0	0,4524 ± 0,0004	0,0893	0
16	0,3673 ± 0,0001	0,0314	18,8094
40	0,3382 ± 0,0059	1,7423	25,2487
88	0,1983 ± 0,0021	1,0349	56,1630
112	0,1290 ± 0,0080	6,1763	71,4875
160	0,0082 ± 0,0017	20,0436	98,1802
IC 50 = 77,7647 µg/mL			

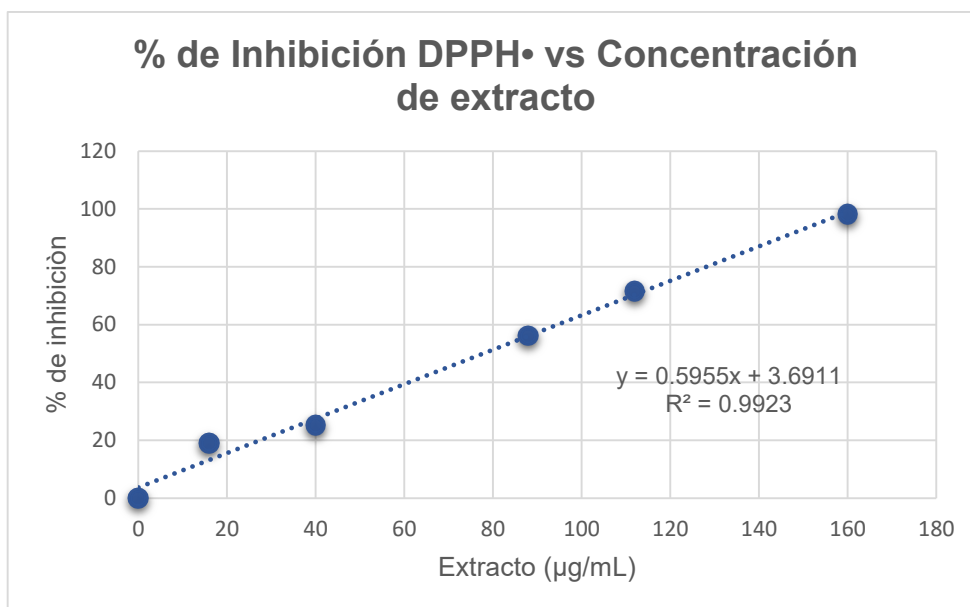


Figura 11. Curva de inhibición del radical DPPH• del extracto hidroalcohólico de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr.

Se reportó un valor TEAC de 31,2018 mg Trolox/g de extracto, y los valores de IC 50 del Trolox® (Anexo 6: Tabla 25) y del extracto fueron 2,4264 µg/mL y 77,7647 µg/mL, respectivamente. El extracto hidroalcohólico si posee actividad antioxidante; no obstante, no fue superior al estándar.

4.5.2 ABTS^{•+}

En la Tabla 17 y Figura 12, se puede observar una relación directa entre las concentraciones de extracto hidroalcohólico y la captación del radical ABTS^{•+}.

Tabla 17. Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr frente al radical ABTS^{•+}

Extracto (µg/mL)	Abs Prom. ± D.E	CV del Prom. Abs	%Inhibición
0	0,7139 ± 0,0056	0,7846	0
12	0,5596 ± 0,0083	1,4759	21,6147
28	0,4158 ± 0,0101	2,4594	41,7538
44	0,2706 ± 0,0248	9,5854	62,1008
60	0,1490 ± 0,0137	9,1625	79,1231
76	0,0086 ± 0,0005	6,1859	98,8023
IC 50 = 36,2218 µg/mL			

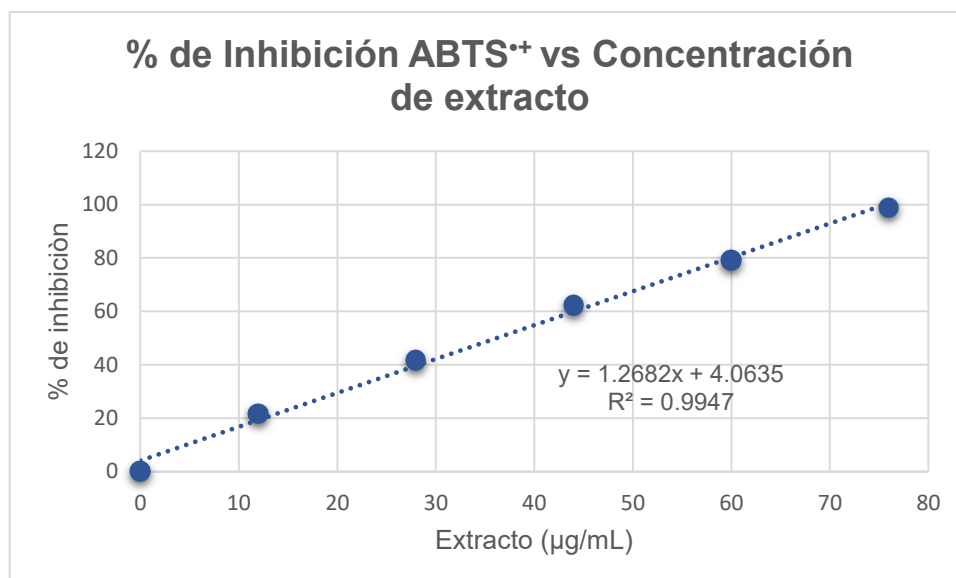


Figura 12. Curva de inhibición del radical ABTS⁺ del extracto hidroalcohólico de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr.

Se reportó un valor TEAC de 87,7822 mg Trolox/g de extracto, y los valores de IC 50 del Trolox® (Anexo 7: Tabla 26) y del extracto fueron 3,1793 µg/mL y 36,2218 µg/mL, respectivamente. El extracto hidroalcohólico si posee buena actividad antioxidante; no obstante, no fue superior al estándar.

4.5.3 FRAP

En la Tabla 18 y Figura 13, se puede observar una relación directa entre el incremento del valor de absorbancias y el aumento de concentración de extracto.

Tabla 18. Poder reductor férrico del extracto hidroalcohólico de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr.

Extracto (µg/mL)	Prom. Abs ± DE	CV del Prom. Abs
12,5	0,0929 ± 0,0031	3,3835
25	0,1756 ± 0,0045	2,5481
50	0,3311 ± 0,0116	3,5070
75	0,4831 ± 0,0040	0,8239
100	0,5949 ± 0,0054	0,9098

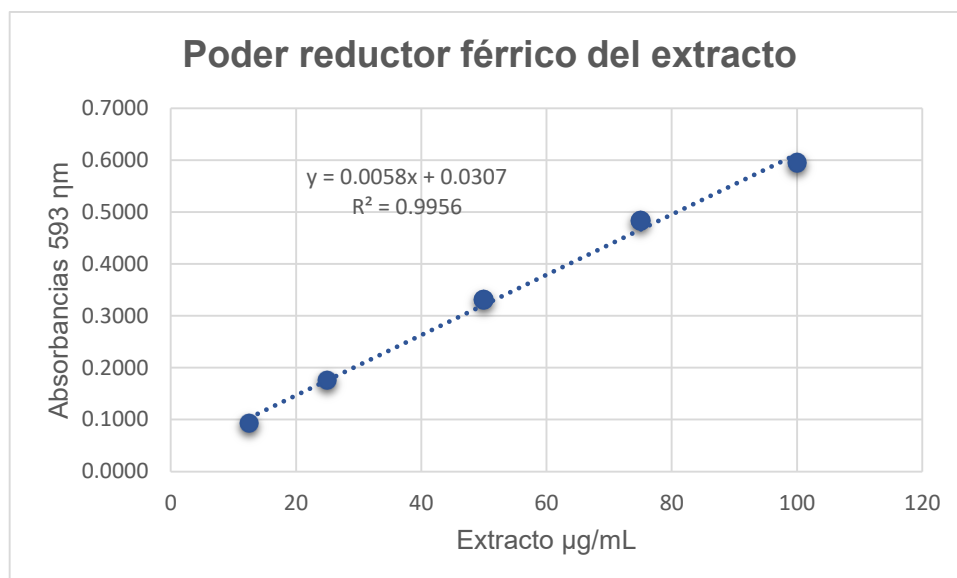


Figura 13. Curva de reducción del Fe^{+3} del extracto hidroalcohólico de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr.

El extracto exhibió una buena actividad antioxidante reductora férrica y reportó un valor AAEAC de 315,3846 μmol Ácido ascórbico/g de extracto.

La Tabla 19 resume la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto hidroalcohólico de “Rima Rima”.

Tabla 19. Capacidad antioxidante total de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr.

	mg/g	$\mu\text{mol/g}$
DPPH•	31,2018*	124,6626*
ABTS•+	87,7822*	350,7220*
FRAP	55,5455**	315,3846**

* TEAC: Capacidad antioxidante equivalente a Trolox

** AAEAC: Capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico

4.6 Actividad antienzimática *in vitro*

En ambos métodos los resultados se expresaron mediante % inhibición y valores de IC 50. Se tuvo en cuenta el promedio de absorbancias correspondientes de cada concentración para efectuar el cálculo de los % de inhibición, desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV).

4.6.1 Actividad anticlagenasa

La Tabla 20 y Figura 14 muestran la inhibición de la enzima colagenasa por el extracto de *Krapfia weberbaueri* en un rango de 30-90 %, se puede observar una relación directa entre las concentraciones de extracto hidroalcohólico y de actividad anticlagenasa.

Tabla 20. Actividad inhibidora de la enzima colagenasa del extracto hidroalcohólico de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr.

Extracto ($\mu\text{g/mL}$)	Prom. Abs \pm DE	CV del Prom. Abs	%Inhibición
0	0,2553 \pm 0,0018	0,7010	0,0000
36	0,1767 \pm 0,0160	9,0380	30,7833
54	0,1151 \pm 0,0294	25,5453	54,9086
66	0,0884 \pm 0,0072	8,1574	65,3786
90	0,0255 \pm 0,0010	3,7409	90,0131
IC 50 = 50,9573 $\mu\text{g/mL}$			

Se reportaron valores de IC 50 de 211,1552 $\mu\text{g/mL}$ y 50,9573 $\mu\text{g/mL}$ correspondientes al estándar galato de epigallocatequina (Anexo 9: Tabla 28) y del extracto hidroalcohólico, respectivamente, con lo cual se puede apreciar que el extracto de *Krapfia weberbaueri* presenta una buena actividad anticlagenasa superior al estándar.

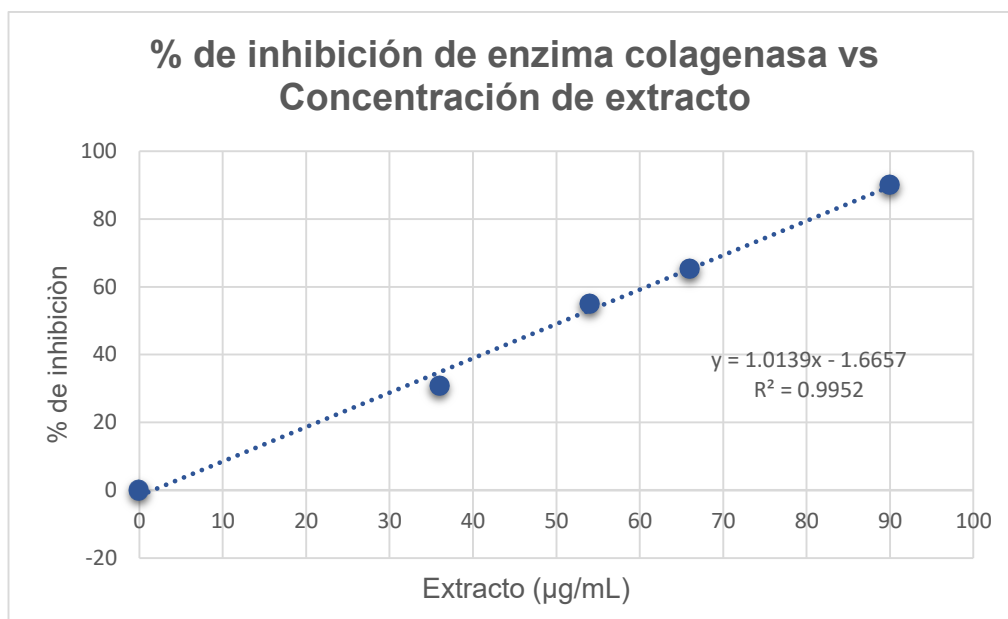


Figura 14. Curva de inhibición de la enzima colagenasa del extracto hidroalcohólico de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr.

4.6.2 Actividad antielastasa

La Tabla 21 y Figura 15 muestran la inhibición de la enzima elastasa por el extracto de *Krapfia weberbaueri* en un rango de 6-37 %, se puede observar una relación directa entre las concentraciones de extracto hidroalcohólico y de actividad antielastasa.

Tabla 21. Actividad inhibidora de la enzima elastasa del extracto hidroalcohólico de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr.

Extracto (µg/mL)	Prom. Abs ± DE	CV del Prom. Abs	%Inhibición
0	0,1072 ± 0,0001	0,0933	0,0000
200	0,1002 ± 0,056	5,5452	6,4988
400	0,0942 ± 0,0002	0,1621	12,0958
520	0,0875 ± 0,0061	6,9887	18,3458
840	0,0724 ± 0,054	7,5065	32,4316
960	0,0672 ± 0,0013	1,9202	37,3445
IC 50 = 1297,6926 µg/mL			

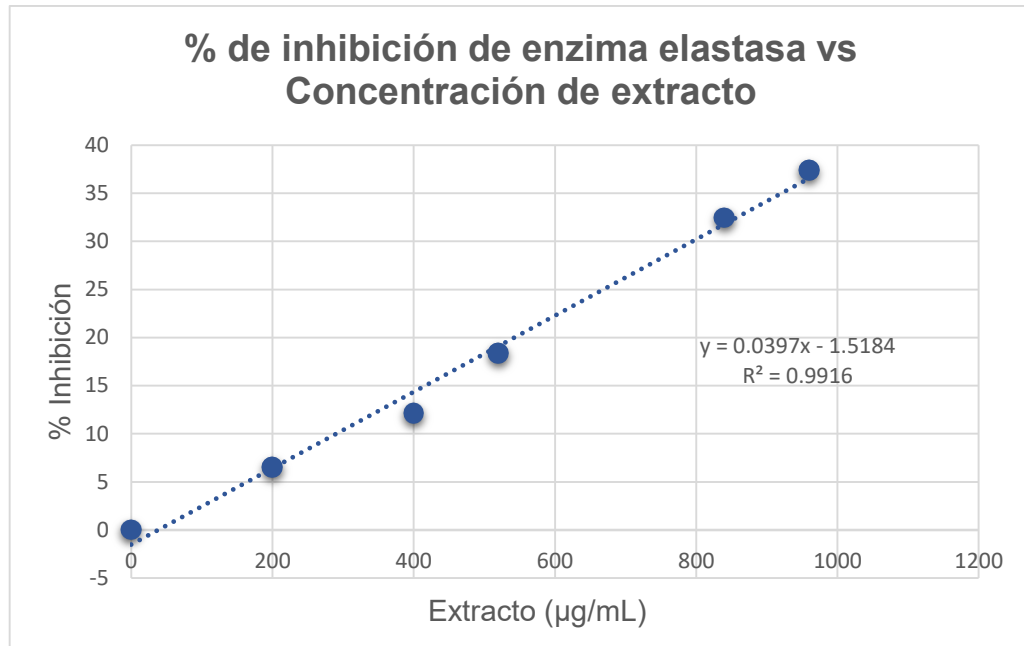


Figura 15. Curva de inhibición de la enzima elastasa del extracto hidroalcohólico de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr.

Se reportaron valores de IC 50 de 18,8749 µg/mL y 1297,6926 µg/mL, correspondientes al estándar del galato de epigallocatequina (Anexo 10: Tabla 29) y del extracto hidroalcohólico, respectivamente, con lo cual se puede apreciar que el extracto de *Krapfia weberbaueri* no presenta actividad antielastasa en comparación con el estándar, no exhibió inhibiciones mayores del 50 % de esta enzima.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, son el inicio de posteriores investigaciones en *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr. Las investigaciones científicas permiten explorar nuestras variedades de especies vegetales mediante la identificación de compuestos bioactivos y el desarrollo de ensayos *in vitro* que comprueban y relacionan su uso medicinal. El estudio de esta planta medicinal genera nuevos aportes que contribuyen, guían e incentivan la investigación de nuestras plantas peruanas con prometedoras actividades terapéuticas. El uso medicinal es un indicador de la posible presencia de compuestos biológicamente activos que ameritan ser investigados, de igual forma es relevante difundir temas de conservación y aprovechamiento de su uso sostenible.

Krapfia weberbaueri actualmente está categorizada como En Peligro (EN) según los Criterios de la UICN²⁹, pasó de las Categorías y Subcriterios VUB1ab(iii) a ENB1ab(v)²⁹. La Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN proporciona información sobre la distribución, tamaño poblacional, hábitat, ecología, uso y amenazas que presentan las especies a nivel mundial. Es un indicador de Los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) que establecen medidas críticas para proteger las especies amenazadas y evitar su extinción¹⁰⁰. Por consiguiente, es relevante continuar promoviendo medidas de conservación que permitan la protección de nuestras especies endémicas que enfrentan un riesgo alto de extinción, previniendo así la pérdida de nuestra biodiversidad.

El extracto exhibió una prometedora actividad antioxidante y anticolagenasa *in vitro*, lo cual es motivo para continuar con su investigación teniendo en cuenta que la actualización de especies en categoría de riesgo CR, EN, VU es cada 2 años¹⁰¹ y el rendimiento obtenido fue de 3,36 % (Tabla 13). Es recomendable seguir empleando metodologías *in vitro* que no requieran recolectar un mayor número de individuos o la posibilidad de realizar cultivos *in vitro* hasta completar su investigación.

Los compuestos bioactivos se acumulan en partes específicas de la planta, varían cuantitativamente y cualitativamente entre especies estrechamente relacionadas y dentro de una misma especie¹⁰². El presente estudio confirma que tallos y hojas de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr. “Rima Rima” producen polifenoles y flavonoides implicados en la capacidad antioxidante frente a radicales libres.

La identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de *Krapfia weberbaueri*, reveló la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, triterpenoides, lactonas, observándose una coloración intensa en sus respectivas reacciones de identificación; también es posible sugerir la presencia moderada de glucósidos y antraquinonas y con presencia leve taninos, en tanto para saponinas y alcaloides los resultados fueron negativos (Tabla 12). Al no identificarse estos metabolitos se infiere que la actividad antioxidante y antienzimática no está atribuida a ellos y nos da una idea inicial de sus componentes químicos. Investigaciones anteriores han demostrado que los polifenoles y flavonoides pueden usarse como antioxidantes contra diferentes enfermedades inducidas por estrés oxidativo¹⁰³.

Las pruebas de Baljet y de hidroxamato férrico confirmaron la presencia de compuestos con grupo lactona¹⁰⁴ y lactonas tipo γ ¹⁰⁵, respectivamente. La protoanemonina podría ser una de las lactonas presentes en el extracto que como se mencionó anteriormente es liberada cuando el material vegetal se deja secar o los tejidos se trituran⁴⁸.

Mediante la reacción de vainillina se confirmó la presencia de glucósidos. Un ranunculósido identificado en *Ranunculus muricatus* L., presentó inhibición de radicales libres y de enzimas lipoxigenasa y xantina oxidasa¹¹, por lo cual este tipo de glucósido u otros podrían estar presentes en el extracto y ser uno de los compuestos que le otorguen actividad antioxidante *in vitro*. Con respecto a la Ranunculina, no puede inferirse su presencia en el extracto, debido a que en el tratamiento de la muestra se realizó la reducción de tamaño, y maceración de hojas y tallos.

En Ancash-Perú también se encuentran otras especies endémicas pertenecientes a la familia Ranunculaceae como *Laccopetalum giganteum*¹⁰⁶, esta planta comparte junto con el género *Krapfia* caracteres morfológicos florales: flores subglobosas, sépalos, pétalos cóncavos y gruesos, y la presencia de un androginóforo⁷. Se han identificado compuestos fenólicos, flavonoides, glucósidos, taninos y alcaloides en el extracto etanólico de flores de *Laccopetalum giganteum*⁹. La reacción de Dragendorff no identificó alcaloides en el extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Krapfia weberbaueri*, estos resultados pueden diferir por el tipo de extracción y órgano empleado. Se infiere también que los géneros filogenéticamente cercanos de una misma familia pueden no compartir los mismos tipos de metabolitos secundarios. Los análisis filogenéticos fundamentan la presencia de metabolitos secundarios estructuralmente similares en los géneros de un mismo clado y son indicadores de descendencia común¹⁰⁷. No obstante, estudios han demostrado que las relaciones filogenéticas no predicen de manera exacta el nivel de actividad antioxidante entre especies de un mismo género y entre géneros en una misma familia¹⁰⁸.

La composición química de las especies vegetales es influenciada por factores climáticos, genéticos, calidad de suelo, época de año, etc. La selección, recolección, tratamiento de la droga vegetal, solventes y procedimiento de extracción, son parámetros que pueden afectar la calidad del extracto, estos conllevan a extraer e identificar diferentes metabolitos secundarios en una misma planta⁵⁵. Los resultados obtenidos en el presente estudio han sido influenciados por estos factores y parámetros.

Raíces de *Ranunculus praemorsus*, otra especie de este género, fueron recolectadas en el departamento de Apurímac para la obtención de un extracto hidroalcohólico (8:2), en el cual a diferencia de “Rima Rima”, si se identificaron alcaloides en las reacciones de Dragendorff, Mayer y Wagner¹⁰. Los alcaloides en las formas libres y de sal son solubles en mezclas hidroalcohólicas¹⁰⁹. La preparación del extracto fue bastante similar, el solvente utilizado tiene una mayor

proporción de alcohol, lo cual puede haber permitido una mayor extracción de alcaloides. Igualmente, el lugar de colecta, condiciones edafológicas, y órgano vegetal empleado influyen en la extracción de compuestos.

Se obtuvo un valor de $5,7459 \pm 0,0127$ mg de ácido gálico/g de extracto en la cuantificación de polifenoles totales (Tabla 15). Mayormente, los polifenoles son más de naturaleza hidrofílica que lipofílica, para la extracción de ácidos fenólicos muy polares (ácidos benzoico, cinámico) se recomienda utilizar mezclas de alcohol-agua o acetona-agua¹¹⁰. En este sentido, fue adecuado utilizar la mezcla alcohol-agua (7:3) para la extracción de compuestos fenólicos. Autores afirman que la elección del disolvente es esencial para la eficiencia en el proceso de extracción, y es el parámetro que más influye en la capacidad antioxidante¹¹¹.

Los polifenoles son susceptibles a la oxidación, y pueden formar complejos con carbohidratos, proteínas o polimerizados que pueden proporcionar resistencia a las técnicas eficaces de extracción o aislamiento¹¹². La extracción de compuestos fenólicos podría no haberse efectuado totalmente en el presente extracto por estas características.

En la cuantificación de flavonoides el extracto hidroalcohólico de *Krapfia weberbaueri* reportó $86,7086 \pm 0,0656$ mg de QE/g de extracto (Tabla 15), una buena cantidad de flavonoides. En el extracto de hojas, tallos y flores de *Ranunculus arvensis* L se evaluó la extracción de flavonoides por diferentes solventes, obteniendo la fracción de acetato de etilo mayor contenido de flavonoides, 48 ± 1 QE/mg¹¹³. Esta diferencia en los valores obtenidos está influenciada por los órganos vegetales empleados, y por la reacción con el sistema $\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3$ en medio básico (NaOH)⁸⁴ (Tabla 6), favorable para la formación del complejo coloreado entre los iones aluminio y los flavonoides.

En el análisis estadístico, todos los valores obtenidos en la medición de actividad antioxidante *in vitro* presentaron diferencia significativa ($p < 0,05$) con un nivel de confianza al 95 % (Anexos 11,12 y 13). Se aplicó la desviación estándar para denotar la variación de datos; para la relación entre el tamaño de la media y la variabilidad de la variable se halló el coeficiente de variación (CV). Si el valor del

CV es mayor del 30 %, los datos son dispersos y si es mayor del 50 %, indican una mayor dispersión¹¹⁴. Todos valores de CV hallados de las actividades antioxidante y antienzimática *in vitro* no superaron el 30 %, lo cual demostraría que los datos poseen una media representativa, son resultados confiables y provienen de una muestra homogénea.

Se visualizó una decoloración en los tubos de reacción de los métodos DPPH• y ABTS^{•+} después de sus tiempos de captación de radicales libres, 30 min y 7 min, respectivamente (Figuras 40 y 41). La decoloración visible es un indicador de la reducción o neutralización de los radicales libres¹¹⁵. En el método FRAP se visualizó una coloración azul intensa resultante (Figura 43), siendo los tubos con mayor concentración de extracto los más coloreados, esto es un indicador de la reducción férrica y formación del complejo ferroso⁹³. Todas las gráficas de concentración de extracto vs % inhibición (DPPH• y ABTS^{•+}) y concentración de extracto vs absorbancias (FRAP) presentaron una linealidad con $R^2 > 0,99$ (Figuras 11, 12 y 13).

El método DPPH• se utiliza actualmente para evaluar el potencial antioxidante de un compuesto, extractos, alimentos u otras fuentes biológicas, y generalmente se utiliza al Trolox® como estándar^{88,115}. De acuerdo a Brand-Williams¹¹⁶ “la actividad antioxidante se define como la cantidad o concentración de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH• en un 50 % (IC 50 = concentración eficaz)”. El extracto de tallos y hojas de “Rima Rima” reportó un IC 50 de 77,7647 µg/mL (Tabla 16) y el IC 50 del estándar Trolox® fue de 2,4264 µg/mL (Anexo 6: Tabla 25), se puede inferir que el presente extracto si presenta actividad antioxidante, no obstante, no superó al Trolox®, ya que el estándar con una menor concentración inhibe el 50 % del radical DPPH• (39 veces mayor a la del extracto).

En *Ranunculus muricatus* L por medio de análisis espectroscópicos UV, IR, se aisló e identificó un nuevo glucósido en una fracción de acetato de etilo. Este metabolito, reportó un IC 50 = $56,7 \pm 0,43$ µM en el método DPPH•, valor cercano a su estándar BHA de $44,2 \pm 0,33$ µM, también presentó potencial inhibitorio de las enzimas lipooxigenasa y xantina oxidasa¹¹. En comparación con el extracto, este glucósido

tiene mayor capacidad antioxidante frente al radical DPPH•, esta diferencia puede deberse a la pureza del metabolito. El aislamiento de cualquier metabolito permite obtener compuestos puros a partir de extractos naturales, lo cual disminuye la probabilidad de interferencias o contaminación en los ensayos químicos y biológicos¹¹⁷.

En el método ABTS^{•+} los cromógenos pueden disolverse en medios acuosos y orgánicos, a diferencia del método DPPH• que es más soluble en medio orgánico y más aplicable a sistemas hidrófobos. Por consiguiente, es importante realizar ambas metodologías por la utilidad en la determinación de capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica de extractos naturales y fluidos corporales^{87,90,118}. De acuerdo a esta afirmación, los resultados obtenidos en ambos métodos indicarían que tallos y hojas de *Krapfia weberbaueri* contienen antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, una buena capacidad antioxidante total.

Los radicales libres atacan a las membranas celulares lipofílicas y al contenido celular soluble¹¹⁵. El extracto hidroalcohólico de *Krapfia weberbaueri* al poseer antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, sería de gran utilidad en el sistema de defensa y mantener el equilibrio fisiológico celular como los antioxidantes no enzimáticos: tocoferoles, carotenos, ascorbato, glutatión, etc. que actúan a nivel del citosol (hidrofílicos) y en membranas celulares (lipofílicos)⁶⁶, sus compuestos bioactivos podrían prevenir o regular la peroxidación lipídica.

El presente extracto reportó un IC 50 = 36,2218 µg/mL en el ensayo ABTS^{•+} (Tabla 17), se considera que presenta una buena actividad antioxidante, pero no superior al estándar Trolox® con IC 50 = 3,1793 µg/mL (Anexo 7: Tabla 26). En un estudio realizado en Argelia, el extracto metanólico y fraccionado en n-butanol de partes aéreas de *Ranunculus macrophyllus* reportó un IC 50 = 247 µg/mL¹¹⁹, lo cual significaría que el extracto de “Rima Rima” tiene mayor actividad antioxidante que esta especie *Ranunculus*. Esta diferencia podría deberse a la elección de solventes menos polares, y por la cantidad de compuestos antioxidantes presentes en *Ranunculus macrophyllus*.

El valor de IC 50 de una muestra es fundamental para identificar la concentración mínima inhibitoria, en este sentido, el presente extracto exhibió mayor captación de radicales libres en el método ABTS^{•+} (IC 50 = 36,2218 µg/mL) en comparación con el DPPH[•] (IC 50 = 77,7647 µg/mL). Muchas especies han reportado valores de IC 50 mayores a 100 µg/mL¹²⁰, significando una capacidad antioxidante menor a la del presente extracto. También hay extractos que superan los valores IC 50 de los estándares, entre 0,8 y 1,7 µg/mL, como la cascara y piel de *Vitis vinífera*¹²¹.

En estas metodologías *in vitro*, la actividad antioxidante también puede expresarse en términos de Ácido Ascórbico Equivalente (AAEAC o VEAC). Este estándar generalmente exhibe valores de IC 50 entre 5 y 20 µg/mL^{122,123}, cercanos al Trolox®. Comparándolo con el extracto hidroalcohólico (IC 50 = 77,7647 µg/mL), el ácido ascórbico posee una actividad antioxidante entre cuatro y quince veces mayor. Mayormente, los valores de los estándares son mínimos y se esperan ser superados por las muestras en investigación.

En el método FRAP, el complejo férrico (2,4,6-tripiridil-s-triazina [Fe(TPTZ)]⁺³) pasa a su forma ferrosa en medio ácido¹²⁴. A diferencia del DPPH[•] y ABTS^{•+}, el reactivo no es un radical libre, y con respecto a los mecanismos de reacción por parte de los antioxidantes, estos pueden donar electrones, pero no átomos de hidrogeno. En base a los resultados obtenidos, 55,5455 mg Ácido Ascórbico/g de extracto (Tabla 18), el extracto si posee poder reductor; no obstante, es importante resaltar que los antioxidantes son reductores, pero también hay otros compuestos que no son antioxidantes que también pueden reducir el complejo férrico¹²⁵, por lo que este valor podría estar sobreestimado.

En un estudio de comparación de solventes a cuatro especies de *Ranunculus* provenientes del oeste de Rumanía, los extractos hidroalcohólicos (7:3), proporción igual a la empleada en el presente trabajo, presentaron menor valor FRAP expresados en Equivalentes Trolox (ET/100mL) en comparación con los extractos glicerol-etanol (1:1)¹⁴. Los extractos de partes aéreas de *Ranunculus ficaria* (hidroalcohólico) y *Ranunculus bulbosus* (glicerol-etanol), obtuvieron mayor cantidad de flavonoides y ácidos fenólicos, respectivamente; sin embargo, en el

FRAP solo *R. bulbosus* (glicerol-etanol) presentó uno de los mayores valores con 163 $\mu\text{M ET}/100\text{mL}$, el poder reductor del complejo $[\text{Fe}(\text{TPTZ})]^{+3}$ estaría influenciado por la presencia de ácidos fenólicos. La investigación utilizó rutósido, ácido cafeico y trolox para los ensayos de flavonoides, polifenoles y FRAP, respectivamente. Esto confirma que la mezcla de alcohol-agua permite una mayor o menor disolución de algunos tipos de polifenoles (ácidos fenólicos) que pueden ejercer mayor actividad antioxidante.

En un estudio realizado a *Ranunculus sceleratus*, a partir de una extracción metanólica de la planta entera se compararon diferentes fracciones de n-hexano, cloroformo, acetato de etilo, n-butanol y agua; reportando la fracción de acetato de etilo mayores valores en compuestos fenólicos totales y en DPPH•, con resultados de $97,1 \pm 1,0 \text{ GAE/mg/g}$ y un $\text{IC } 50 = 44,1 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$, respectivamente¹²⁶. El extracto de “Rima Rima”, presentó menor cantidad de polifenoles totales 5,7459 mg GAE/g y en DPPH• con $\text{IC} = 76,7191 \mu\text{g/mL}$; esta diferencia se debe a que en “Rima Rima” se realizó una maceración y extracción hidroalcohólica de solo tallos y hojas (Figura 6), lo que ha permitido una extracción regular de compuestos fenólicos más hidrosolubles.

En los ensayos antienzimáticos *in vitro* se utilizó como estándar al galato de epigallocatequina. En ambos métodos, se estableció una relación directa entre la inhibición de enzimas y la concentración de extracto desde concentraciones bajas hasta un límite máximo (Figuras 14 y 15).

El extracto hidroalcohólico de “Rima Rima” exhibió mayor actividad inhibidora de la enzima colagenasa ($\text{IC } 50 = 50,9573 \mu\text{g/mL}$) en comparación con EGCG ($\text{IC } 50 = 211,1552 \mu\text{g/mL}$). Se observó la inhibición de enzima desde 30,7833 % hasta 90,0131 % en el rango de concentraciones de 36 a 90 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabla 20). Los grupos obtuvieron diferencia significativa entre las medias ($p < 0,05$), excepto el grupo control con la concentración de 36 $\mu\text{g/mL}$, y la concentración de 66 $\mu\text{g/mL}$ con la concentración de 54 y 90 $\mu\text{g/mL}$ (Anexo 14).

Respecto a la actividad antielastasa, la cantidad de p-nitroanilide producida en cada aumento de concentración de extracto estableció una inhibición de 6,4988 % hasta

37,3445 % de enzima elastasa, entre las concentraciones de 200 y 960 µg/mL, respectivamente (Tabla 21). El valor de IC 50 del EGCG (IC 50 = 18,8749 µg/mL) en comparación con el extracto (IC 50 = 1297,6926 µg/mL) es mucho más potente, además el extracto no inhibió más del 50 % de enzima, por consiguiente, no presentó actividad antielastasa. Estos resultados presentaron diferencia significativa ($p < 0,05$) (Anexo 15).

En un estudio *in vitro*, se demostró que las sapogeninas (hederagenina, ácido oleanólico, ruscogenina) extraídas de algunas plantas, son fuertes inhibidores de la elastasa, mientras que los glucósidos terpenoides carecían de esta actividad¹²⁷. En el tamizaje fitoquímico realizado al presente extracto, mediante la reacción del índice de espuma no se identificó la presencia de saponinas, pero sí se identificaron glucósidos y triterpenoides, las ausencias de estos metabolitos podrían limitar la actividad antielastasa en el presente extracto.

Un estudio similar y más exhaustivo fue realizado en *Terminalia catappa* L., el extracto hidroalcohólico reportó polifenoles, captación del radical DPPH• y solo actividad anticolagenasa. La inhibición de enzima elastasa con un máximo de 12 %, solo se reportó en la concentración de 10 µg/mL, concentraciones mayores de hasta 500 µg/mL las inhibiciones fueron menores o nulas. Concentraciones de 50 a 1 000 µg/mL reportaron inhibiciones altas de enzima colagenasa, entre 81 y 100 %, respectivamente. El presente extracto si presentó inhibiciones de enzima mayores del 12 %, hasta un 37,3445 % con una concentración máxima de 960 µg/mL. De acuerdo a esta comparación, un extracto que inhibe menos del 50 % de enzima se considera con poca o con actividad antienzimática nula. Como los resultados fueron positivos para la enzima colagenasa, mediante irradiación UVB celular y lectores de fluorescencia, comprobaron que concentraciones de 25 a 100 µg/mL del extracto y sus hidrolizados inhiben significativamente la expresión proteica de MMP-1, MMP -9 y MMP -3 ($p < 0,05$). Estas metodologías podrían realizarse posteriormente en el extracto de “Rima Rima”, para comprobar la disminución de expresión de las MMP-1, MMP-9 y MMP-3 que son las

metaloproteinasas encargadas de aumentar la degradación colágeno tipo I y tipo III¹²⁸.

La estructura de las metaloproteinasas comprende un dominio catalítico y un sitio activo en la que contienen un átomo de zinc indispensable para la degradación de las proteínas de la MEC¹²⁹. Estudios anteriores han demostrado que a mayor contenido de polifenoles y flavonoides, las actividades antienzimáticas se incrementan, estos pueden actuar como quelantes al unirse al sitio activo de la enzima. Estudios han comprobado que la actividad quelante de iones metálicos (Fe^{+2} y Cu^{+2}) de compuestos fenólicos u otros metabolitos dependen de su concentración y pueden ser cercanas al EDTA¹³⁰.

La colagenasa de *Clostridium histolyticum* pertenece a la familia de las MMP-9, en condiciones fisiológicas puede hidrolizar sustratos sintéticos como el N-[3-(2-furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala y las regiones de triple hélice del colágeno. El extracto de “Rima Rima” podría disminuir la degradación de los colágenos I, IV y V, ya que estos son los sustratos sobre los que actúan las MMP-9.

Los polifenoles del té verde son de gran interés en los últimos años por su poder antioxidante, sus hojas contienen cuatro catequinas principales: (-)-epicatequina, (-)-galato de epicatequina, (-)-epigallocatequina y (-)-galato de epigallocatequina¹³¹. Las catequinas aisladas del extracto de té verde y sus polimerizados han reportado efectos inhibitorios de estas proteinasas, Kim et al.¹³² mediante el diseño y síntesis de catequinas polimerizadas demostraron que estas producen uniones más fuertes con el Zn en el dominio catalítico de la enzima. Además de la influencia del alto peso molecular, observaron que la introducción de grupos carboxilo e hidroxibencil pueden aumentar la fuerza de interacción con las enzimas colagenasa y elastasa, respectivamente. Las catequinas que son un tipo de flavanoles podrían estar presentes en el extracto de “Rima Rima” evitando la unión enzima-sustrato en la actividad anticolagenasa.

Thring et al.⁹⁶ en un estudio comparativo de 23 extractos de plantas, encontró mayor actividad anticolagenasa y antielastasa en el extracto acuoso de té blanco, a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el extracto exhibió 87 % y 89 % de inhibición, respectivamente, estos

efectos los atribuyeron al sinergismo entre las catequinas del extracto; el extracto hidroalcohólico de *Krapfia weberbaueri* tiene una inhibición de 87 % de enzima colagenasa a una concentración aproximada de 90 µg/mL, un menor valor de actividad antienzimática pero cercano al té blanco.

Con fines de protección contra el envejecimiento y la hiperpigmentación de la piel, las preparaciones médicas y cosméticas se componen principalmente de inhibidores de colagenasa, elastasa, hialuronidasa y tirosinasa¹³³, un ejemplo es la incorporación de *Macadamia integrifolia* como ingrediente en formulaciones cosméticas por encontrarse en el extracto de sus hojas actividad antitirosinasa además de polifenoles¹³⁴. La fuerte actividad anticolagenasa encontrada en el presente extracto hidroalcohólico sería uno de los fundamentos para poder continuarse investigando exhaustivamente estos efectos inhibitorios.

En las investigaciones también se elaboran formulaciones farmacéuticas empleando extractos como activos a distintas concentraciones, con el objetivo de evaluar mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* la variabilidad de actividad antioxidante y antienzimática en el producto farmacéutico^{19,135,136}.

En algunas metodologías los resultados no superan a los estándares, esto puede deberse a la cantidad de compuestos antioxidantes y sus diferentes mecanismos. El extracto obtenido es una mezcla de tallos y hojas que posiblemente permitan una mayor actividad, en comparación de emplearse un extracto con solo una parte de la planta. Autores sostienen que los componentes fitoquímicos pueden interaccionar entre ellos y presentarse sinergismo o antagonismo^{137,138}, un ejemplo es el ácido ascórbico que actúa como sinergista reduciendo los radicales antioxidantes primarios y potenciando su acción¹³⁹. Continuar con la investigación de los compuestos antioxidantes presentes en *Krapfia weberbaueri* permitiría interpretar sus diferentes mecanismos de defensa celular (relación estructura-actividad e interacciones posibles).

Por los resultados obtenidos en *Krapfia weberbaueri* "Rima Rima", la especie de estudio promete expectativas en su composición química de polifenoles, flavonoides, actividad antioxidante y anticolagenasa.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr “Rima Rima” presentó polifenoles, flavonoides, actividad antioxidante y actividad anticolagenasa.
2. El contenido de polifenoles y flavonoides de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr fue de $5,7459 \pm 0,0127$ mg GAE/g y $86,7086 \pm 0,0656$ mg QE/g de extracto, cuantificados por los métodos Folin-Ciocalteu y formación de un complejo de flavonoides con el tricloruro de aluminio, respectivamente.
3. El extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr “Rima Rima” exhibió actividad antioxidante *in vitro* en los métodos DPPH• y ABTS^{•+} reportando valores TEAC de 31,2018 y 87,7822 mg Trolox/g, respectivamente y en el método FRAP un valor AAEC de 55,5455 mg AA/g.
4. El extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr “Rima Rima” solo exhibió actividad antienzimática *in vitro* para la enzima colagenasa con un valor de IC 50 = 50,9573 µg/mL.

CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES

1. Para continuar las investigaciones sobre esta especie endémica, debe realizarse un análisis exhaustivo sobre su estado actual de conservación.
2. Identificar y realizar estudios de estructura-actividad de sus compuestos antioxidantes que permitan evaluar y comparar sus diferentes mecanismos de acción con otros tipos de antioxidantes exógenos.
3. Realizar estudios de toxicidad por pertenecer a un género característico de plantas acres y vesicantes.

CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Neha K, Haider MR, Pathak A, Yar MS. Medicinal prospects of antioxidants: A review. Eur J Med Chem. 2019;178:687-704. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.06.010.
2. Veiga M, Costa EM, Silva S, Pintado M. Impact of plant extracts upon human health: A review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2018;60(5):873-86. doi: 10.1080/10408398.2018.1540969.
3. Vargas F, Rivas C, Nursamaa A, Zoltan T. Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. Av en química. 2007;2(2):3-15.
4. Shahzad M, Choudhary A, Uzair M, Subhan A. The genus *Ranunculus*: A phytochemical and ethnopharmacological review. Int J Pharm Pharm Sci. 2012;4(Suppl 5):15-22.
5. Roca B, Suni M, Cano A. Desarrollo reproductivo de *Krapfia weberbaueri* (Ranunculaceae) en condiciones controladas de luz y temperatura. Rev Peru Biol. 2010;20(3):233-40.
6. Roca B. Descripción morfohistológica de tres especies de plantas altoandinas de Chacas Asunción, Ancash-Perú [Tesis de Título Profesional]. [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2012.
7. Lehnebach CA, Cano A, Monsalve C, McLenachan P, Hörandl E, Lockhart P. Phylogenetic relationships of the monotypic Peruvian genus *Laccopetalum* (Ranunculaceae). Plant Syst Evol. 2007;264(1-2):109-16. doi: 10.1007/s00606-006-0488-8.
8. Emadzade K, Lehnebach C, Lockhart P et al. A molecular phylogeny, morphology and classification of genera of Ranunculeae (Ranunculaceae). 2010;59(3):809-28. doi: 10.1002/tax.593011.
9. Arroyo J, Barreda A, Jurado B, Moral G, Palomino C. El extracto etanólico de

- las flores de *Laccopetalum giganteum* (pacra-pacra) aumenta la fertilidad en ratas. 2007;68(3):238-43.
10. Condori L. Efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Ranunculus praemorsus* H. B. K ex DC, en lesiones inducidas en ratas [Tesis de Magister]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018.
 11. Raziq N, Saeed M, Ali MS, Zafar S, Shahid M, Lateef M. A new glycosidic antioxidant from *Ranunculus muricatus* L. (Ranunculaceae) exhibited lipoxygenase and xanthine oxidase inhibition properties. Nat Prod Res. 2017;30(11):1251-7. doi: 10.1080/14786419.2016.1236098.
 12. Mokhtari TS, Shahdadi F, Nasab R. Evaluation of antiradical properties of methanolic, ethanolic, acetonic and hexan extracts of *Rusamarinus officianalis* L and *Ranunculus bulbosus* from Jiroft city. Int J Biosci. 2014;4(12):172-7. doi: 10.12692/ijb/4.12.172-177.
 13. Deghima A, Righi N, Rosales-Conrado N, León-González ME, Gómez-Mejía E, Madrid Y, et al. Bioactive polyphenols from *Ranunculus macrophyllus* Desf. Roots: Quantification, identification and antioxidant activity. South African J Bot. 2020;132:204-14. doi: 10.1016/j.sajb.2020.03.036.
 14. Neag T, Toma CC, Olah N, Ardelean A. Polyphenols profile and antioxidant activity of some Romanian *Ranunculus* species. Stud Univ Babes-Bolyai Chem. 2017;62(3):75-88. doi: 10.24193/subbchem.2017.3.06.
 15. Prieto JM, Recio MC, Giner RM, Máñez S, Ríos JL. Pharmacological approach to the pro- and anti-inflammatory effects of *Ranunculus sceleratus* L. J Ethnopharmacol. 2003;89(1):131-7. doi: 10.1016/S0378-8741(03)00271-X.
 16. Rojas R, Doroteo VH, Díaz C, Vaisberg A, Neira M, Terry C. Actividad antioxidante, antielastasa, anticlagenasa, protectora contra rayos UV-B, promotora de síntesis de colágeno *in vitro* y estudios de seguridad/eficacia de extractos de *Bixa orellana* (“achiote”) y *Oenothera rosea* (“chupasangre”).

2013;

17. Doroteo VH, Terry C, Díaz C. Compuestos fenólicos y actividades antioxidante, antielastasa, anticolagenasa y fotoprotectora *in vitro* de *Myrciaria dubia* (camu camu) y *Caesalpinia spinosa* (tara). 2012;78(4):254-63.
18. Giurfa G, Oblitas J. Polifenoles, actividades antioxidante, antielastasa, anticolagenasa, efecto fotoprotector de *Lessonia nigrescens* Bory y desarrollo de una forma dermocosmética [Tesis de Título Profesional]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.
19. Rodríguez J. Determinación de polifenoles, actividad antioxidante, antielastasa, anticolagenasa y elaboración de una fórmula dermocosmética a partir del extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* M.A. Howe. [Tesis Doctoral]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
20. Soukup J. Vocabulario de los nombres vulgares de la Flora Peruana y Catalogo de los Generos. Lima: Salesiana; 1987. 235 p.
21. Missouri Botanical Garden. Tropicos.org [Internet]. Saint Louis: Missouri Botanical Garden. 2021 [citado 2 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://tropicos.org/name/27101057>
22. Macbride JF. Ranunculaceae. En: Flora of Perú. Botanical Series; 1937. p. 639-51.
23. Gardner D. *Ranunculus weberbaueri*: Ranunculáceas. Curti's Botanical Magazine [Internet]. 1998 [citado 10 de octubre de 2021];15(4):231-5. Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/45065890> doi: 10.1111/1467-8748.00178.
24. Tamura M. Ranunculaceae. En: Kubitzki K, Rohwer J, editores. The Families and Genera of Vascular Plants II Flowering Plants - Dicotyledons. Berlin Heidelberg; 1993. p. 153-62.
25. Brako L, Zarucchi JL. Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms

- of Peru. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 1993. 45:i–XI, 1–1286. p.
26. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Ranunculaceae. Ciudad de México; 2020. doi: 10.22201/ib.
 27. León B, Roque J, Ulloa Ulloa C, Pitman N, Jørgensen P, Cano A. El libro rojo de las plantas endémicas del Perú. Rev Peru Biol. 2006;13(2):1-980.
 28. UICN. Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN. 2 ed. 2001;126.
 29. Trinidad P. *Krapfia weberbaueri*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019 [Internet]. 2019 [citado 10 de octubre de 2021]. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T133321147A133322183.en>
 30. Cano A. Análisis de la composición de la flora vascular del departamento de Áncash (Perú). [Tesis Doctoral]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2020.
 31. Ramírez D. Flora vascular y vegetación de los humedales de Conococha, Ancash, Perú [Tesis de Título Profesional]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2011.
 32. Galván GY, Castillo JA. Fanerógamas de la provincia de Huancayo, Perú. Rev Peru Biol. 2004;11(2):193-202.
 33. Santa Cruz L. Inventario de la flora de angiospermas del distrito Pulán, provincia Santa Cruz, Cajamarca, Perú. Arnaldoa. 2019;26(1):139-212. doi: 10.22497/arnaldoa.261.26108.
 34. Trinidad H, Mendoza W, Cano A. *Krapfia grace-servatii* (Ranunculaceae), a New Species from the High Andes of Peru. Harvard Pap Bot. 2013;18(2):259-63. doi: 10.3100/025.018.0201.
 35. Walter D. Rima rima : une renoncule andine aux pouvoirs magiques. En: Jardin botanique du Col de Saverne. Association des Amis du Jardine

- botanique du Col de Saverne; 2010. p. 7-11.
36. Walter D. Algunos aportes a la etnobotánica en la Cordillera Blanca (Sierra de Ancash). *Indiana*. 2017;34(1):149-76. doi: 10.18441/ind.v34i1.149-176.
 37. Mostacero J. Características edafoclimáticas y fitogeográficas de las plantas medicinales del Dominio Andino Noroccidental del Perú, durante 1976 al 2004. [Tesis Doctoral]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2005.
 38. Hao DC. Biodiversity, Chemodiversity, and Pharmacotherapy of Ranunculus Medicinal Plants. En: *Ranunculales Medicinal Plants*. Academic Press; 2018. p. 357-86. doi: 10.1016/b978-0-12-814232-5.00009-5.
 39. Hill R, Van R. Ranunculin; the precursor of the vesicant substance of the buttercup. *The Biochemical Journal*. 1951;49(3):332-5. doi: 10.1042/bj0490332.
 40. Saroya S. Phytochemicals. En: *Herbalism, Phytochemistry and Ethnopharmacology*. New York: Science Publisher; 2011. p. 143.
 41. Lorimer SD, Barns G, Evans AC, Foster LM, May BCH, Perry NB, et al. Cytotoxicity and antimicrobial activity of plants from New Zealand's subantarctic islands. *Phytomedicine*. 1996;2(4):317-23. doi: 10.1016/s0944-7113(96)80077-8.
 42. Bonora A, Botta B, Menziani-Andreoli E, Bruni A. Organ-specific Distribution and Accumulation of Protoanemonin in *Ranunculus ficaria* L. *Biochem und Physiol der Pflanz*. 1988;183(5):443-7. doi: 10.1016/s0015-3796(88)80059-3.
 43. Benn M, Yelland LJ, Parvez M. Ranunculin. *Acta Crystallogr Sect E Struct Reports Online*. 2010;66(10). doi: 10.1107/S1600536810034847.
 44. Kocak AO, Saritemur M, Atac K, Guclu S, Ozlu I. A rare chemical burn due to ranunculus arvensis: Three case reports. *Ann Saudi Med*. 2016;36(1):89-91. doi: 10.5144/0256-4947.2016.89.
 45. Didry N, Dubreuil L, Pinkas M. Microbiological properties of protoanemonin

- isolated from *Ranunculus bulbosus*. *Phyther Res.* 1993;7(1):21-4. doi: 10.1002/ptr.2650070107.
46. Pañeda A, Apan M. Synthesis and cytotoxic evaluation of protoanemonin and three brominated derivatives. *Rev Colomb Quim.* 2020;49(3):13-8. doi: 10.15446/rcq.v49n3.87159.
 47. Saidi R, Ghrab F, Kallel R, El Feki A, Boudawara T, Chesné C, et al. Tunisian Clematis flammula Essential Oil Enhances Wound Healing: GC-MS Analysis, Biochemical and Histological Assessment. *J Oleo Sci.* 2018;67(11):1483-99. doi: 10.5650/JOS.ESS18056.
 48. Martin M, Ortíz de Urbina A, Montero M, Carrón R, San Román L. Pharmacologic Effects Of Lactones Isolated From *Pulsatilla Alpina* Subsp. *Apiifolija.* *J Ethnopharmacol.* 1988;24:185-91. doi: 10.1016/0378-8741(88)90150-x.
 49. Xiao PG. A preliminary study of the correlation between phylogeny, chemical constituents and pharmaceutical aspects in the taxa of Chinese *Ranunculaceae*. *Acta Phytotax Sin.* 1980;18(2):142-53.
 50. Wu BL, Zou HL, Qin FM, Li HY, Zhou GX, McPhee DJ. New *Ent*-Kaurane-Type Diterpene Glycosides and Benzophenone from *Ranunculus muricatus* Linn. *Molecules.* 2015;20(12):22445-53. doi: 10.3390/molecules201219801.
 51. Srivastava N, Singh A, Kumari P, et al. Advances in extraction technologies: isolation and purification of bioactive compounds from biological materials. En: Sinha R pág., Häder DP, editores. *Natural Bioactive Compounds.* Uttar Pradesh: Elsevier Inc.; 2021. p. 409-33. doi: 10.1016/b978-0-12-820655-3.00021-5.
 52. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2010;2(12):1231-46. doi: 10.3390/nu2121231.
 53. Singla RK, Dubey AK, Garg A, Sharma RK, Fiorino M, Ameen SM, et al. Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes,

- subcategories, and structures. *J AOAC Int.* 2019;102(5):1397-400. doi: 10.5740/jaoacint.19-0133.
54. Olszowy M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? *Plant Physiol Biochem.* 1 de noviembre de 2019;144:135-43. doi: 10.1016/j.plaphy.2019.09.039.
 55. Ferraro G, Martino S. V, Bandoni AL. *Fitocosmética: fitoingredientes y Otros Productos Naturales.* 1a ed. Buenos Aires; 2012. 272 p.
 56. Katiyar SK, Perez A, Mukhtar H. Green tea polyphenol treatment to human skin prevents formation of ultraviolet light B-induced pyrimidine dimers in DNA. *Clin Cancer Res.* 2000;6(10):3864-9.
 57. Hu S, Zhang X, Chen F, Wang M. Dietary polyphenols as photoprotective agents against UV radiation. *J Funct Foods.* 2017;30:108-18. doi: 10.1016/j.jff.2017.01.009.
 58. Trueba GP. Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cuba Investig Biomed.* 2003;22(1):48-57.
 59. Lien Ai PH, Hua H, Chuong PH. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci.* 2008;4(2):89-96.
 60. González-Torres M, Bentancourt-Rule M, Ortiz-Muñiz R. Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica [Internet].* 2000 [citado 5 de octubre de 2021];25(1):3-9. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/576/57611797001.pdf>
 61. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015;30(1):11-26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0.
 62. Ortiz JM, Medina EM. Estrés oxidativo ¿un asesino silencioso? *Educ Química.* 2020;31(1):1-11. doi: 10.22201/fq.18708404e.2020.1.69709.
 63. Paredes Salido F, Roca Fernández J. Influencia de los radicales libres en el

- envejecimiento celular. *Offarm Farm y Soc.* 2002;21(7):96-100.
64. Corrales LC, Muñoz MM. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova.* 2012;10(18):213. doi: 10.22490/24629448.1010.
 65. Delgado L, Betanzos G, Sumaya M. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investig Cienc.* 2010;18(50):10-5.
 66. Sies H. Oxidative Stress Reaction of Nitric Oxide With Superoxide : *Exp Physiol.* 1997;13(82):305-16. doi: 10.1113/expphysiol.1997.sp004024.
 67. Zamora JD. Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Rev Chil Nutr.* 2007;34(1):23.
 68. Buendía A, Mazuecos J, Camacho FM. Anatomía y Fisiología de la Piel. En: *Manual de dermatología.* 2.^a. 2018. p. 2-27. doi: 10.1001/jama.1947.02890040060037.
 69. Martínez C, Domínguez J. Endocrinología de la piel. *Rev venez endocrinol metab [Internet].* 2018 [citado 10 de octubre de 2021];16(3):149-66. Disponible en: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/3755/375557570003/html/index.html>
 70. Victoria J. Anatomía de la piel, pelo y uñas. En: *Aspectos claves: Cómo leer la piel [Internet].* Medellín; 2015 [citado 10 de octubre de 2021]. Disponible en: https://books.google.com.pe/books/about/Cómo_leer_la_piel.html
 71. Parenteau NL, Hardin-young J, Ross RN, Repair GT, Life I, Corporation L, et al. Skin. En: *Principles of Tissue Engineering.* 2.^a. 2000. p. 879-90.
 72. Pérez-García LJ. Metaloproteinasas y piel. *Actas Dermosifiliogr.* 2004;95(7):413-23. doi: 10.1016/S0001-7310(04)76850-7.
 73. Pittayaprupek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2016;17(6). doi: 10.3390/ijms17060868.

74. Azcona L, Farmacéutica B, Bizkaia D. Características y tratamiento cosmético. 2002;16.
75. Ruiz MA, Morales ME. Aproximación al tratamiento del envejecimiento cutáneo. *Ars Pharm.* 2015;56(4):183-91. doi: 10.4321/s2340-98942015000400001.
76. Sánchez-Saldaña L. Fotoenvejecimiento. *Dermatol Perú* 2014. 2003;24(4):223-4.
77. Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJS, Morison WL, Sauder DN. Photoaging: Mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol.* 2006;55(1):1-19. doi: 10.1016/j.jaad.2005.05.010.
78. Nakai K, Tsuruta D. What are reactive oxygen species, free radicals, and oxidative stress in skin diseases? *Int J Mol Sci.* 2021;22(19). doi: 10.3390/ijms221910799.
79. Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health. *Int J Food Sci Technol.* 2001;36(7):703-25. doi: 10.1046/j.1365-2621.2001.00513.x.
80. Singleton VL, Rossi JA, Jr J. Colorimetry of Total Phenolics With Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965;16(3):144-58.
81. International Organization of Standardization. ISO 14502-1. Determination Subst Charact Green Black Tea. 2005;1-10.
82. Jurd L, Geissman T. Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds. *J Org Chem.* 1956;21(12):1395-401. doi: 10.1021/jo01118a018.
83. Leal AI. Determinación de pigmentos antioxidantes de interés terapéutico (flavonoides y carotenoides) en mieles con propiedades antibacterianas de la zona Centro-Sur de Chile mediante espectroscopía UV [Tesis de Título Profesional]. Valdivia: Universidad Austral de Chile; 2016.

84. Zhu H, Wang Y, Liu Y, Xia Y, Tang T. Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. *Food Anal Methods*. 2010;3(2):90-7. doi: 10.1007/s12161-009-9091-2.
85. Kim DO, Jeong SW, Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem*. 2003;81(3):321-6. doi: 10.1016/S0308-8146(02)00423-5.
86. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical [10]. *Nature*. 1958;181(4617):1199-200. doi: 10.1038/1811199a0.
87. Becker MM, Nunes GS, Ribeiro DB, Silva FEPS. Informe breve. 2019;30:1108-14.
88. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*. 2011;48(4):412-22. doi: 10.1007/s13197-011-0251-1.
89. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*. 2005;53(10):4290-302. doi: 10.1021/jf0502698.
90. Shahidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods*. 2015;18:757-81. doi: 10.1016/j.jff.2015.01.047.
91. RE R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 2007;26(9/10):1231-7.
92. Benzie IF., Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «Antioxidant Power»: The FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239(0292):70-6. doi: 10.1039/c6ay01739h.
93. Londoño LJ. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. En: Garcés Giraldo LF, editor. *En Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia*. 2012. p. 129-62.

94. Mesa-Vanegas AM, Zapata-Uribe S, Arana LM, Zapata IC, Monsalve Z, Rojano B. Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. Bol Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromat. 2015;14(1):1-10.
95. Supuran CT, Scozzafava A, Clare BW. Bacterial protease inhibitors. Med Res Rev. 2002;22(4):329-72. doi: 10.1002/med.10007.
96. Thring TSA, Hili P, Naughton DP. Anti-collagenase, anti-elastase and antioxidant activities of extracts from 21 plants. BMC Complement Altern Med. 2009;9(1):27-37. doi: 10.1186/1472-6882-9-27.
97. Gülçin I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. Arch Toxicol. 2012;86(3):345-91. doi: 10.1007/s00204-011-0774-2.
98. Rodríguez-Montero L, Berrocal-Jiménez A, Campos-Rodríguez R, Madriz-Martínez M. Determinación de la actividad biocida de extractos vegetales para el combate de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Hemíptera: Aleyrodidae). Rev Tecnol en Marcha. 2020;33:117-29. doi: 10.18845/tm.v33i3.4373.
99. Gennaro A. Soluciones, emulsiones, suspensiones y extractos. En: Editorial Panamericana, editor. Remington Farmacia. 19va ed. 1995.
100. Ministerio del Ambiente. Objetivos de Desarrollo Sostenible e Indicadores. Ministerio del Ambiente [Internet]. 2016 [citado 12 de octubre de 2021];14-20. Disponible en: <https://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2016/07/ODS-FINAL210716.pdf>
101. Ministerio de Agricultura. Decreto Supremo N° 043-2006 AG: Categorización de especies amenazadas de Flora Silvestre. Diario Oficial El Peruano [Internet]. 2006 [citado 10 de enero de 2022];36. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/osinfor/normas-legales/792195-043-2006-ag-agrueban-categorizacion-de-especies-amenazadas-de-flora-silvestre>
102. Bohlin L. Natural Products Isolation. Drug Discov Today. 1998;3(12):536-7. doi: 10.1016/s1359-6446(98)01266-5.

103. Stagos D. Antioxidant activity of polyphenolic plant extracts. *Antioxidants*. 2020;9(1). doi: 10.3390/antiox9010019.
104. Ludwiczuk A, Skalicka-Woźniak K, Georgiev MI. Terpenoids. *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*. 2017. 233-266 p. doi: 10.1016/B978-0-12-802104-0.00011-1.
105. Bartos J. Colorimetric determination of organic compounds by formation of hydroxamic acids. *Talanta*. 1980;27(7):583-90. doi: 10.1016/0039-9140(80)80183-4.
106. Trinidad P. *Laccopetalum giganteum*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020. [Internet]. 2020 [citado 2 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T133321542A188835758.en>
107. Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. 2003;64(1):3-19. doi: 10.1016/S0031-9422(03)00300-5.
108. Tellez-Rocha N, Moncada B, Pombo-Ospina LM, Rodriguez-Aguirre OE. Actividad Antioxidante De Los Musgos *Breutelia subdisticha*, *Leptodontium viticulosoides* y *Pylaisia falcata*. *Cienc en Desarro*. 2021;12(2):1-20. doi: 10.19053/01217488.v12.n2.2021.12511.
109. Kuklinski C. *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Omega; 2003.
110. Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci*. 2007;30(18):3268-95. doi: 10.1002/jssc.200700261.
111. Brglez E, Knez M, Škerget M, Knez Ž, Bren U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*. 2016;21(7). doi: 10.3390/molecules21070901.
112. Hagerman AE. *Chemistry of Tannin-Protein Complexation*. Chem

- Significance Condens Tann. 1989;323-33. doi: 10.1007/978-1-4684-7511-1_20.
113. Deghima A, Righi N, Rosales-Conrado N et al. Anti-inflammatory activity of ethyl acetate and n-butanol extracts from *Ranunculus macrophyllus* Desf. and their phenolic profile. J Ethnopharmacol. 2021;265. doi: 10.1016/j.jep.2020.113347.
 114. Álvarez Cáceres R. Estadística aplicada a las ciencias de la salud. Díaz De Sa. España; 2007. 15-76 p.
 115. Gupta D. Methods for determination of antioxidant capacity: A review. Int J Pharm Sci Res. 2015;6(2):546-66. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.6(2).546-66.
 116. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Sci Technol. 1995;28(1):25-30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
 117. Do TKT, Hadji-Minaglou F, Antoniotti S et al. Secondary metabolites isolation in natural products chemistry: Comparison of two semipreparative chromatographic techniques (high pressure liquid chromatography and high performance thin-layer chromatography). J Chromatogr A. 2014;1325:256-60. doi: 10.1016/j.chroma.2013.11.046.
 118. Rice-Evans C, Miller N. Total antioxidant status in plasma and body fluids. Methods Enzymol. 1994;234(C):279-93. doi: 10.1016/0076-6879(94)34095-1.
 119. Deghima A, Righi N, Rosales-Conrado N, León-González ME, Baali F, Gómez-Mejía E, et al. Valorisation of the green waste parts from large-leaved buttercup (*Ranunculus macrophyllus* Desf.): Phenolic profile and health promoting effects study. Waste and Biomass Valorization. 2021;12(8):4307-18. doi: 10.1007/s12649-020-01310-z.
 120. Aubad P, Rojano B, Lobo T. Actividad antioxidante en musgos. Sci Tech.

2007;33(33):23-6.

121. Ordoñez E, Leon-Arevalo A, Rivera-Rojas H, Vargas E. Cuantificación de polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.), tuna (*Opuntia ficus indica* Mill), uva (*Vitis Vinífera*) y uvilla (*Pourouma cecropiifolia*). *Sci Agropecu.* 2019;10(2):175-83. doi: 10.17268/sci.agropecu.2019.02.02.
122. Nariya P, Nariya M, Shukla V, Acharya R, Bhalodia N. In vitro evaluation of antioxidant activity of *Cordia dichotoma* (Forst f.) bark. *AYU (An Int Q J Res Ayurveda).* 2013;34(1):124. doi: 10.4103/0974-8520.115451.
123. Martínez N del S, Arévalo K, Verde MJ, Morales CRM, Oranday A, Adriana Núez M, et al. Antocianinas y actividad anti radicales libres de rubus adenotrichus Schltl (zarzamora). *Rev Mex Ciencias Farm.* 2011;42(4):66-71.
124. Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Compos Anal.* 2011;24(7):1043-8. doi: 10.1016/j.jfca.2011.01.008.
125. Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem.* 2000;48(8):3396-402. doi: 10.1021/jf9913458.
126. Shahid S, Riaz T, Asghar MN. Screening of *Ranunculus sceleratus* for enzyme inhibition, antibacterial and antioxidant activities. *Bangladesh J Pharmacol.* 2015;10(2):436-42. doi: 10.3329/bjp.v10i2.22805.
127. Facino R, Carini M, Stefani R, Aldini G, Saibene L. Anti-Elastase and Anti-Hyaluronidase Activities of Saponins and *Ruscus aculeatus*: Factors Contributing to their Efficacy in the Sapogenins from *Hedera helix*, *Aesculus hippocastanurn*, and Treatment of Venous Insufficiency. *Arch Pharm (Weinheim).* 1995;328:750-724.
128. Chiang HM, Wen KC, Shih IC, Hu JC, Liao ST, Su TW. Inhibitory effects of *Terminalia catappa* on UVB-induced photodamage in fibroblast cell line.

- Evidence-based Complement Altern Med. 2011;2011. doi: 10.1155/2011/904532.
129. Coronato S, Laguens G, Di Girolamo V. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. Med. 2012;72(6):495-502.
 130. Sánchez-Chino XM, Jiménez-Martínez C, Ramírez-Arriaga E, Martínez-Herrera J, Corzo-Ríos LJ, Godínez García LM. Actividad antioxidante y quelante de metales de las mieles de *Melipona beecheii* y *Frieseomelitta nigra* originarias de Tabasco, México. TIP Rev Espec en Ciencias Químico-Biológicas. 2019;22:1-7. doi: 10.22201/fesz.23958723e.2019.0.186.
 131. Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LCM. Critical reviews in food science and nutrition: the chemistry of tea flavonoids. Crit Rev Food Sci Nutr. 1997;37(8):693-704.
 132. Kim YJ, Uyama H, Kobayashi S. Inhibition effects of (+)-catechin-aldehyde polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix. Biochem Biophys Res Commun. 2004;320(1):256-61. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.05.163.
 133. Younis MM, Ayoub IM, Mostafa NM, Hassab MA El, Eldehna WM, Al-rashood ST, et al. *Stenocarpus sinuatus* Leaves Extract. Plants. 2022;11(918):1-19.
 134. El Hawary SS, Abubaker M, Abd El-Kader EM, Mahrous EA. Phytochemical constituents and anti-tyrosinase activity of *Macadamia integrifolia* leaves extract. Nat Prod Res. 2022;36(4):1089-94. doi: 10.1080/14786419.2020.1849203.
 135. Barukcic A, Sola M. "Desarrollo de formulaciones fito-cosméticas antioxidantes empleando como sustancia activa el extracto seco de *Cinchona pubescens* Vahl, Rubiaceae (Cascarilla)". [Tesis de Magister]. Quito: Universidad Politécnica Salesiana; 2015.
 136. Hong YH, Jung EY, Noh DO, Suh HJ. Physiological effects of formulation containing tannase-converted green tea extract on skin care: physical

- stability, collagenase, elastase, and tyrosinase activities. *Integr Med Res.* 2014;3(1):25-33. doi: 10.1016/j.imr.2013.12.003.
137. Álvarez-Gómez F, Korbee N, Figueroa F. Analysis of antioxidant capacity and bioactive compounds in marine macroalgal and lichenic extracts using different solvents and evaluation methods. *Ciencias Mar.* 2016;42(4):271-88.
138. Efferth T, Koch E. Complex Interactions between Phytochemicals. The Multi-Target Therapeutic Concept of Phytotherapy. *Curr Drug Targets.* 2010;12(1):122-32. doi: 10.2174/138945011793591626.
139. Maestro-Durán R, Borja R. Actividad antioxidante de las vitaminas C y E y de la provitamina A. *Grasas y Aceites.* 1993;44(2):107-11. doi: 10.3989/gya.1993.v44.i2.1106.

CAPÍTULO IX. ANEXOS

Anexo 1. Certificado de Clasificación taxonómica de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr "Rima Rima"

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL

"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"

CONSTANCIA N° 270-USM-2019

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

La muestra vegetal (planta fértil) recibida de **Lourdes Victoria Tinoco**, estudiante de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; ha sido estudiada y clasificada como: ***Krapfia weberbaueri*** (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: MAGNOLIIDAE

ORDEN: RANUNCULALES

FAMILIA: RANUNCULACEAE

GENERO: *Krapfia*

ESPECIE: *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr

Nombre vulgar: "Rima rima"
Determinado por: Mg. María Isabel La Torre y Pamela Arista.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 23 de agosto de 2019


Dra. Joaquina Albán Castillo
(e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

JAC/ddb




An. Areuales 1256, Jesús María
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú





Teléfono:
619-7000 anexo 5701, 5703, 5704

E-mail: muscobn@unmsm.edu.pe
<http://muscobn.unmsm.edu.pe>

Anexo 2. Tamizaje fitoquímico de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr “Rima Rima”

Tabla 22. Resultados de Pruebas Fitoquímicas

Prueba Fitoquímica	Metabolito secundario	Resultados
Shinoda	Flavonoides	 Coloración rojo intenso +++
FeCl₃	Compuestos fenólicos	 Coloración verde oscura +++
Gelatina	Taninos	 Precipitado amarillo +

Borntrager	Antraquinonas		++
		Coloración roja	
Lieberman-Burchardat	Esteroides y Triterpenoides		+++
		Coloración roja en zona	
Índice de espuma	Saponinas		-
		Ausencia de espuma	
Vainillina	Glucósidos		++
		Interface violeta	

Dragendorff

Alcaloides



-

Ausencia de precipitado
rojo ladrillo

Wagner

Alcaloides



-

Ausencia de precipitado
blanco

Bertrand

Alcaloides



-

Ausencia de precipitado
blanco

Popoff

Alcaloides



-

Ausencia de precipitado
amarillo

Mayer

Alcaloides



-

Ausencia de precipitado
blanco

Baljet

Lactonas



+++

Coloración rojiza

Anexo 3. Prueba de Solubilidad del extracto de hojas y Tamizaje fitoquímico de *Krapfia weberbaueri* (Ulbr.) Standl. & J.F. Macbr “Rima Rima”

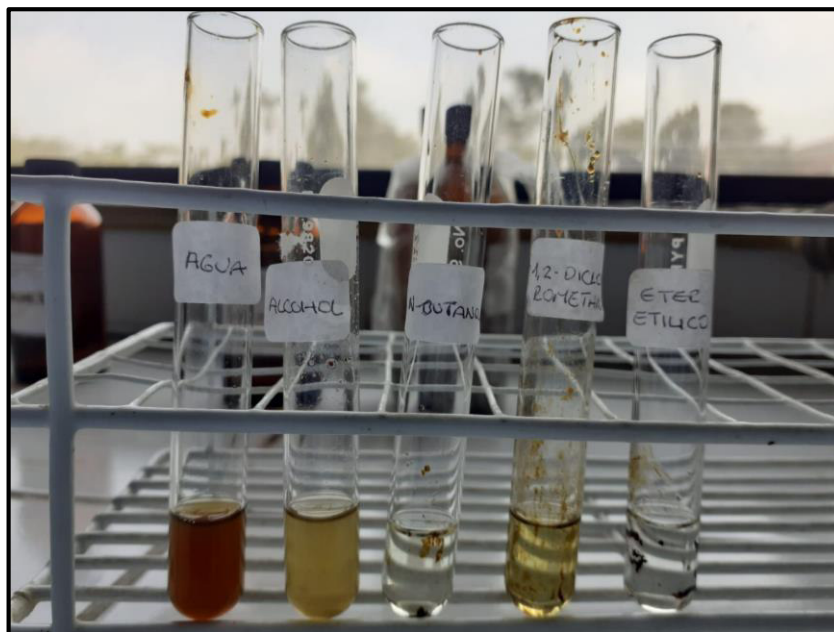


Figura 16. Solubilidad del extracto en solventes polares y apolares

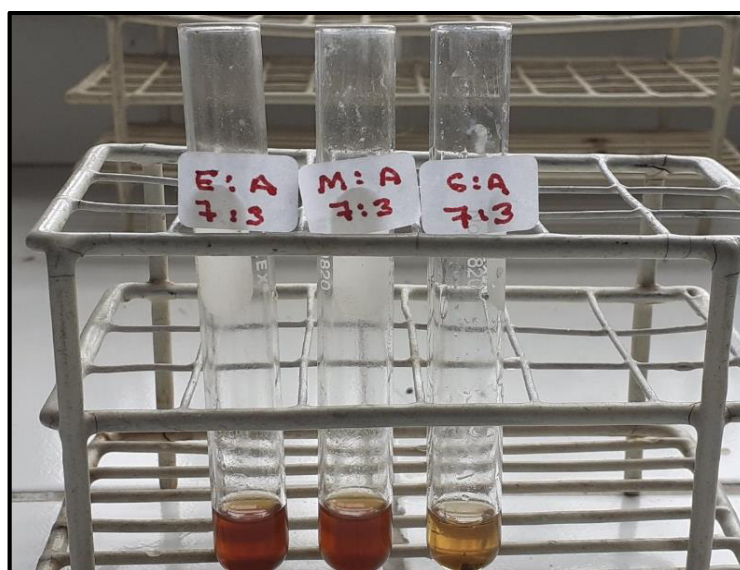


Figura 17. Solubilidad del extracto en mezcla de solventes (7:3)

Anexo 4. Estándar de ácido gálico por el método Folin-Ciocalteu

Tabla 23. Resultado de absorbancias–ácido gálico

Ácido gálico (µg/mL)	Prom. Abs*
5	0.0611
10	0.1223
20	0.2364
30	0.3371
40	0.4549
50	0.5604

* Lecturas a 765 nm.

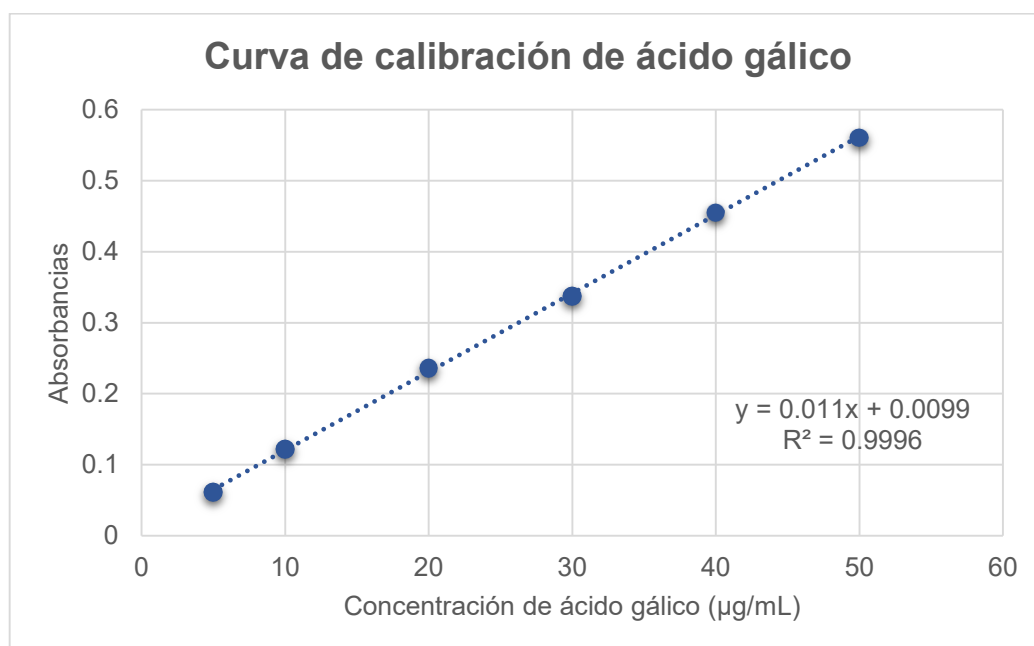


Figura 18. Curva de calibración de ácido gálico

Anexo 5. Estándar de quercetina por el método de complejo de flavonoides con $AlCl_3$

Tabla 24. Resultado de absorbancias-quercetina

Quercetina ($\mu\text{g/mL}$)	Prom. Abs*
5	0,0509
10	0,1088
20	0,2273
30	0,3368
40	0,4616
50	0,5785

* Lecturas a 500 nm

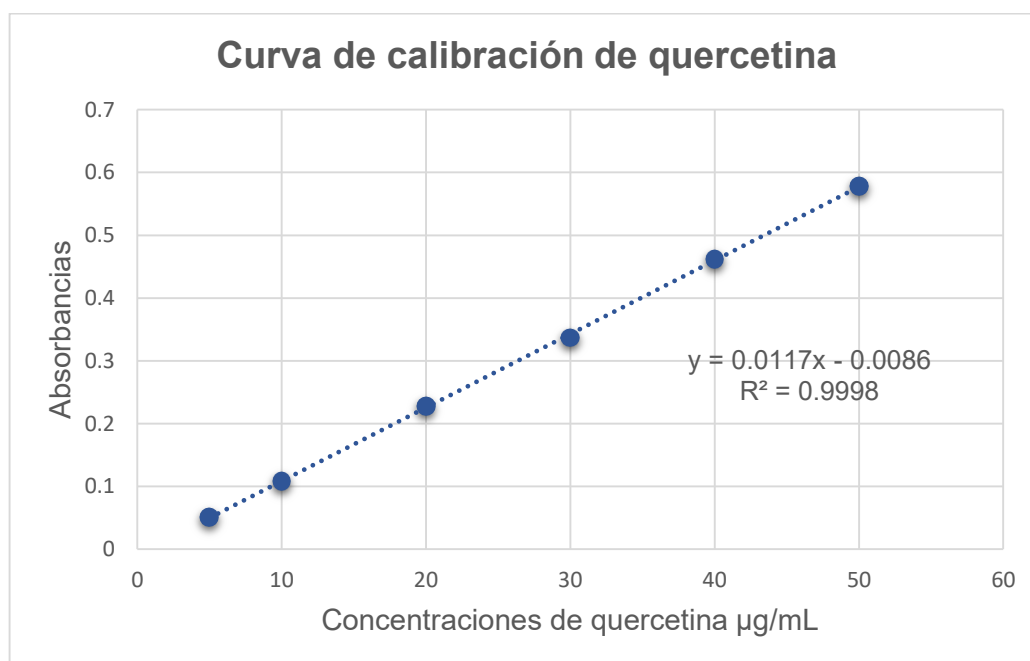


Figura 19. Curva de calibración de quercetina

Anexo 6. Actividad inhibidora del radical DPPH• del estándar Trolox®

Tabla 25. Captación del radical DPPH• por el estándar Trolox®

Trolox® (µg/mL)	Prom. Abs*	%Inhibición DPPH•
0	0,4581	0,0000
1,2	0,3379	26,2334
2,1	0,2532	44,7242
3,0	0,1721	62,4218
3,9	0,0845	81,5602
4,8	0,0284	93,8000

IC 50 = 2,4264 µg/mL

* Lecturas a 517 nm

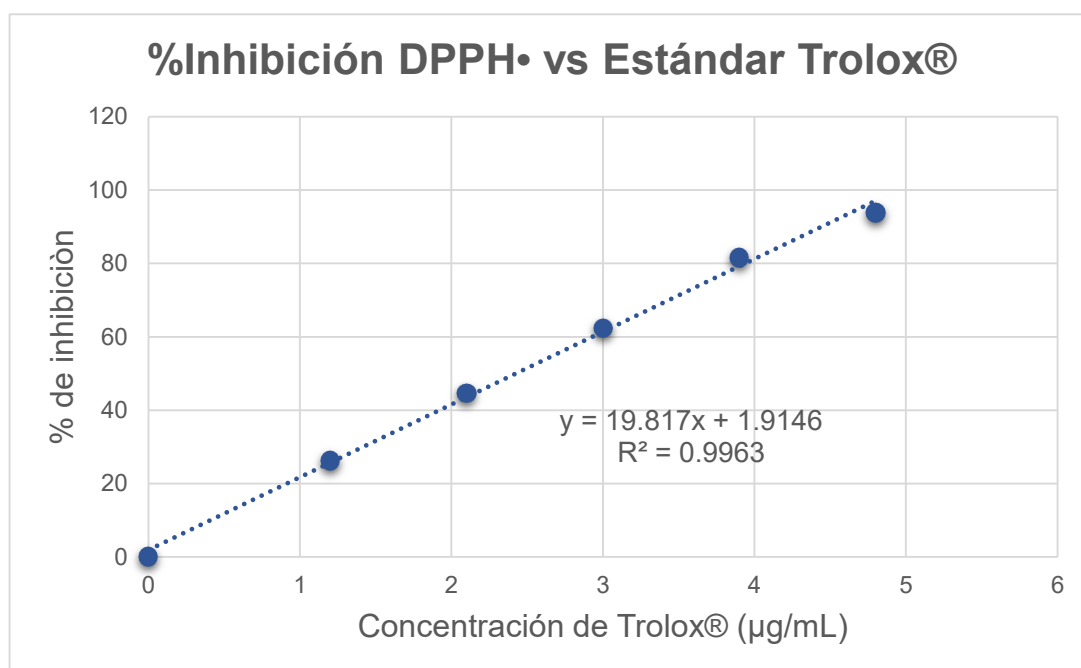


Figura 20. Inhibición del radical DPPH• del estándar Trolox®

Anexo 7. Actividad inhibidora del radical ABTS^{•+} del estándar Trolox[®]

Tabla 26. Captación del radical ABTS^{•+} del estándar Trolox[®]

Trolox [®] (µg /mL)	Prom. Abs*	%Inhibición ABTS ^{•+}
0	0,6803	0,0000
0,8	0,5996	11,8551
1,8	0,5076	25,3859
2,8	0,3779	44,4510
3,8	0,2753	59,5252
4,8	0,1563	77,0248

IC 50 = 3,1793 µg/mL

* Lecturas a 734 nm

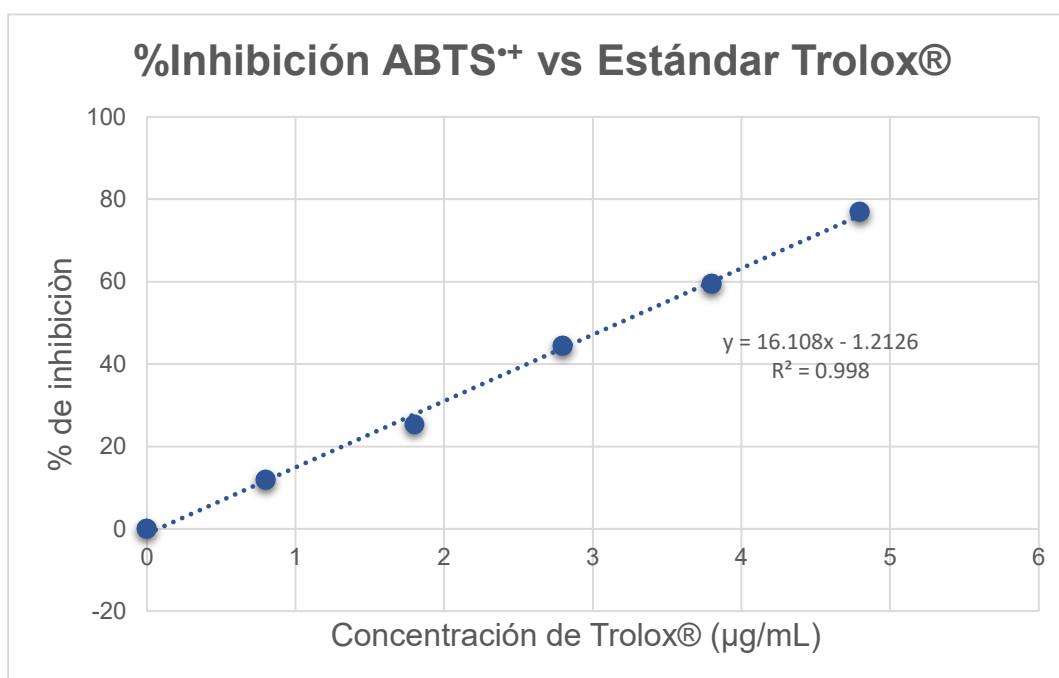


Figura 21. Inhibición del radical ABTS^{•+} del estándar Trolox[®]

Anexo 8. Estándar de ácido ascórbico por el método FRAP

Tabla 27. Poder reductor del ácido ascórbico

Ácido ascórbico* ($\mu\text{mol/L}$)	Prom. Abs
5	0,0307
10	0,1537
15	0,3200
20	0,4250
25	0,5453

* Lecturas a 593 nm

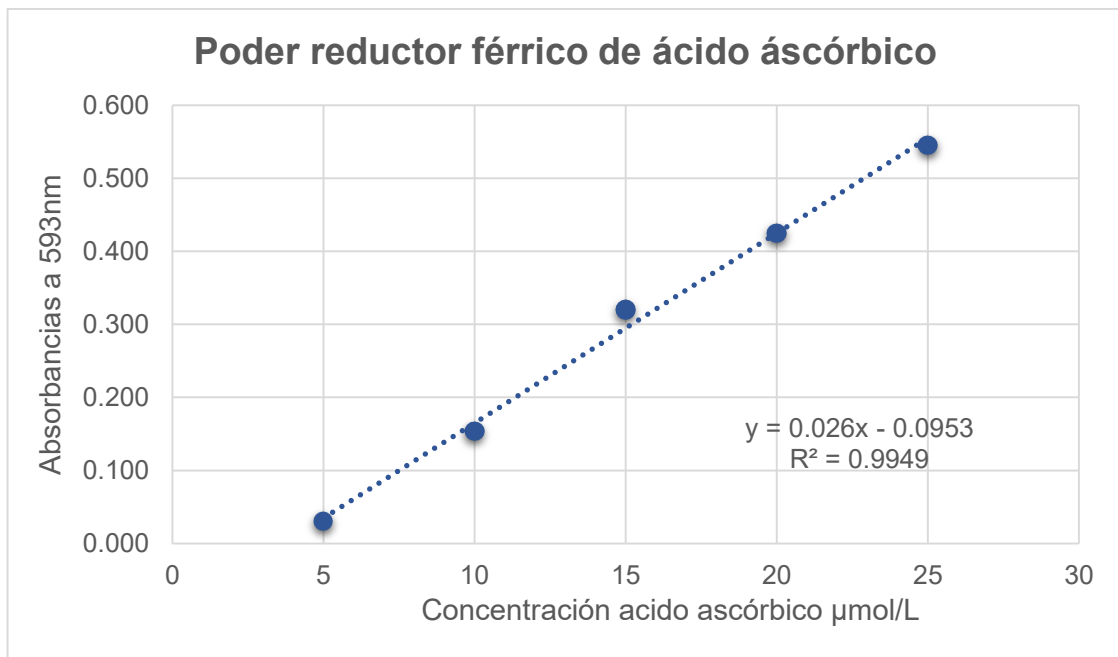


Figura 22. Curva de calibración de ácido ascórbico

Anexo 9. Actividad anticolagenasa del estándar de galato de epigalocatequina (EGCG)

Tabla 28. Inhibición de la enzima colagenasa del estándar EGCG

EGCG (µg/mL)	%Inhibición
0	0,0000
80	22,5619
160	39,8927
250	57,1066

IC 50 = 211,1552 µg/mL

* Lecturas a 348 nm

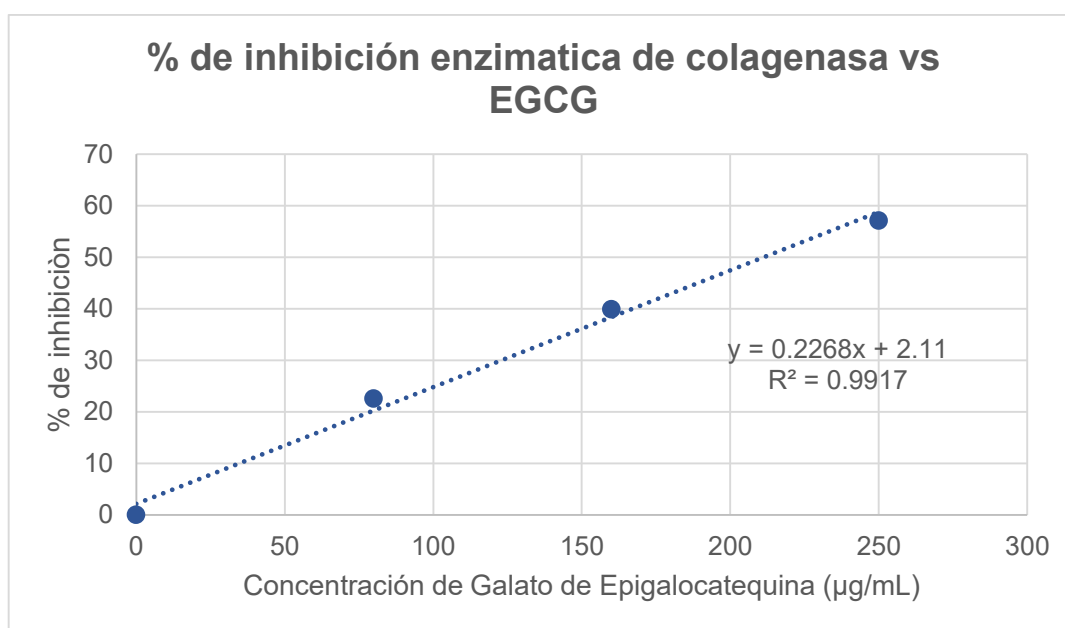


Figura 23. Curva de inhibición enzimática de colagenasa de EGCG

Anexo 10. Actividad antielastasa del estándar de galato de epigalocatequina (EGCG)

Tabla 29. Inhibición de la enzima elastasa del estándar EGCG

EGCG ($\mu\text{g/mL}$)	%Inhibición
0	0,0000
4	11,5059
12	29,0468
16	41,3424
20	52,1715

IC 50 = 18,8749 $\mu\text{g/mL}$

* Lecturas a 410 nm

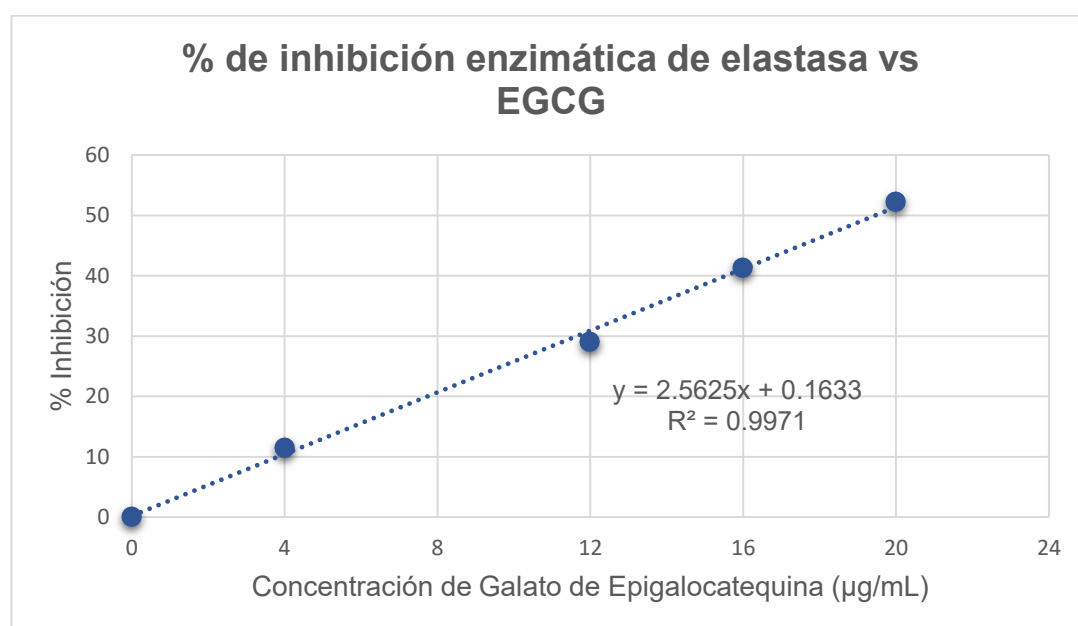


Figura 24. Curva de inhibición enzimática de elastasa de EGCG

Anexo 11. Resultados del programa IBM SPSS 25 en el método DPPH•

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Absorbancia	,208	18	,038	,902	18	,063

a. Corrección de significación de Lilliefors

ANOVA					
Absorbancia					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,415	5	,083	4726,930	,000
Dentro de grupos	,000	12	,000		
Total	,415	17			

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Absorbancia						
HSD Tukey						
(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0 µg/mL	16 µg/mL	,0851000*	,0034207	,000	,073610	,096590
	40 µg/mL	,1142333*	,0034207	,000	,102743	,125723
	88 µg/mL	,2541000*	,0034207	,000	,242610	,265590
	112 µg/mL	,3234333*	,0034207	,000	,311943	,334923
	160 µg/mL	,4442000*	,0034207	,000	,432710	,455690
16 µg/mL	0 µg/mL	-,0851000*	,0034207	,000	-,096590	-,073610
	40 µg/mL	,0291333*	,0034207	,000	,017643	,040623
	88 µg/mL	,1690000*	,0034207	,000	,157510	,180490
	112 µg/mL	,2383333*	,0034207	,000	,226843	,249823
	160 µg/mL	,3591000*	,0034207	,000	,347610	,370590
40 µg/mL	0 µg/mL	-,1142333*	,0034207	,000	-,125723	-,102743
	16 µg/mL	-,0291333*	,0034207	,000	-,040623	-,017643
	88 µg/mL	,1398667*	,0034207	,000	,128377	,151357
	112 µg/mL	,2092000*	,0034207	,000	,197710	,220690
	160 µg/mL	,3299667*	,0034207	,000	,318477	,341457
88 µg/mL	0 µg/mL	-,2541000*	,0034207	,000	-,265590	-,242610
	16 µg/mL	-,1690000*	,0034207	,000	-,180490	-,157510
	40 µg/mL	-,1398667*	,0034207	,000	-,151357	-,128377
	112 µg/mL	,0693333*	,0034207	,000	,057843	,080823
	160 µg/mL	,1901000*	,0034207	,000	,178610	,201590
112 µg/mL	0 µg/mL	-,3234333*	,0034207	,000	-,334923	-,311943
	16 µg/mL	-,2383333*	,0034207	,000	-,249823	-,226843
	40 µg/mL	-,2092000*	,0034207	,000	-,220690	-,197710
	88 µg/mL	-,0693333*	,0034207	,000	-,080823	-,057843
	160 µg/mL	,1207667*	,0034207	,000	,109277	,132257
160 µg/mL	0 µg/mL	-,4442000*	,0034207	,000	-,455690	-,432710
	16 µg/mL	-,3591000*	,0034207	,000	-,370590	-,347610
	40 µg/mL	-,3299667*	,0034207	,000	-,341457	-,318477
	88 µg/mL	-,1901000*	,0034207	,000	-,201590	-,178610
	112 µg/mL	-,1207667*	,0034207	,000	-,132257	-,109277

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 12. Resultados del programa IBM SPSS 25 en el método ABTS⁺⁺

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Absorbancia	,129	18	,200 [*]	,924	18	,152
*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.						
a. Corrección de significación de Lilliefors						

ANOVA					
Absorbancia					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,037	5	,207	1236,542	,000
Dentro de grupos	,002	12	,000		

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Absorbancia						
HSD Tukey						
(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0 µg/mL	12 µg/mL	,1543000 [*]	,0105730	,000	,118786	,189814
	28 µg/mL	,3012667 [*]	,0105730	,000	,265753	,336780
	44 µg/mL	,4547667 [*]	,0105730	,000	,419253	,490280
	60 µg/mL	,5648333 [*]	,0105730	,000	,529320	,600347
	76 µg/mL	,7054667 [*]	,0105730	,000	,669953	,740980
12 µg/mL	0 µg/mL	-,1543000 [*]	,0105730	,000	-,189814	-,118786
	28 µg/mL	,1469667 [*]	,0105730	,000	,111453	,182480
	44 µg/mL	,3004667 [*]	,0105730	,000	,264953	,335980
	60 µg/mL	,4105333 [*]	,0105730	,000	,375020	,446047
	76 µg/mL	,5511667 [*]	,0105730	,000	,515653	,586680
28 µg/mL	0 µg/mL	-,3012667 [*]	,0105730	,000	-,336780	-,265753
	12 µg/mL	-,1469667 [*]	,0105730	,000	-,182480	-,111453
	44 µg/mL	,1535000 [*]	,0105730	,000	,117986	,189014
	60 µg/mL	,2635667 [*]	,0105730	,000	,228053	,299080
	76 µg/mL	,4042000 [*]	,0105730	,000	,368686	,439714
44 µg/mL	0 µg/mL	-,4547667 [*]	,0105730	,000	-,490280	-,419253
	12 µg/mL	-,3004667 [*]	,0105730	,000	-,335980	-,264953
	28 µg/mL	-,1535000 [*]	,0105730	,000	-,189014	-,117986
	60 µg/mL	,1100667 [*]	,0105730	,000	,074553	,145580
	76 µg/mL	,2507000 [*]	,0105730	,000	,215186	,286214
60 µg/mL	0 µg/mL	-,5648333 [*]	,0105730	,000	-,600347	-,529320
	12 µg/mL	-,4105333 [*]	,0105730	,000	-,446047	-,375020
	28 µg/mL	-,2635667 [*]	,0105730	,000	-,299080	-,228053
	44 µg/mL	-,1100667 [*]	,0105730	,000	-,145580	-,074553
	76 µg/mL	,1406333 [*]	,0105730	,000	,105120	,176147
76 µg/mL	0 µg/mL	-,7054667 [*]	,0105730	,000	-,740980	-,669953
	12 µg/mL	-,5511667 [*]	,0105730	,000	-,586680	-,515653
	28 µg/mL	-,4042000 [*]	,0105730	,000	-,439714	-,368686
	44 µg/mL	-,2507000 [*]	,0105730	,000	-,286214	-,215186
	60 µg/mL	-,1406333 [*]	,0105730	,000	-,176147	-,105120

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 13. Resultados del programa IBM SPSS 25 en el método FRAP

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Absorbancia	,191	15	,147	,888	15	,062

a. Corrección de significación de Lilliefors

ANOVA					
Absorbancia					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,522	4	,131	2992,966	,000
Dentro de grupos	,000	10	,000		
Total	,523	14			

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Absorbancia						
HSD Tukey						
(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
12,5 µg/mL	25,0 µg/mL	-,0826667*	,0053921	,000	-,100412	-,064921
	50,0 µg/mL	-,2382000*	,0053921	,000	-,255946	-,220454
	75,0 µg/mL	-,3902333*	,0053921	,000	-,407979	-,372488
	100,0 µg/mL	-,5029667*	,0053921	,000	-,520712	-,485221
25,0 µg/mL	12,5 µg/mL	,0826667*	,0053921	,000	,064921	,100412
	50,0 µg/mL	-,1555333*	,0053921	,000	-,173279	-,137788
	75,0 µg/mL	-,3075667*	,0053921	,000	-,325312	-,289821
	100,0 µg/mL	-,4203000*	,0053921	,000	-,438046	-,402554
50,0 µg/mL	12,5 µg/mL	,2382000*	,0053921	,000	,220454	,255946
	25,0 µg/mL	,1555333*	,0053921	,000	,137788	,173279
	75,0 µg/mL	-,1520333*	,0053921	,000	-,169779	-,134288
	100,0 µg/mL	-,2647667*	,0053921	,000	-,282512	-,247021
75,0 µg/mL	12,5 µg/mL	,3902333*	,0053921	,000	,372488	,407979
	25,0 µg/mL	,3075667*	,0053921	,000	,289821	,325312
	50,0 µg/mL	,1520333*	,0053921	,000	,134288	,169779
	100,0 µg/mL	-,1127333*	,0053921	,000	-,130479	-,094988
100,0 µg/mL	12,5 µg/mL	,5029667*	,0053921	,000	,485221	,520712
	25,0 µg/mL	,4203000*	,0053921	,000	,402554	,438046
	50,0 µg/mL	,2647667*	,0053921	,000	,247021	,282512
	75,0 µg/mL	,1127333*	,0053921	,000	,094988	,130479

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 14. Resultados del programa IBM SPSS 25 en la actividad anticologenasa

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Absorbancia	,218	15	,054	,887	15	,061

a. Corrección de significación de Lilliefors

ANOVA					
Absorbancia					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,096	4	,024	38,493	,000
Dentro de grupos	,006	10	,001		
Total	,103	14			

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Absorbancia						
HSD Tukey						
(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0 µg/mL	36 µg/mL	,0604667	,0204368	,084	-,006793	,127726
	54 µg/mL	,1306333*	,0204368	,001	,063374	,197893
	66 µg/mL	,1665000*	,0204368	,000	,099241	,233759
	90 µg/mL	,2294000*	,0204368	,000	,162141	,296659
36 µg/mL	0 µg/mL	-,0604667	,0204368	,084	-,127726	,006793
	54 µg/mL	,0701667*	,0204368	,040	,002907	,137426
	66 µg/mL	,1060333*	,0204368	,003	,038774	,173293
	90 µg/mL	,1689333*	,0204368	,000	,101674	,236193
54 µg/mL	0 µg/mL	-,1306333*	,0204368	,001	-,197893	-,063374
	32 µg/mL	-,0701667*	,0204368	,040	-,137426	-,002907
	66 µg/mL	,0358667	,0204368	,447	-,031393	,103126
	90 µg/mL	,0987667*	,0204368	,005	,031507	,166026
66 µg/mL	0 µg/mL	-,1665000*	,0204368	,000	-,233759	-,099241
	36 µg/mL	-,1060333*	,0204368	,003	-,173293	-,038774
	54 µg/mL	-,0358667	,0204368	,447	-,103126	,031393
	90 µg/mL	,0629000	,0204368	,070	-,004359	,130159
90 µg/mL	0 µg/mL	-,2294000*	,0204368	,000	-,296659	-,162141
	36 µg/mL	-,1689333*	,0204368	,000	-,236193	-,101674
	54 µg/mL	-,0987667*	,0204368	,005	-,166026	-,031507
	66 µg/mL	-,0629000	,0204368	,070	-,130159	,004359

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 15. Resultados del programa IBM SPSS 25 en la actividad antielastasa

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Absorbancia	,221	18	,020	,806	18	,002
a. Corrección de significación de Lilliefors						

Estadísticos de prueba^{a,b}	
	Absorbancia
H de Kruskal-Wallis	10,510
gl	4
Sig. asintótica	,033
a. Prueba de Kruskal Wallis	
b. Variable de agrupación: Concentración	

Anexo 16. Fotografías de los Equipos utilizados



Figura 25. Espectrofotómetro UV-VIS. Marca: Thermo Scientific. Modelo: GENESYS 10S UV-Vis



Figura 26. Centrifuga. Marca: Hettich. Modelo: ROTOFIX 32



Figura 27. Vórtex. Marca: SCIOLOGEX. Modelo: MX-S



Figura 28. Potenciómetro. Marca: Milwaukee. Modelo: Mi 151



Figura 29. Balanza Analítica. Marca: A&D Company, Limited. Modelo: HR-250AZ

Anexo 17. Fotografías de Reactivos, Desarrollo de Metodologías y Resultados



Figura 30. Laboratorio de Semisíntesis Orgánica



Figura 31. Desarrollo de ensayos



Figura 32. Reactivos DPPH• y ABTS



Figura 33. Estándar de Quercetina y Trolox®

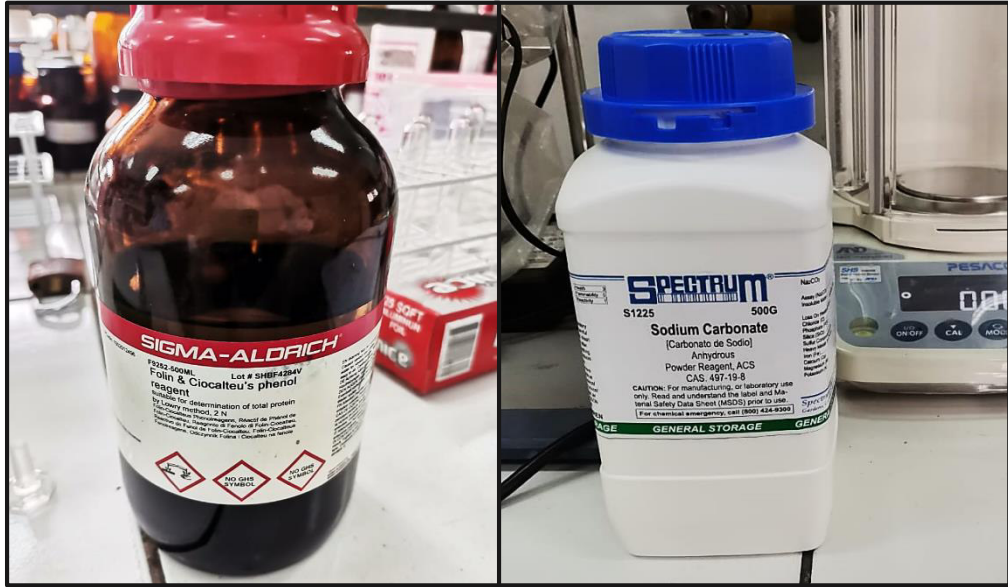


Figura 34. Reactivo Folin & Ciocalteu y Carbonato de sodio anhidro



Figura 35. Homogenización en Vórtex y Centrifuga



Figura 36. Método Folin-Ciocalteu en estándar ácido gálico

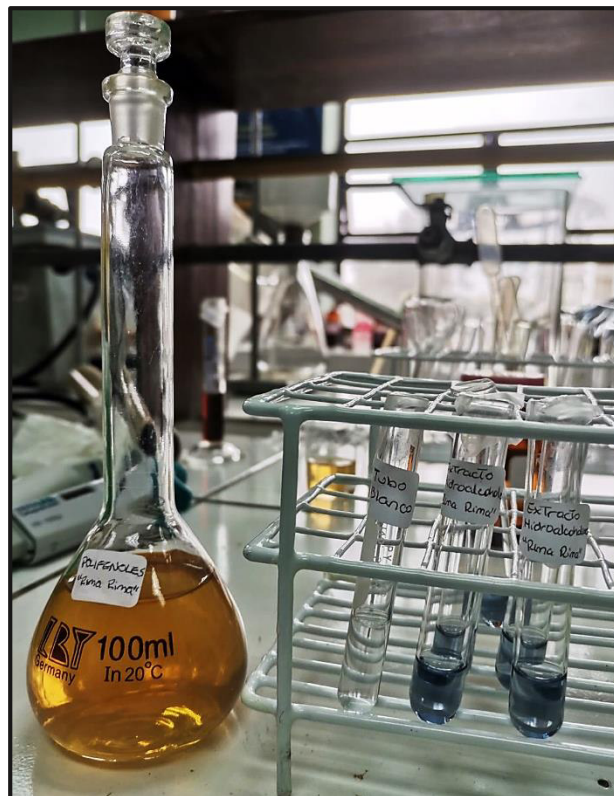


Figura 37. Resultados de Método Folin-Ciocalteu en extracto de "Rima Rima"



Figura 38. Método de formación de complejo con tricloruro de aluminio del estándar de quercetina



Figura 39. Método de formación de complejo con tricloruro de aluminio en "Rima Rima"

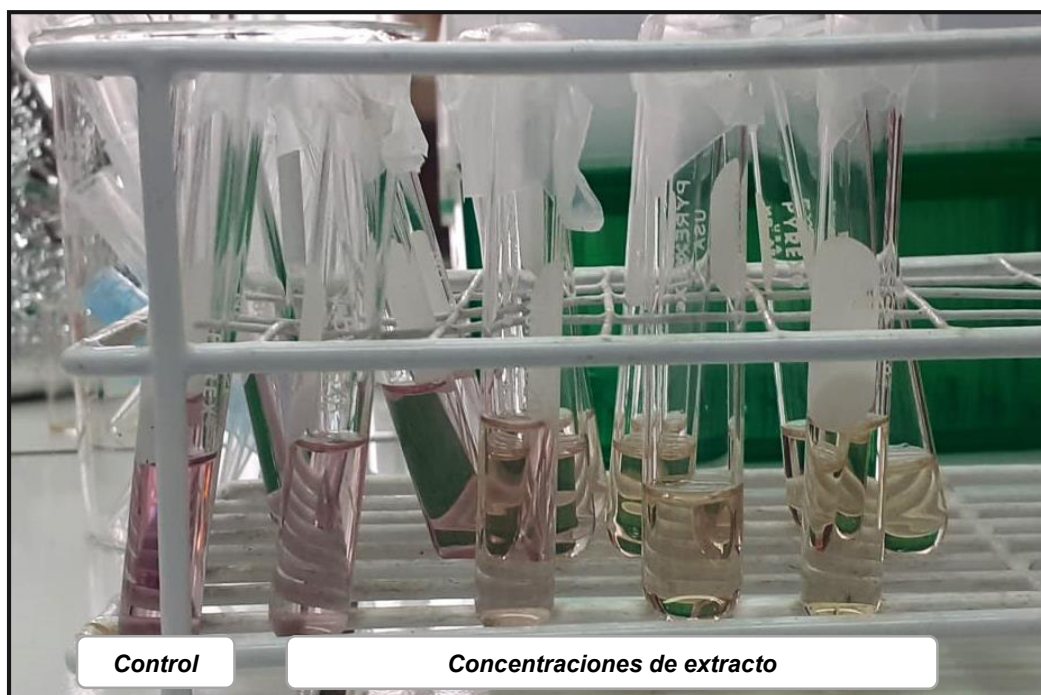


Figura 40. Resultados de Metodología DPPH• en “Rima Rima”

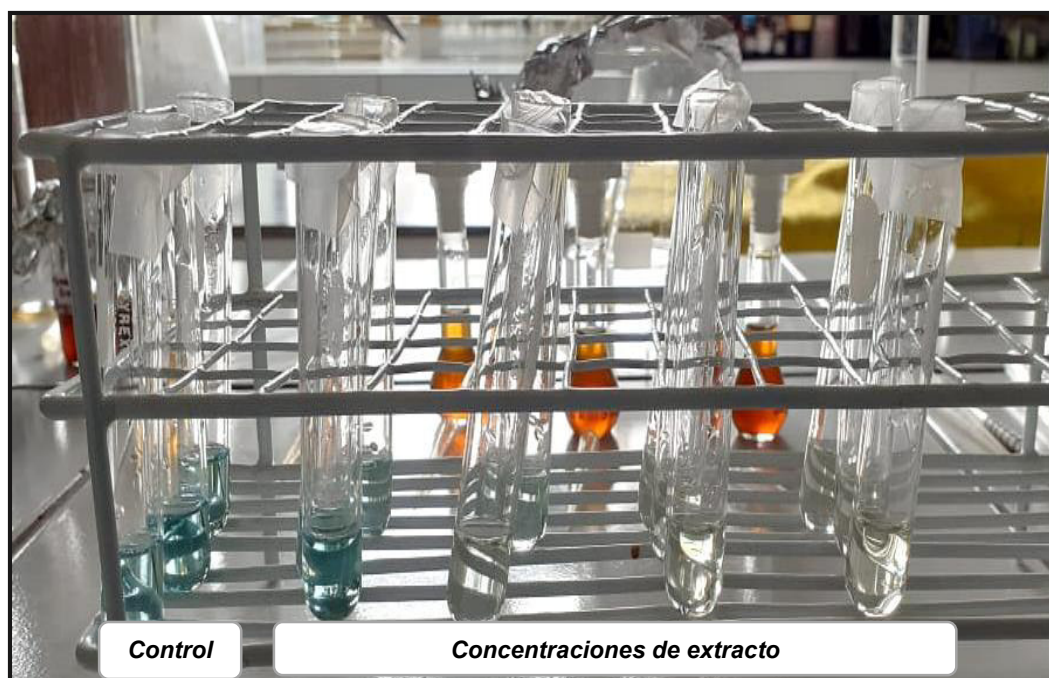


Figura 41. Resultados de Metodología ABTS en “Rima Rima”



Figura 42. Estándar ácido ascórbico y preparación de reactivos FRAP

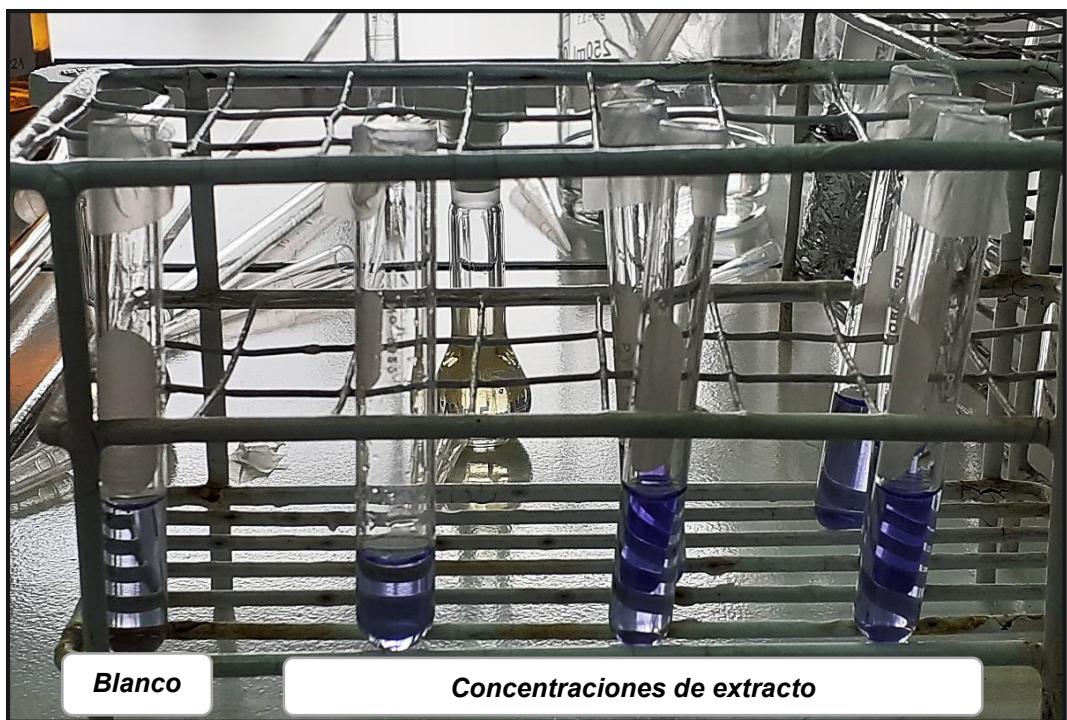


Figura 43. Resultados de Metodología FRAP en “Rima Rima”

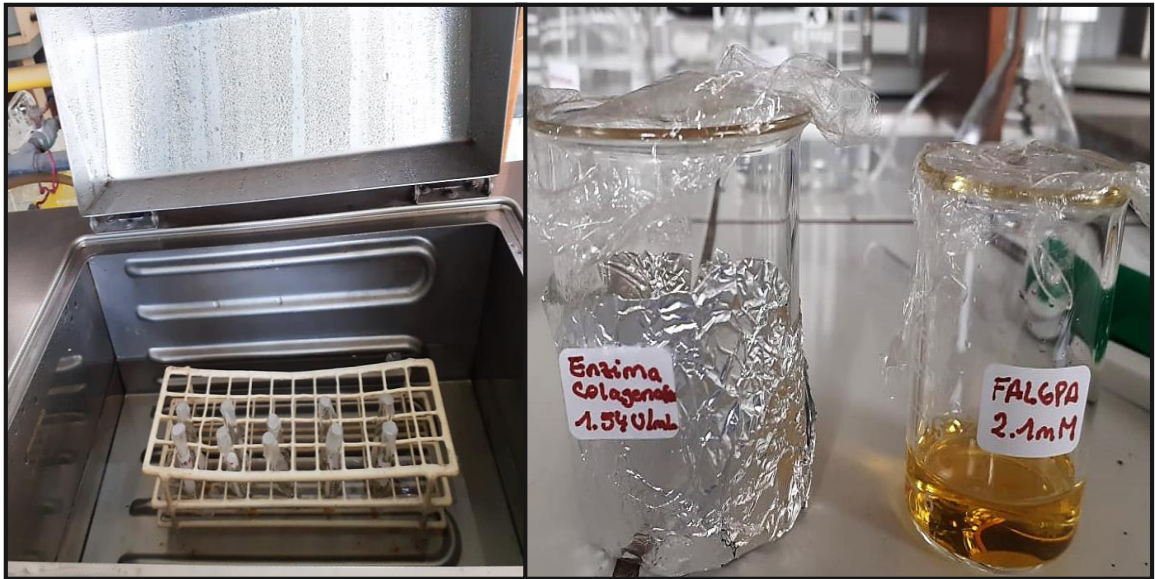


Figura 44. Preparación de reactivos actividad anticolagenasa.



Figura 45. Reactivos de actividad anticolagenasa. Buffer Tris Glycine, sustrato y enzima

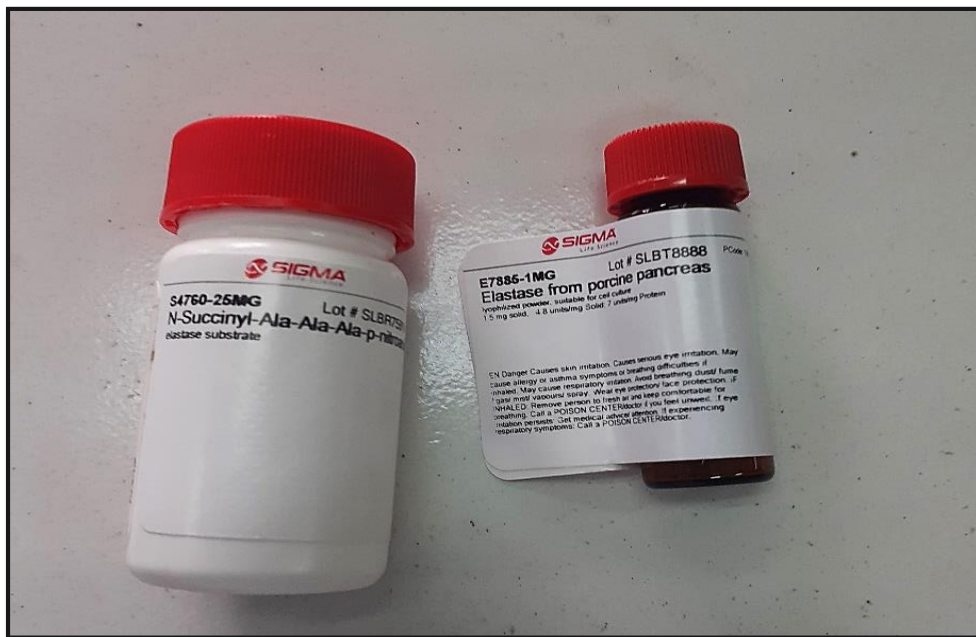


Figura 46. Reactivos actividad antielastasa, sustrato y enzima

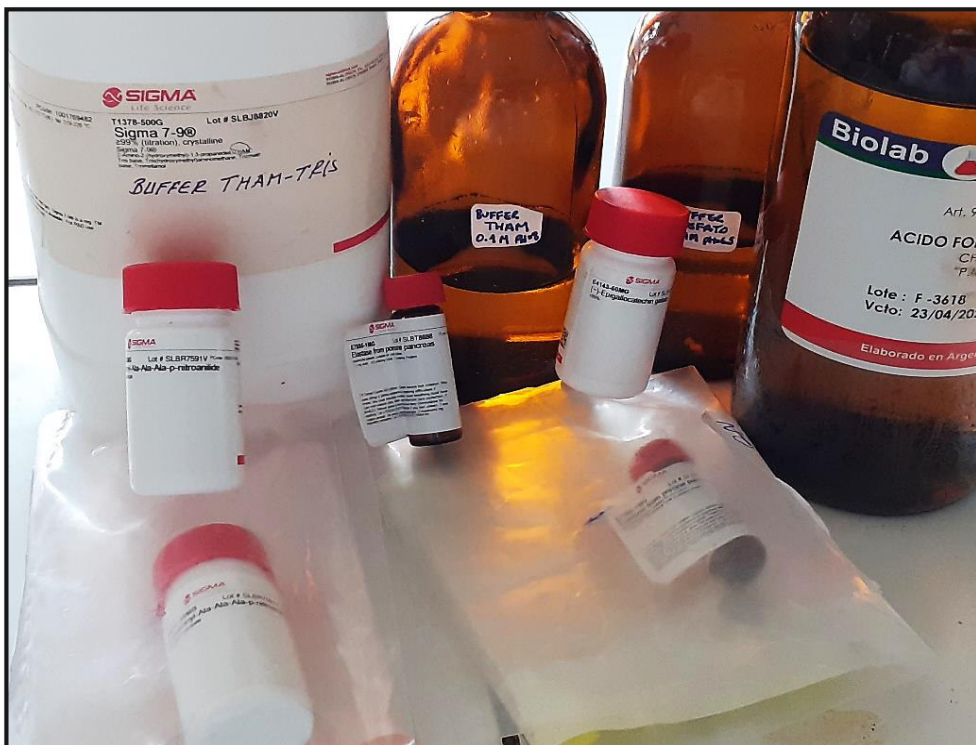


Figura 47. Preparación de reactivos de actividad antielastasa