



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**“EFECTO GASTROPROTECTOR DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LA HOJAS
DE *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) EN RATAS ALBINAS CEPAS
HOLTZMAN”**

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

AUTORES

BACH. CIPRIAN MENDOZA, GLADYS

BACH. TOMAIRO MENDEZ, LUIS ALFREDO

ASESOR

Mg. Q.F. FLORES LOPEZ, OSCAR BERNUY

LIMA – PERÚ

2021

DEDICATORIA

A mis padres por su apoyo incondicional, sus consejos, sus enseñanzas y valores; porque siempre predominó la perseverancia para alcanzar mis objetivos y metas, pero, sobre todo cumplir mis sueños.

A mis 2 hijos Jerhemy y Akane que con su gran amor incondicional y ocurrencias me dan ese impulso para seguir con uno de mis sueños y demostrarme que a pesar de las circunstancias siempre hay que seguir adelante. Me ha permitido ser una persona de bien, porque son mi inspiración.

A mi hermana que con su ejemplo me ha dado ese impulso para seguir con uno de mis sueños, ser una excelente profesional.

A mi pareja, un hombre digno de admirar que a pesar de las cosas difíciles que le ha tocado vivir siempre ha denotado en él, ese carisma que lo caracteriza, su sonrisa.

Gladys Ciprian Mendoza

A Dios todopoderoso, el haberme permitido culminar con éxito esta profesión tan anhelada.

A mi familia, que siempre está conmigo en los momentos difíciles, apoyándome para poder salir adelante.

A mis amigos, Ana Rossi e Iván Alexis que me motivaron y guiaron para lograr este reto.

Luis Alfredo Tomairo Mendez

AGRADECIMIENTO

A la universidad María Auxiliadora por permitirnos formar en sus aulas, donde compartimos constancia, dedicación y sobre todo esfuerzo para alcanzar nuestra primera meta.

Al Mg. Q.F.Oscar Bernuy Flores López, Magister (Maestro en educación mención en investigación y docencia superior), Doctorado en Farmacia y Bioquímica (UNMSM), Egresado de Segunda Especialidad en Gestión Farmacéutica y Asuntos Regulatorios (UIGV) y asesor de nuestra tesis, quien nos brindó su plena confianza para la realización y culminación del presente trabajo, brindándonos las facilidades, orientación y mostrando la disposición, paciencia y la enseñanza a lo largo de esta investigación.

A nuestros profesores que compartieron de sus conocimientos, por crear en el aula una atmósfera que nos invitó a todos a investigar, a aprender, a construir su aprendizaje y no solo a seguir lo que ellos decían o hacían.

A los miembros del jurado evaluador y calificador por regalarnos su valioso tiempo y sobre todo por su dedicación profesional.

A nuestros padres, pareja e hijos que me dieron el soporte para seguir estudiando.

Índice General

	Páginas
Resumen	
Abstract	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	7
2.1 Enfoque y diseño de la investigación	7
2.2 Población, muestra y muestreo	7
2.3 Variables de investigación	8
2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	8
2.5 Proceso de recolección de datos	10
2.5.1. Procedimiento experimental (Etapa I)	10
2.5.1.1. Marcha fitoquímica	11
2.5.1.2. Prueba de solubilidad	13
2.5.1.3. Cromatografía	14
2.5.2. Procedimiento experimental (Etapa II)	15
2.5.2.1. Parte experimental	16
2.5.2.2. Animales de experimentación	16
2.5.2.3. Dosificación y tratamiento de las actividades	16
2.5.2.4. Observaciones y sintomatología	17
2.5.2.5. Resultado de toxicidad oral	18
2.5.2.6. Determinación de actividad Gastro protectora	19
2.6 Métodos de análisis estadístico	23
2.7 Aspectos éticos	23
III. RESULTADOS	24
IV. DISCUSIÓN	33
4.1 Discusión de resultados	33
4.2 Conclusiones	34
4.3 Recomendaciones	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXOS	38

Índice de Tablas

Tabla N° 01:	Tratamientos de experimentación	17
Tabla N° 02:	Signos y síntomas evaluados	18
Tabla N° 03:	Tratamientos de experimentación	19
Tabla N° 04:	Evaluación de lesiones (Según Marhuenda)	20
Tabla N° 05:	Hemograma obtenido al final del tratamiento con Caléndula	21
Tabla N° 06:	Solubilidades del extracto de <i>Caléndula officinalis</i>	24
Tabla N° 07:	Marcha fitoquímica del extracto seco de las hojas de caléndula	24
Tabla N° 08:	Resultados de la Toxicidad Aguda Oral	25
Tabla N° 09:	Resumen de Observaciones después de la administración de los extractos y controles	26
Tabla N° 10:	Resultados de la actividad gastroprotectora (puntaje alcanzado)	27
Tabla N° 11:	Resultados de la actividad gastroprotectora (porcentaje alcanzado)	28
Tabla N° 12:	Análisis de Varianza	30
Tabla N° 13:	PRUEBA DE TUKEY	31

Índice de Figuras

Figura N° 01:	% Actividad Gastroprotectora en ratas inducidas tratadas con Caléndula	28
Figura N° 02:	Valoración de la ulceración según Marhuenda en ratas inducidas tratadas con Caléndula	29
Figura N° 03:	% de efectividad en ratas inducidas tratadas con Caléndula	32

Índice de Anexos

Anexo A:	Operacionalización de las variables	39
Anexo B:	Clasificación taxonómica	40
Anexo C:	Evidencias fotográficas del trabajo de laboratorio	41
Anexo D:	Evidencias fotográficas del trabajo de campo	62

Anexo N° 1: Recolección de la especie botánica <i>Caléndula officinalis</i> (Caléndula).	41
Anexo N° 2: Imagen que muestra a la planta de la caléndula, sus flores y hojas.	41
Anexo N° 3: Altura y crecimiento de la planta de <i>Caléndula officinalis</i> L. (Caléndula).	42
Anexo N° 4: Preparación del extracto etanólico.	42
Anexo N° 5: Preparación para marcha fitoquímica.	43
Anexo N° 6: Resultado de marcha fitoquímica.	43
Anexo N° 7: Pesado de los animales de experimentación.	44
Anexo N° 8: Administración de etanol a los animales de experimentación.	44
Anexo N° 9: Disección de los animales de experimentación.	45
Anexo N° 10: Corte para visualizar el estómago de los animales de experimentación inducidos a lesiones gástricas.	45
Anexo N° 11: Eutanasia y disección de la rata.	46
Anexo N° 12: Extracción del estómago para la apertura por la línea del tercio inferior	46
Anexo N° 13: Control negativo: Grupo sin tratamiento con formación de úlceras con puntaje 3 con hemorragia y necrosis.	47
Anexo N° 14: Daño en el estómago con edema e infiltración generalizada sin tratamiento.	47
Anexo N° 15: Dosis de 250 mg/kg: Puntaje 3 con formación de úlceras perforadas de longitud menos de 5mm y diámetro menor de 2 mm	48
Anexo N° 16: Úlceras hemorrágicas menores de 2mm	48
Anexo N° 17: Dosis de 500 mg/kg: Puntaje 1 con formación de menos de 4 úlceras de grado 3.	49
Anexo N° 18: Formación de úlceras hemorrágicas de menos de 2 mm de diámetro	49
Anexo N° 19: Dosis de 1000 mg/kg, puntaje 1 con formación de una úlcera fina menor de 1mm	50
Anexo N° 20: Control positivo, con tratamiento con Omeprazol 40 mg/kg y puntaje 0	50
Anexo N° 21: Certificado de las ratas albinas Holtzman	51
Anexo N° 22: Hoja de validación de instrumentos al 250 mg/kg	52
Anexo N° 23: Hoja de validación de instrumentos al 500 mg/kg	55
Anexo N° 24: Hoja de validación de instrumentos al 1000 mg/kg	58
Anexo N° 25: Hoja de validación de instrumentos – Grupo experimental	61

RESUMEN

La investigación se llevó a cabo para determinar el efecto gastroprotector del extracto etanólico de las hojas de *Caléndula officinalis* L. Las hojas de caléndula tienen importantes propiedades que pueden ser empleadas en la industria farmacéutica. Adicionalmente se han encontrado sustancias con un alto efecto gastroprotector. El extracto etanólico se obtuvo mediante extracción por maceración en un periodo de una semana que se obtuvo un rendimiento en base seca mayor al 30 % . La investigación tuvo como objetivo determinar el efecto gastroprotector del extracto etanólico de las hojas de «Caléndula».

La muestra se administró mediante sonda nasogástrica a diferentes niveles de dosis en un total de 21 ratas albinas machos cepa Holtzman, 7 ratas control positivo y 7 ratas control negativo, de acuerdo con el procedimiento del Manual de Técnicas de Investigación del CYTED. Se usaron ratas albinas machos (cepa Holtzman) de 8 - 10 semanas de edad con un peso promedio de 220 - 250 g; provenientes de las instalaciones del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

El proceso de cuarentena para la aclimatación a las condiciones ambientales y conductuales será de cinco días. En los resultados de obtenidos para cada concentración existió presencia de metabolitos como flavonoides, alcaloides, compuestos fenólicos. Con una concentración de 1000mg/kg con un porcentaje de eficacia al 80% y en comparación con el Omeprazol, se pudo evidenciar que las concentraciones ensayadas de 1000 mg/kg., 500mg/kg y 250 mg/kg. tienen un efecto gastroprotector y significativo pero que no superan al Omeprazol con 100%.

Palabras claves: Efecto gastroprotector, extracto etanólico, omeprazol, *Caléndula officinalis*.

ABSTRACT

The research was carried out to determine the gastroprotective effect of the ethanolic extract of the leaves of *Calendula officinalis* L. Calendula leaves have important properties that can be used in the pharmaceutical industry. Additionally, substances with a high gastroprotective effect have been found. The ethanolic extract was obtained by extraction by maceration in a period of one week, which obtained a yield on a dry basis greater than 30%. The objective of the investigation was to determine the gastroprotective effect of the ethanolic extract of the leaves of «Calendula».

The sample was administered by nasogastric tube at different dose levels in a total of 21 Holtzman strain male albino rats, 7 positive control rats and 7 negative control rats, according to the procedure of the CYTED Research Techniques Manual. Male albino rats (Holtzman strain) 8-10 weeks old with an average weight of 220-250 g were used; from the facilities of the animal farm of the Peruvian University Cayetano Heredia.

The quarantine process for acclimatization to environmental and behavioral conditions will be five days. In the results obtained for each concentration, there was the presence of metabolites such as flavonoids, alkaloids, phenolic compounds. With a concentration of 1000mg / kg with an efficacy percentage of 80% and in comparison, with Omeprazole, it was possible to show that the concentrations tested of 1000mg / kg., 500mg / kg and 250mg / kg. They have a significant and gastroprotective effect but do not exceed Omeprazole with 100%.

Keywords: Gastroprotective effect, ethanolic extract, omeprazole, *Calendula officinalis*.

I. INTRODUCCIÓN

La ubicación geográfica del Perú y su diversidad climática permiten a las personas cultivar una variedad de plantas medicinales, algunas de las cuales se consideran innovadoras y esperanzadoras para el desarrollo del país.

Estas plantas son consideradas como productos potencialmente atractivos en el mercado internacional, con nuevas propiedades sensoriales, médicas y nutricionales, gran potencial de demanda y altas posibilidades comerciales a mediano y largo plazo.

En nuestro país, un estudio realizado durante 2016-2019, mostró que la tasa de prevalencia de ulcera péptica por cada 1000 pacientes sintomáticos sometidos a endoscopia era del 83,09 % que es el caso más común de ulcera duodenal. Sin embargo, las úlceras gástricas han ido en aumento en los últimos años, que se caracterizan por un elevado sangrado e indigestión. Entre las plantas prometedoras se encuentran las hojas de la *Caléndula officinalis* L. (Caléndula) es una planta cultivada principalmente en la sierra norte del Perú. Estas hojas son cotizaciones naturales, consideradas por locales y extranjeros como una alternativa prometedora a la protección del estómago, y son un elemento esencial del desarrollo sostenible en estas áreas.

El uso de las plantas medicinales se ha dado desde hace mucho tiempo. Las diferentes culturas han logrado su propia flora terapéutica, la cual se ha transmitido por tradición oral por generaciones.

La biodiversidad para nuestro país toma importancia por sus especies vegetales, de las 5000 plantas utilizadas 4000 son nativas y solo 600 son de fuera. El total de estas plantas se aplican en 49 casos diferentes, de todos ellos 1400 son de uso medicinal. El uso de la medicina alternativa, en los países desarrollados es cada vez mayor; en cuanto a los países en vía de desarrollo es frecuente su uso ya que económicamente le es factible. (1-2)

La Organización Mundial De La Salud, promueve entre sus estados miembros la incorporación y el uso de las plantas medicinales bajo la denominación de medicina tradicional trazándose objetivos básicos como el de introducir en los sistemas nacionales de salud la medicina tradicional, así como su uso racional, mejorar el acceso y la disponibilidad, promoviendo a su vez la calidad, efectividad y seguridad de la medicina tradicional ampliando la base de conocimientos. (3)

La úlcera péptica es una enfermedad relativamente frecuente y heterogénea, debido a diversos factores; bacterianos, farmacológicos, psicológicos, estilo de vida, ambientales y anatómicos, que en combinación o aisladamente hacen un desequilibrio entre los componentes defensivos y agresivos de la mucosa gastroduodenal, lo que conduce a una lesión de estómago y/o duodeno. (4)

Por su preferencia relativa de esta enfermedad es necesario su prevención y tratamiento, desarrollándose así una serie de medicamentos bien para reducirla o eliminarla. En el Perú, la gastritis crónica es una de las principales causas de consulta médica. (5)

Algunas plantas medicinales se utilizan en nuestro país con propiedades gastroprotectoras, incluida la investigación de sus efectos farmacológicos, como el matico (6), sangre de grado, aloe (7), achiote (8), etc. Las plantas prometedoras incluyen las hojas de *Caléndula officinalis* L. (CALENDULA), que crecen principalmente en las tierras altas del norte de Perú.

Basándonos en estudios ya realizados que los usaremos en nuestro trabajo de investigación como antecedentes nacionales e internacionales, se muestran a continuación:

Inocente T. (2017). *Mutisia acuminata* es una especie botánica que posee folclóricamente propiedades antiulcerativas, por lo tanto, se estudió su actividad. La metodología usada fue la obtención de hojas y preparar extracto hidroalcohólico, con la marcha fitoquímica se determinó la presencia de metabolitos secundarios y con la técnica de Lee 1979 se evidencio la actividad anti ulcerativa en varias

concentraciones preparadas, la evidencia farmacológica se reportó en ratas albinas 64 animales con los cuales se formaron 8 grupos de 8 animales y el fármaco ulcerativo fue naproxeno. Los resultados mostraron que el extracto exhibía actividad a 400 y 600 mg/kg. En comparación con el grupo estándar de ranitidina y omeprazol, el efecto inhibidor de la úlcera gástrica fue del 68% y 82%, respectivamente, y el efecto inhibidor de este último fue del 64%. La conclusión es que cuando la concentración es de 400 y 600 mg/kg, *Mutisia acuminata* tiene un efecto gastroprotector. (9)

Reyes L. (2019). Realizó el estudio “efecto gastroprotector del extracto hidroalcohólico de *Vaccinium corymbosum* (arándano) sobre las úlceras gástricas inducidas en *Rattus norvegicus* var. *Albinus*”. Usaron 24 ratas con peso entre 220 – 240 g distribuidos en 4 grupos, el primero recibió agua a voluntad, el segundo indometacina 120 mg/Kg vía intraperitoneal, el tercero ranitidina 100 mg/Kg vía oral + indometacina 120 mg/Kg y el cuarto grupo arándano 600 mg/Kg + indometacina 120 mg/Kg. Hallaron que en el grupo del arándano disminuyó el número de úlceras en forma significativa respecto al grupo control indometacina. Concluyen que el arándano tuvo efecto gastroprotector en ratas en ratas inducidas a úlcera gástrica. (10)

Coronel E. (2016). Empleó *Linum usitatissimum* (linaza) para evaluar el efecto protector sobre la mucosa gástrica. La metodología usó el modelo experimental de Robert 1979 el cual emplea etanol al 70% para lograr el efecto sobre la membrana a una dosis de 10 ml/kg. Se emplearon ratas albinas como sujetos de experimentación los cuales fueron divididos en 6 grupos experimentales a los cuales fueron administrados las diferentes concentraciones de linaza y el control positivo. Los resultados según la evaluación por la escala de Marhuenda, demostraron que la linaza posee efecto gastro protector, provocando la regeneración de la mucosa y mejorando las lesiones provocadas por la sustancia irritante administrada. Se concluye que una medida para tratar la úlcera gástrica concomitante es la *Linum usitatissimum* (Linaza) (11)

Pandey S, et al. (2018). Desarrollaron el estudio “in vitro, in vivo de la actividad antiulcerosa del ácido ferúlico”. Emplearon extracto etanólico del ácido ferúlico obtenido de plantas medicinales, en tres niveles de dosis; 10 mg/kg, 20 mg/kg y 40

mg/Kg. Para provocar úlcera gástrica usaron el método de ligadura de píloro, y método químico inducido por etanol, histamina y ácido acetil salicílico. Evidenciaron que el ácido ferúlico disminuyó la secreción del ácido clorhídrico, disminuyó la peroxidación lipídica y el índice de úlcera, comprobaron que aumento del pH e inhibió a la enzima ATPasa K^+/H^+ . Concluyen que el ácido ferúlico presentó actividad antiulcerosa en ratas albinas. (12)

Shukla I, et al. (2019). Desarrollaron el estudio “efecto gastroprotector de la formononetina contra la ulceración gástrica inducida por etanol en ratas mediante el aumento de marcadores citoprotectores y la reducción de la expresión del gen apoptótico”. Emplearon la FMN (formononetina) es una isoflavona del trébol rojo. Usaron ratas albinas, fueron divididas en 5 grupos; Los primeros tres grupos recibieron FMN (25 mg / kg, 50 mg / kg y 100 mg / kg), el cuarto grupo recibió omeprazol 20 mg / kg y el quinto grupo recibió etanol absoluto 5 ml / kg, todos los cuales se tomaron oralmente. Luego de una hora de la administración del inductor de úlcera gástrica (etanol) las ratas fueron sacrificadas, se realizó análisis bioquímico, microscópicos y macroscópicos. Hallaron, que el FMN aumentó los niveles de glutatión y disminuyó los niveles de malondialdehído, asimismo se observó citoprotección frente a úlceras gástricas, se restableció los niveles de óxido nítrico, en análisis histológicos se observó inhibición de lesiones gástricas en ratas tratadas con FMN. (13)

Sanalkumar K, et al. (2018). Desarrollaron el estudio “efecto antiulceroso del extracto de rizoma de *Curcuma longa* L contra úlcera péptica inducida por aspirina en ratas”. Elaboraron un extracto hidroalcohólico con etanol 50% del rizoma *Curcuma longa* L, en el equipo extractor Soxhlet. Usaron ácido acetil salicílico 500 mg/kg con agente químico para estimular úlcera gástrica a ratas Wistar. La ranitidina 50 mg/Kg fue empleado como fármaco control positivo, las dosis del extracto fueron; 250 mg/kg, 500 mg/kg y 1000 mg/Kg. Hallaron que el extracto protegió la mucosa gástrica de manera significativa frente a la inducción de úlcera gástrica, probablemente por acción sinérgica de los taninos, alcaloides, triterpenos y flavonoides identificados en el extracto. Concluyen que el extracto del rizoma de *C. longa* tuvo efecto antiulceroso en ratas albinas inducidas a úlcera gástrica. (14)

El presente trabajo contribuirá con el conocimiento sobre la actividad del extracto etanólico de las hojas de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) en ratas albinas cepas Holtzman, en el tratamiento de la úlcera gástrica, por tanto, ayudará a hacer frente al aumento de la farmacoresistencia en el plan de tratamiento actual proponiendo nuevas alternativas de tratamiento.

Aportaremos evidencias científicas sobre el manejo terapéutico del extracto etanólico de las hojas de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) en ratas albinas cepas Holtzman en la población y se orientará su producción con fines terapéuticos.

La biodiversidad de plantas medicinales permitirá su uso para la prevención y el tratamiento de enfermedades en este caso el tratamiento de la úlcera gástrica; ofreciéndonos un potencial único para el descubrimiento y desarrollo de agentes bioactivos. (15)

Los resultados de este trabajo de investigación brindarán respaldo científico para el uso seguro de las plantas estudiadas y beneficiarán a los productores y vendedores del extracto etanólico de las hojas de *Caléndula officinalis* L. (CALENDULA) generarán mayor demanda por su efectividad. Aportando a la industria farmacéutica y a la comunidad científica, e incentivando futuras investigaciones para beneficiar a los pacientes que padecen úlcera gástrica.

El objetivo de este estudio es determinar el efecto gastroprotector del extracto etanólico de hojas de *Caléndula officinalis* L. (CALENDULA), diseñado para promover el conocimiento científico y encontrar posibles metabolitos secundarios en función de la concentración. Se expresa en porcentaje y proporciona una base para la posibilidad de formular y desarrollar fármacos orales a partir de los principios efectivos responsables de esta característica. Este estudio se comparó con el efecto gastroprotector del omeprazol.

Los objetivos específicos son:

- ✓ Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA).
- ✓ Determinar la concentración del extracto etanólico de las hojas de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) con efecto gastroprotector en ratas albinas cepa Holtzman.
- ✓ Comparar el efecto gastroprotector del extracto etanólico de las hojas de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) y el fármaco de Omeprazol en ratas albinas cepa Holtzman.

Se establece la siguiente hipótesis en el estudio: El extracto etanólico de las hojas de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) presenta efecto gastroprotector en ratas albinas cepa Holtzman.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ENFOQUE Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Cuantitativo por su enfoque, ya que la investigación comprobó la hipótesis aplicando análisis estadístico.

Experimental: se manipulará la variable dependiente.

Transversal por su temporalidad, porque el estudio evaluó las muestras una sola vez y en un determinado momento.

Aplicada por su propósito, porque el estudio se llevó a cabo de forma práctica a través de procesos experimentales.

2.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

Población:

Constituida por tres kilogramos de hojas *Caléndula officinales* L. (CALÉNDULA) de la provincia de Carhuaz, ubicado a 34 km del departamento de Ancash a una altura de 2688 m.s.n.m.

Muestra:

Muestra Vegetal:

Se usarán 3 kg de las hojas de *Caléndula officinalis* "CALÉNDULA" de una parcela de 15m² de diámetro donde se desarrollan en estado silvestre.

Muestra animal:

En cuanto a la unidad de análisis se utilizaron Treinta y seis ratas albinas machos (cepa Holtzman) de 6 – 8 semanas de edad con un peso promedio de 220 ± 20 g.

La muestra que se utilizó estuvo conformada de 6 grupos de 5 ratones cada uno formados al azar, recibiendo cada grupo un tratamiento distinto.

2.3 VARIABLES DE INVESTIGACIÓN

En el siguiente estudio se presentará como variable principal nuevas oportunidades de tratamiento, es una variable cuantitativa y su escala de medición es longitudinal.

Variable independiente: Extracto etanólico de las hojas de *Caléndula officinalis* L (Caléndula).

Definición conceptual: Producto obtenido por maceración, para la extracción de compuestos bioactivos, concentrado, conservado y almacenado en envase ámbar. Administrado en diversas concentraciones.

Definición operacional: Maceración en alcohol 70% por 10 días, para la extracción de compuestos bioactivos y luego concentrado en estufa a 40 °C

Variable dependiente: Efecto Gastroprotector

Definición conceptual: Actividad gastroprotector del Extracto etanólico de las hojas de *Caléndula officinalis* L (Caléndula).

Definición operacional: Evaluación del extracto etanólico de las hojas de *Caléndula officinalis* L. (Caléndula).

2.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN D DATOS

Para la recolección de la información se utilizó la ficha Ad doc. Elaboradas por el investigador para todos los procesos experimentales, registrando los datos obtenidos los cuales permitieron llegar a posibles conclusiones.

Equipos e instrumentos

Para el trabajo se utilizaron los siguientes equipos:

- Balanza gramera. - para el pesado de las ratas albinas.
- Balanza analítica. - para el pesado de las hojas de “Caléndula”
- Estufa. - para el secado de las hojas de “Caléndula”
- Rotavapor. - para la extracción de alcohol de las hojas de “Caléndula”

Materiales

Para el trabajo se utilizaron los siguientes materiales:

- Material estéril de Laboratorio
- Papel Kraft
- Matraz Erlenmeyer
- Embudo
- Papel filtro
- Tubos de ensayo
- Pipetas

Reactivos

Para el trabajo se utilizaron los siguientes reactivos:

- Reactivo de Mayer
- Reactivo de gelatina al 1%
- Reactivo de Reineckato
- Reactivo de Sonneschein
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Cloruro Férrico
- Reactivo de Shinoda (magnesio + ácido clorhídrico concentrado)
- Reactivo de Dragendorff
- Alcohol de 96°C
- Etanol
- Cloroformo
- Agua destilada
- Isopropanol
- Metanol
- Reactivo de Tricloruro de Aluminio al 2%
- Acetato de sodio 1 M
- Estándar de Quercetina
- Omeprazol

2.5. PROCESO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Los datos fueron analizados por el sistema estadístico SPSS para determinar la significancia de los datos y determinar la robustez del proceso investigativo. Se desarrollo un ANOVA para determinar las pruebas paramétricas de varianza, media y promedio, finalmente se determinó el p=valor para la significancia entre grupos.

2.5.1. Procedimiento experimental (etapa I)

- **Secado de las hojas de “Caléndula”**

Se procedió a separar las hojas de las ramas con cuidado y recolectarlas, se lavaron con agua destilada para quitarle toda la suciedad, luego se pone en papel Kraft para luego ser llevado a la estufa a una temperatura de 40 °C; se utilizó esta temperatura para no alterar los metabolitos que queremos evaluar. Se pesó un total de 500 gramos de hojas de *Caléndula officinalis* “Caléndula”.

- **Extracción etanólica de las hojas de “Caléndula”**

Una vez ya secas las hojas de la Caléndula se colocaron en un recipiente adecuado para verter el solvente de etanol con lo cual se extrajo los metabolitos que pueden tener, la muestra se maceró por una semana (7 días) con agitación constante y protegidos de la luz para no alterar los metabolitos.

Después del tiempo transcurrido la muestra se filtró con papel Whattman #40, para no dejar pasar las hojas y si solo líquido para nuestros análisis posteriores. (16)

- **Extracto seco de las hojas de “Caléndula”**

Para el procedimiento del extracto seco se llevó el extracto filtrado al rotavapor, equipo que fué utilizado para la evaporación del solvente; este equipo consta de una vasija de calentamiento donde pusimos el agua destilada, un brazo que sujeta el balón donde fué depositada la muestra y al otro extremo un refrigerante que tiene una terminación para el recojo del alcohol en la muestra. Este trabajo fué a una temperatura controlada que no debe de exceder los 50°, después de un tiempo transcurrido la muestra fue llevada a la estufa a 40° donde se obtuvo el extracto seco que formó melcocha (extracto seco).

La muestra fue recolectada en envase protegido de la luz y guardada a temperatura de 2 a 8 °C hasta su utilización para la prueba de solubilidad, marcha fitoquímica y dosificación para el efecto Gastroprotector.

2.5.1.1. Marcha Fitoquímica

Es una de las pruebas más importantes de las ciencias farmacéuticas para determinar las propiedades farmacológicas que posee una especie botánica mediante la determinación de sus metabolitos activos. Para ello es necesario obtener la parte útil de la planta, aquella que contenga la mayor cantidad de principios activos y extraerlos por diferentes métodos utilizando solventes de diferentes polaridades. Son pruebas de precipitación y coloración de tipo cualitativo, el extracto es sometido a la acción de diferentes reactivos y estos a su vez revelan la presencia del analito fitoquímico. Los metabolitos primarios son compuestos que las plantas utilizan para su crecimiento y desarrollo sin propiedades terapéuticas para el ser humano sin embargo los metabolitos secundarios son los productos de desechos que excretan las plantas pero que poseen propiedades farmacológicamente importantes y en algunas condiciones muy enérgicas (tóxicas)

La prueba consiste en preparar una batería de tubos de ensayos y colocar en ellos una alícuota del extracto y enseguida los reactivos para cada uno de los grupos químicos a analizar.

- **Prueba para Alcaloides:**

Este ensayo es de tipo cualitativo de precipitación, en el se puede determinar la presencia de alcaloides según la reacción química entre el reactivo y el sustrato correspondiente. Para dar como positivo la presencia del metabolito es necesario que al menos 4 de las reacciones den positivas.

- **Reacción de Precipitación con Rvo. De Mayer.** - alícuota de la muestra de estudio más 5 gtas del Rvo. de Mayer. La presencia positiva estará determinada por la formación de un precipitado blanco cremoso.

- **Reacción de Precipitación con Rvo. De Reineckato.** - alícuota de la muestra de estudio más 5 gtas del Rvo. de Reineckato. La presencia positiva estará determinada por la formación de un precipitado floculante de color rosa.
- **Reacción de Precipitación con Rvo. De Sonneschein** - alícuota de la muestra de estudio más 5 gtas del Rvo. de Sonneschein. La presencia positiva estará determinada por la formación de un precipitado de color naranja.
- **Reacción de Precipitación con Rvo. De Wgner** - alícuota de la muestra de estudio más 5 gtas del Rvo. de Wagner. La presencia positiva estará determinada por la formación de un precipitado de color marrón
- **Reacción de Precipitación con Rvo. De Dragendorff** - alícuota de la muestra de estudio más 5 gtas del Rvo. de Dragendorff. La presencia positiva estará determinada por la formación de un precipitado de color naranja.

- **Prueba para Taninos:**
 - **Reacción de Precipitación con Rvo. de Gelatina** - alícuota de la muestra de estudio más 5 gtas del Rvo. de gelatina. La presencia positiva estará determinada por la formación de un precipitado de color blanco

- **Prueba para Flavonoides:**
 - **Reacción de coloración con Rvo. de Shinoda** - alícuota de la muestra de estudio más 5 gtas del Rvo. de shinoda. La presencia positiva estará determinada por la formación de un color roja para flavonoles y algunas veces azul o verde son consideradas positivas. Las chalconas y auronas dan coloración roja directamente por adición de ácido clorhídrico concentrado.

- **Prueba de Compuestos Fenólicos:**
 - **Reacción de coloración con Rvo. Cloruro Ferrico.-** alícuota de la muestra de estudio más 5 gtas del Rvo. de FeCl_3 . La presencia positiva estará determinada por la formación de un color azul, verde o negra.

Metabolitos Primarios

A.- Prueba para Azucares.

- **Reacción de coloración con Rv Fehling A y B.**- alícuota de la muestra de estudio más 5 gtas del Rvo. de Fehling A y B, luego baño maría. La presencia positiva estará determinada por la formación de un color anaranjado ladrillo.

B.- Prueba para Almidón.

- **Reacción de coloración con Rv Lugol.** - alícuota de la muestra de estudio más 5 gtas del Rvo. de Lugol. La presencia positiva estará determinada por la formación de un color azul oscuro

C.-Prueba para Cetonas.

- **Reacción de Precipitación con Rvo. 2,4 Dinitrofenilhidrazina (DNPH)** alícuota de la muestra de estudio más 5 gtas del Rvo. de 2,4 DNPH. La presencia positiva estará determinada por la formación de un precipitado amarillo o naranja rojizo. Los resultados fueron los siguientes. Ver tabla N° 7

2.5.1.2. Prueba de solubilidad:

Para la prueba de Solubilidad tuvimos que contar con el extracto seco de *Caléndula officinalis* "Caléndula". Tomamos una pequeña cantidad de muestra seca y la colocamos en los tubos de ensayo para luego verter unos 3 a 5 mL de los solventes como (Alcohol de 96°, Metanol, Cloroformo, Agua e Isopropanol) esta prueba nos da referencia en que solventes es más soluble la muestra a tratar. Debemos tener en cuenta la Polaridad del disolvente por que este le da propiedades de solubilización a diferentes solutos. Ver tabla N° 6

2.5.1.3. Cromatografía

Son técnicas analíticas simples, se puede realizar con muy poca muestra, es una técnica ampliamente usada en los controles de toda clase de productos naturales. También puede ser empleado como ensayo semicuantitativo comparando las intensidades de las manchas visualizadas con patrones adecuados.

La detección de los compuestos separados generalmente se realiza por métodos generales o específicos, la luz UV permite detectar sustancias que absorben a la longitud de onda larga 365nm y de onda corta a 254 nm.

A.- Cromatografía en capa fina para Alcaloides

Para la prueba de cromatografía en capa fina para alcaloides se usó la placa Cromatográfica de la marca Merck (TLC Silica gel F254) como fase estacionaria, para la fase móvil se usó el diluyente de elución de Metanol: Agua en proporción de (25:75) respectivamente. Para la comparación se usó un estándar de Cafeína en concentración de 10 mg/ mL el cual se inyectó 5 µl, caso similar con la muestra de *Caléndula officinalis* "Caléndula". En la placa Cromatográfica se aplica 5 µl del estándar y de muestra y una vez terminada la corrida se seca la placa en la plancha de calentamiento hasta evaporar todo el solvente, caso seguido se evidencia las manchas de desplazamiento en la luz UV 254 nm. Para la identificación de alcaloides en la muestra se rocía ácido sulfúrico al 2 % y luego el reactivo de Dragendorff, como revelador, para una evidencia positiva se tiene que ver manchas naranjas. Las muestras de *Caléndula officinalis* "Caléndula", dio positivo para alcaloides.

B.- Cromatografía en capa fina para flavonoides

Para la prueba de cromatografía en capa fina para alcaloides se usó la placa cromatográfica de la marca Merck (TLC Silica gel F254) como fase estacionaria, para la fase móvil se usó el solvente de elución de Butanol: Agua: Ácido acético glacial en proporción de (20:15:5) respectivamente, esta mezcla se colocó en una pera de bromo de 250 mL y se agitó, se evidencia la formación de dos fases, la fase móvil es la menos densa.

Para la comparación se usó un estándar de Quercetina en una concentración de 10 mg/ mL el cual se inyectó 5 µl a la placa Cromatográfica, caso similar con la muestra de *Caléndula officinalis* “Caléndula”.

En la placa Cromatográfica se aplica 5 µl del estándar y de muestra una vez terminada la corrida la muestra es secada en una plancha de calentamiento, hasta evaporación del solvente, se evidencia las manchas en la luz UV a 254 nm, y se usa como revelador el tricloruro de aluminio, para una muestra positiva es característico de manchas amarillas. La muestra de *Caléndula officinalis* “Caléndula” dio positivo para flavonoides.

2.5.2. Procedimiento experimental (etapa II)

El presente trabajo tuvo como objetivo primero la determinación de la Toxicidad Aguda Oral en ratas, para analizar si el extracto etanólico de la “Caléndula” causa mortalidad o signos adversos en los animales de experimentación y segundo la determinación de la Actividad gastroprotectora del extracto del en estudio.

En los ensayos realizados la administración del extracto fue por la vía oral.

En la prueba farmacológica el extracto fue administrado mediante sondas nasogástricas a diferentes niveles de dosis en un total de 30 ratas albinas machos (250, 500 y 1000 mg/kg de peso corporal), 5 ratas control positivo (Omeprazol 20 mg/kg), 5 ratas inducidas sin tratamiento y 5 ratas control negativo (normales) todas de la cepa Holtzman, de acuerdo con el procedimiento citado en el Manual de Técnicas de Investigación del CYTED. (17)

Se realizaron observaciones del proceso ulcerativo generado por la administración de un agente ulcerogénico, que fue el etanol absoluto, en una proporción de 1ml/ 200g por 7 días. Al otro día después de la inducción el extracto etanólico en estudio fue administrado por 21 días por vía oral a los animales de experimentación y se evaluó el efecto gastroprotector ante los daños generados en la inducción.

El extracto etanólico de Caléndula (*Caléndula officinalis*) presenta Actividad Gastroprotectora en el modelo estudiado, a las dosis de 250, 500 y 1000 mg de muestra/Kg peso corporal.

2.5.2.1. Parte experimental:

Se determinó la Toxicidad Aguda por vía oral en ratas, según Guía **OECD – Test 423** y la evaluación Gastroprotectora por vía oral del extracto etanólico de Caléndula (*Caléndula officinalis L.*) mediante la técnica citada en el Manual del Cyted.(18)

2.5.2.2. Animales de experimentación

Fueron usadas ratas albinas machos (cepa Holtzman) de 8 - 10 semanas de edad con un peso promedio de 220 - 230 g; provenientes de las instalaciones del Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. El proceso de cuarentena para la aclimatación a las condiciones ambientales y conductuales fue de cinco días. El total de animales fueron distribuidos en tres grupos de 3 ratas con una repetición y un control, para la prueba de toxicidad y otros 6 grupos de 5 animales por tratamiento, con un grupo control, para la prueba farmacológica. En total 36 animales para todo el ensayo. Los procedimientos aplicados en el cuidado de los animales usados durante la prueba cumplen con las directivas aceptadas en las Normas o Guías Internacionales para el Cuidado y Manejo de los animales de experimentación.

El control adecuado de las condiciones ambientales y las técnicas adecuadas del cuidado animal son necesarios para dar resultados significativos. La alimentación se realizó con alimento balanceado para roedores y agua ad libitum.

2.5.2.3. Dosificación y tratamiento de animales:

- **Toxicidad aguda oral**

La prueba incluyó un tratamiento con una repetición y un grupo control. La dosis tratada fue de 2000 mg de producto/Kg de rata. El volumen de administración del extracto Etanólico fue de 1 mL. La muestra fue disuelta con agua destilada y administrada en dosis única, mediante el uso de una sonda nasogástrica.

La mortalidad fue observada diariamente hasta los 14 días.

Adicionalmente se realizaron observaciones diarias para ver si hubo mortalidad o si se produjeron efectos adversos durante todo el tratamiento. Los tratamientos y sus respectivos valores de concentración ensayados son detallados en la siguiente Tabla:

Tabla N° 01: Tratamientos de experimentación

Dosis ((mg / Kg pc)	N° de animales Machos	Peso por grupos (g)
2000	3	222.18
2000 (repetición)	3	224.76
Control	3	227.84

Fuente: Elaboración propia

2.5.2.4. Observaciones y Sintomatología

Cada animal fue sacado de su jaula durante los 14 días de evaluación, para realizar la observación que incluyó: comportamiento general, piel, ojos, hocico, cavidad oral, abdomen, y genitales externos.

Tabla N° 02: Signos y síntomas evaluados

PARAMETROS /RESPUESTA	AGUA	ALCOHOL	OMEPRAZOL	MP 1000mg/kg	MP 500mg/kg	MP 250mg/kg
↑SNC ACTIVIDAD MOTORA						
Temblores finos en el cuerpo						
Temblores fuertes en el cuerpo						
Fasciculaciones						
Convulsiones clónicas						
Convulsiones tónicas						
Convulsiones mixtas						
Reacción a la alarma						
↓ SNC ACTIVIDAD MOTORA						
Actividad motora						
Ataxia						
Perdida del reflejo de enderezamiento						
Analgesia						
Anestesia						
perdida del reflejo corneal						
Perdida del reflejo pineal						
Parálisis de las patas anteriores						
Parálisis de las patas posteriores						
Reacción a la alarma						
OJOS						
Exoftalmia						
Enoftalmia						
Ptoxis palpebral						
Tamaño de la pupila						
Nistagmus						
Lacrimacion						
OREJA						
Palidez						
Hipertermia						
Cianosis						
EFFECTOS GENERALES						
Salivación						
Reacción al tacto						
Erección de la cola						
Pilo erección						
Micción						
Diarrea						
Priapismo						
Movimiento circular						
Temperatura rectal						
EFFECTOS SUBJETIVOS						
Agresivo						
Pasivo						
Temeroso						
OTRAS OBSERVACIONES						
Muerte súbita						
Muerte lenta						

Fuente: Elaboración propia

2.5.2.5. Resultado de toxicidad oral:

El extracto etanólico de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) no produjo mortalidad en las dosis administradas con una repetición durante los 14 días de evaluación de este estudio. La DL50 por vía oral de la muestra diluida en Agua destilada es mayor a 5000 mg de producto/Kg de peso corporal (> 5,0 g/ Kg de peso corporal) (Ver Tabla 9).

2.5.2.6. Determinación de la actividad gastroprotectora

La prueba incluyó un total de seis grupos, cada uno con 5 animales. Los tratamientos y sus respectivos valores de concentración ensayados son detallados en la siguiente tabla:

Tabla N° 03: Tratamientos de experimentación

Grupo	Animales	Dosis (mg/kg pc)
Control	5	-
Inducidos sin tratamiento	5	-
Omeprazol	5	20
Dosis 1	5	250
Dosis 2	5	500
Dosis 3	5	1000

Fuente: Elaboración propia

Pc: Peso corporal

La inducción para la generación del daño ulcerativo se realizó con etanol absoluto en una proporción de 1 mL/200 g. Esta inducción fue realizada por 5 días.

Luego de este proceso, se iniciaron las administraciones orales de las muestras del extracto etanólico en estudio en tres dosis: 250, 500 y 1000 mg/kg peso corporal y del control positivo, Omeprazol 20mg/kg peso corporal, por Veintiún días para evaluar el efecto. Hay que tomar en cuenta que además se tienen 2 grupos más, uno control, con animales sanos, y uno denominado inducidos sin tratamiento, que son los animales a los cuales se les generó daño, pero no recibieron tratamiento con la muestra.

Trascurridos los días de administración se realizó la eutanasia a todos los animales de los grupos ensayados por dislocación cervical, e inmediatamente se procedió a la necropsia de estos con la disección y extracción de los estómagos por el tercio anterior de la línea media abdominal, extrayéndose el estómago y abiertos por la curvatura mayor, lavándose cuidadosamente con cloruro de sodio 0.9 % (Suero fisiológico). Estos se extendieron sobre una tabla mediante alfileres.

Se evaluó la severidad de las lesiones gástricas midiendo el tamaño de las lesiones en milímetros usando un Vernier, marca Mitutoyo, y contando el número de estos en cada caso, así como la valoración de las úlceras formadas según la escala de Marhuenda.

Tabla N° 04: Evaluación de lesiones (Según Marhuenda)

Signos	Puntaje			
	0	1	2	3
Pérdida de pliegues de mucosa	No presenta	Si presenta		
Decoloración de la mucosa	No presenta	Si presenta		
Edema	No presenta	Si presenta		
Hemorragia	No presenta	Si presenta		
Número de petequias	Ninguno	De 1 – 5	De 5 – 10	Más de 10
Intensidad de la ulceración	No presenta úlcera	Úlcera menor de 1mm	Úlcera mayor de 1mm	Úlcera perforada

Fuente: Marhuenda R, Bravo D. Manual de Farmacoterapia. Madrid: Elsevier 2005 (19)

- **Hemograma**

Al término del ensayo (21 días), se procedió a obtener sangre por punción cardiaca de los animales ensayados (muestras y control). La muestra de sangre fue colectada en tubos heparinizados. Se procedió luego a determinar principalmente el hematocrito, Además del conteo de glóbulos rojos, hemoglobina, glóbulos blancos, formula leucocitaria, plaquetas.

La determinación del hematocrito, hemoglobina y glóbulos rojos nos dan un índice de pérdida de sangre en las úlceras hemorrágicas producidas por la inducción, y además un alcance del nivel de recuperación o cicatrización de las úlceras con la administración de las muestras.

- **Determinación del hemograma:**

Se realizó el hemograma (hematocrito, conteo de hematíes, glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas y hemoglobina) de los animales de experimentación al final del ensayo.

Tabla N° 05: Hemograma obtenido al final del tratamiento con Caléndula

GRUPO	DOSIS (mg / Kg)	Hto (%)	Hb (g/dL)	GR (10 ⁶ x uL)	GB (10 ³ x uL)	Pq (10 ³ x uL)	Nivel de significancia
Control	-	52.4 ± 2.08	14.85±0.31	7.7±0.64	7.88±2.92	1039.25±165.26	-
Inducidos s/t	-	38.75±1.23	8.07±0.64	7.51±0.88	12.66±1.97	786.27±216.56	P > 0.05
Omeprazol	20	65.25±1.11	18.51±0.77	9.67±0.25	11.16±1.68	1451.00±221.14	* p < 0.05
Dosis 1	250	57.53±1.04	16.53±0.61	8.76±0.09	8.18±2.69	1153.5±117.89	* p < 0.05
Dosis 2	500	58.3 ±0.85	16.65±0.76	8.69±0.42	6.2±0.81	1236.75±283.88	* p < 0.05
Dosis 3	1000	61.15±1.13	17.58±0.83	9.35±0.18	10.63±2.67	1443.00±226.28	* p < 0.05

Fuente: elaboración propia

Hto =Hematocrito Hb= Hemoglobina GR=Glóbulos rojos GB= Glóbulos blancos Pq=Plaquetas

* p < 0.05= Existen diferencias significativas con respecto al grupo control

De acuerdo con los resultados obtenidos se observa que hay diferencias significativas en las determinaciones del hemograma completo en los valores de hematocrito, hemoglobina, glóbulos rojos, y plaquetas con respecto al grupo inducidos sin tratamiento a un nivel de significancia de p < 0.05 en las dosis de 250, 500 y 1000 mg/kg peso corporal

Se observó con respecto a la determinación del hemograma específicamente a las determinaciones de hematocrito, hemoglobina y glóbulos rojos, un efecto dosis dependiente, con una relación directa entre las dosis administradas (250, 500, 1000 mg/kg peso corporal) y los efectos producidos en los aumentos de los valores hematológicos en los animales.

- **Condiciones ambientales:**

Durante la duración de la prueba, los parámetros ambientales registrados en el área de experimentación son los siguientes:

Temperatura (°C)	23.5
Humedad (%)	66 %
Luz, Oscuridad	12L: 12O

2.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para este proyecto de tesis usaremos 3 métodos estadísticos estandarizados:

- Escala de Marhuenda: Se utilizará para calificar el grado y aspecto de la mucosa de las ratas inducidas.
- Prueba de Tukey: Es un método que tendrá como fin comparar las medias individuales provenientes de un análisis de varianza de varias muestras sometidas a tratamientos distintos.
- Análisis de Varianza: (ANOVA) de una vía se usa para definir si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de tres o más grupos.

2.7. ASPECTOS ÉTICOS

Este proyecto de investigación para la salud se ejecutará de acuerdo a los tres principios universales de investigación: Respeto por las personas, Beneficencia y Justicia.

Así como el uso adecuado de las muestras biológicas con fines de investigación y la aplicación de metodologías que no vulneren los principios bioéticos.

III. RESULTADOS

3.1 De las pruebas de solubilidad

Tabla N° 6: Solubilidades del extracto de *Caléndula officinalis*

SOLVENTES	EXTRACTO SECO DE LAS HOJAS DE CALENDULA	RESULTADOS
Alcohol 96°C	Extracto seco en tubos de ensayo	+++
Cloroformo		-
Agua		-
Isopropanol		+
Metanol		+

Fuente: Elaboración propia

Donde: (-) Insoluble (+) Poco soluble (++) Soluble (+++) Muy soluble

En la tabla 1, se puede apreciar la solubilidad del extracto seco de las hojas de la caléndula con diferentes solventes, donde indica ser más soluble en alcohol y menos soluble en cloroformo y agua.

3.2 De la marcha fitoquímica

Tabla N° 7: Marcha fitoquímica del extracto seco de las hojas de caléndula

IDENTIFICACION DE METABOLITOS PRIMARIOS		
CONSTITUYENTES QUÍMICOS	ENSAYO	REACCIÓN
Azucares	Fehling A y B	(++)
Almidón	Lugol	(-)
Cetonas	2,4 DNPH	(-)
Aminoácidos	Ninhidrina	(++)

Fuente: Elaboración propia

Donde: (+++) Abundante (++) Moderado (+) Leve (-) Ausencia

IDENTIFICACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS		
CONSTITUYENTES QUÍMICOS	ENSAYO	REACCIÓN
Alcaloides	Rvo. Wagner	Coloración marrón (++)
	Rvo. Dragendorff	Precipitado rojo o naranja (+++)
	Rvo. Reineckato	Color lila (++)
	Rvo. Mayer	Coloración blanquecina (+)
Compuestos Fenólicos y Flavonoides	Rvo. Shinoda	Color rojo intenso (+++)
	Rvo. Cloruro Férrico	Color verde (+)
	Rvo. Gelatina al 1%	Precipitado blanco (++)
	Rvo. De Bortranger	Color rojo (+++)
Aceite	Rvo. Sudan III	Color rojo (+)

Fuente: Elaboración propia

Donde: (+++) Abundante (++) Moderado (+) Leve (-) Ausencia

- **Toxicidad Aguda Oral**

El extracto etanólico de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) no produjo mortalidad en las dosis administradas con una repetición durante los 14 días de evaluación de este estudio. La DL50 por vía oral de la muestra diluida en Agua Destilada es mayor a 5000 mg de producto/Kg de peso corporal (> 5,0 g/ Kg de peso corporal) (Ver Tabla 8).

Tabla Nº 8: Resultados de la Toxicidad Aguda Oral

Dosis (mg/Kg pc)	Mortalidad Machos Muertos/Total
2000	0/3
2000 (repetición)	0/3
Control	0/3

Fuente: Elaboración propia

Pc: peso corporal

Tabla Nº 9: Resumen de Observaciones después de la administración de los extractos y controles

PARAMETROS /RESPUESTA	AGUA	ALCOHOL	OMEPRAZOL	MP 1000mg/kg	MP 500mg/kg	MP 250mg/kg
↑SNC ACTIVIDAD MOTORA						
Temblores finos en el cuerpo	N	S	N	S	N	N
Temblores fuertes en el cuerpo	N	N	N	N	N	N
Fasciculaciones	N	N	N	N	N	N
Convulsiones clónicas	N	N	N	N	N	N
Convulsiones tónicas	N	N	N	N	N	N
Convulsiones mixtas	N	N	N	N	N	N
Reacción a la alarma	S	S	S	S	N	N
↓SNC ACTIVIDAD MOTORA						
Actividad motora	N	S	N	N	N	N
Ataxia	N	S	N	N	N	N
Perdida del reflejo de enderezamiento	N	S	N	N	N	N
Analgesia	N	S	N	N	N	N
Anestesia	N	S	N	N	N	N
perdida del reflejo corneal	N	S	N	N	N	N
Perdida del reflejo pineal	N	S	N	N	N	N
Parálisis de las patas anteriores	N	N	N	N	N	N
Parálisis de las patas posteriores	N	N	N	N	N	N
Reacción a la alarma	N	N	N	N	N	N
OJOS						
Exoftalmia	N	N	N	N	N	N
Enoftalmia	N	S	N	N	N	N
Ptosis palpebral	N	N	N	N	N	N
Tamaño de la pupila	N	-	N	N	N	N
Nistagmus	N	N	N	N	N	N
Lacrimacion	N	N	N	N	N	N
OREJA						
Palidez	N	S	S	N	N	N
Hipertermia	N	S	N	N	N	N
Cianosis	N	S	N	N	N	N
EFFECTOS GENERALES						
Salivación	N	S	N	N	N	N
Reacción al tacto	S	N	S	S	S	S
Erección de la cola	N	S	S	S	S	S
Pilo erección	N	S	S	S	S	S
Micción	S	S	S	S	S	S
Diarrea	N	N	N	N	N	N
Priapismo	N	N	N	N	N	N
Movimiento circular	S	N	S	S	S	S
Temperatura rectal	-	-	-	-	-	-
EFFECTOS SUBJETIVOS						
Agresivo	N	N	S	N	N	N
Pasivo	S	S	N	S	S	S
Temeroso	S	S	S	S	S	S
OTRAS OBSERVACIONES						
Muerte súbita	N	N	N	N	N	N
Muerte lenta	-	-	-	-	--	-

Fuente: Elaboración propia

Donde:

No presenta (N)

Si presenta (S)

No pudo observarse (-)

- Actividad Gastroprotectora

El extracto etanólico de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) presenta Actividad Gastroprotectora en el modelo estudiado, a las dosis de 500 y 1000 mg de muestra/Kg peso corporal.

En referencia a las mediciones realizadas al tamaño de las lesiones gástricas, a las valoraciones del daño ulcerativo y a los porcentajes de inhibición, los datos son mostrados en la Tabla 10 y Gráfico 1

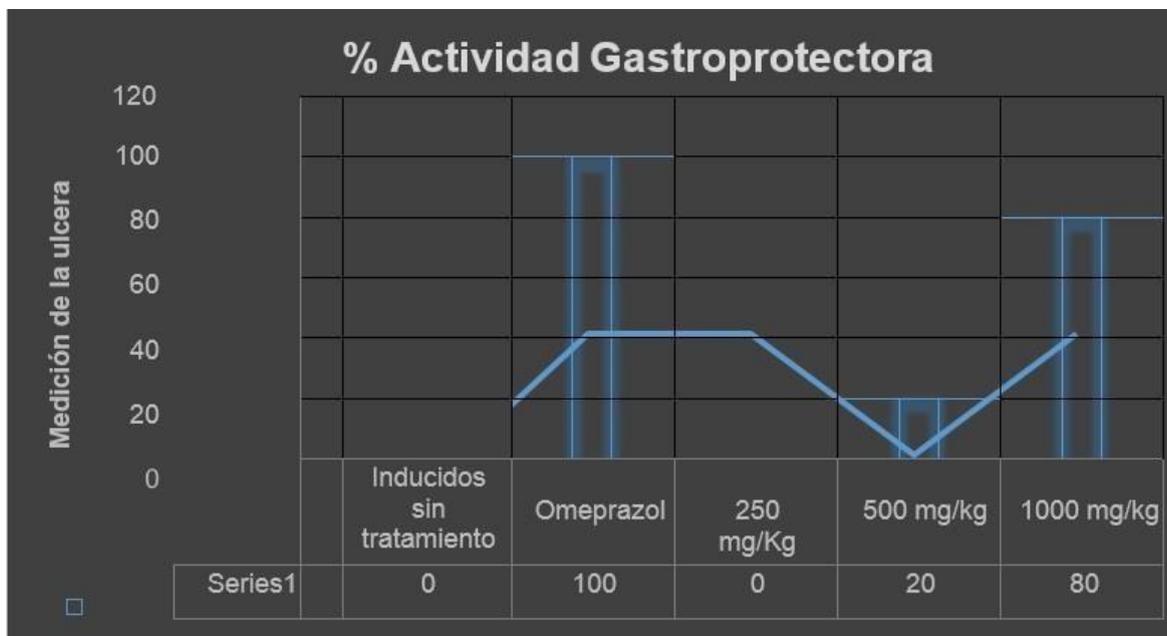
Tabla N° 10: Resultados de la actividad gastroprotectora (puntaje alcanzado)

	SIGNOS						
TRATAMIENTOS	Pérdida de Pliegue de Mucosa	Decoloración de la mucosa	Edema	Hemorragia	N° De petequias	Intensidad de la lesión	TOTAL
Control	0	0	0	0	0	0	0
Inducidos sin tratamiento	1	1	1	1	3	3	10
Omeprazol	0	0	0	0	0	0	0
250 mg/Kg	1	1	1	1	3	3	10
500 mg/kg	1	1	1	1	2	1	7
1000 mg/kg	0	0	0	0	1	1	2

Fuente: Marhuenda R, Bravo D. Manual de Farmacoterapia. Madrid: Elsevier 2005 (19)

La tabla de resultados expresa que la mejor actividad gastroprotectora fue presentado por el farmaco Omeprazol, la muestra al 1000 mg/Kg presento un puntajesimilar al farmaco control, las otras concentraciones presentaron un puntaje muy alto indicando una baja de actividad gastroprotectora.

Figura 1: % Actividad Gastroprotectora en ratas inducidas tratadas con Caléndula



Fuente: Elaboración propia

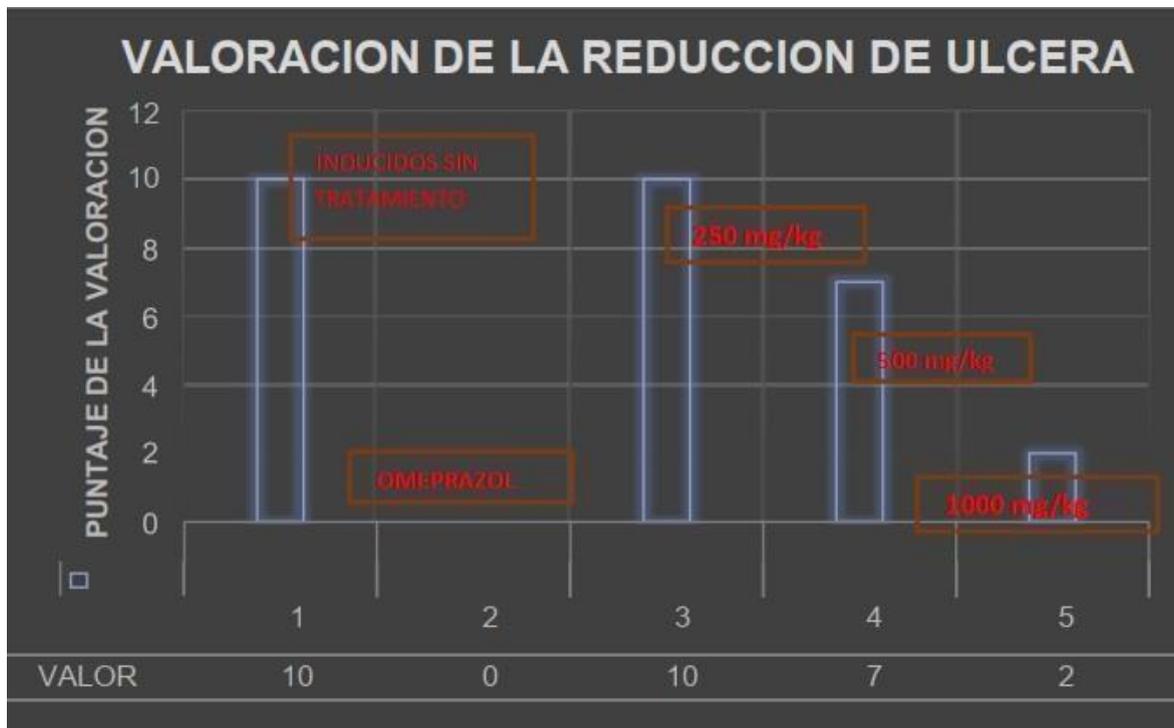
Tabla Nº 11: Resultados de la actividad gastroprotectora (porcentaje alcanzado)

TRATAMIENTOS	NUMERO DE RATAS POR GRUPO	PUNTAJE	% DEACTIVIDAD GASTROPROTECTORA
Control	5	0	100
Inducidos sin tratamiento	5	10	0
Omeprazol	5	0	100
250 mg/Kg	5	10	0
500 mg/kg	5	7	20
1000 mg/kg	5	2	80

Fuente: Marhuenda R, Bravo D. Manual de Farmacoterapia. Madrid: Elsevier 2005 (19)

Los resultados de la actividad gastroprotectora demostraron que el extracto etanólico de las hojas de *Caléndula officinalis* (Caléndula) a 1000 mg/kg presentó una efectividad del 80% las otras concentraciones presentaron una actividad gastroprotectora del 20% y 0% respectivamente.

Figura 2: Valoración de la ulceración según Marhuenda en ratas inducidas tratadas con Caléndula



Fuente: Elaboración propia

A mayor concentración de caléndula la ulceración es menor, las lesiones más altas serán en las ratas albinas de Holtzman inducidas sin tratamiento. Mi dosis de 1000 mg/kg no supera al Omeprazol.

Contrastación de hipótesis

- **Hipótesis específica I**

H_a El extracto etanólico de las hojas de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) SI presenta metabolitos secundarios.

H₀ El extracto etanólico de las hojas de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) NO presenta metabolitos secundarios.

Resultado: Según la tabla N° 7 se observa que hay presencia de alcaloides en su mayoría, así como flavonoides en mayor proporción, también compuestos fenólicos, taninos y quinonas. Se concluye que hay presencia de metabolitos secundarios.

Decisión: Por lo tanto, hay presencia de metabolitos secundarios. Se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

▪ **Hipótesis específica II**

H_a Si existe el efecto Gastroprotector a partir del extracto etanólico de las hojas de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) en ratas albinas cepas Holtzman.

H₀ No existe el efecto Gastroprotector a partir del extracto etanólico de las hojas de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) en ratas albinas cepas Holtzman.

Tabla N° 12: Análisis de varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados
Entre grupos	177.5376	4	44.3844	219.51	3.235E-16	2.866081
Dentro de los grupos	4.044	20	0.2022			
Total	181.5816	24				

Fuente: Elaboración propia

• **Conclusión**

Con un nivel de confianza de 80%, aceptamos la hipótesis alterna y rechazamos la nula

ANALISIS MULTIPLE POSTERIOR: PRUEBA DE TUKEY

Se halla la Diferencia Honestamente Significativa (HSD) utilizando la Prueba de Tukey, HSD = 0.85, los valores mayores a este dato son los grupos que hacen la diferencia significativa (como valor absoluto), por lo tanto, son los que mostrarían mayor actividad Antiinflamatoria.

Tabla N° 13: PRUEBA DE TUKEY

	Inducidos s/t	Omeprazol 20 mg/kg	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg
Inducidos s/t		7.0	2.4	3.6	6.4

Fuente: Elaboración propia

- **Conclusión**

Con un nivel de confianza del 80%, podemos determinar que las dosis con mayor actividad es la de 1000 mg/Kg.

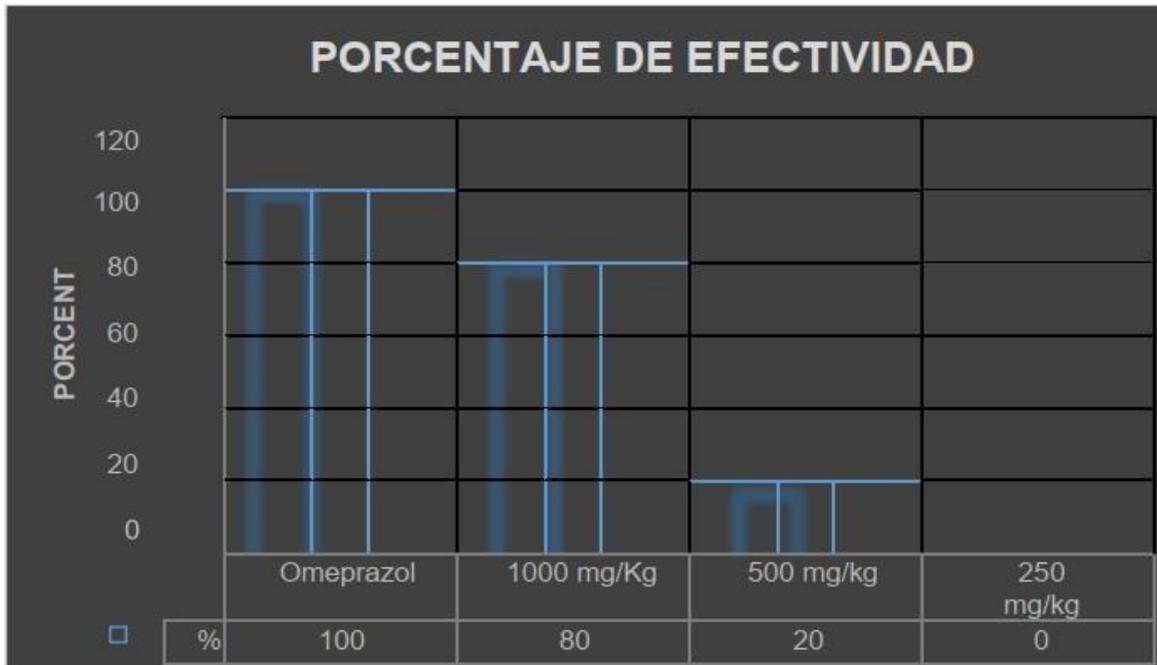
Resultado: Al reflejar el análisis de Anova, Se determinó que todos los grupos ensayados son diferentes entre sí, seguidamente se hizo el estadístico de Tukey para saber si el valor absoluto de las diferencias de las medias de los grupos ensayados con el control positivo sin tratamiento es mayor que la diferencia honestamente significativa (HSD). Según lo explicado se concluye que todas las concentraciones ensayadas tienen efecto gastroprotector.

- **Hipótesis específica III**

H_a El extracto etanólico a partir de las hojas de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) SI tienen efecto significativo Gastroprotector comparado con el fármaco de omeprazol en ratas albinas cepa Holtzman.

H₀ El extracto etanólico a partir de las hojas de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) NO tienen efecto significativo Gastroprotector comparado con el fármaco de omeprazol en ratas albinas cepa Holtzman.

Figura 3: % de efectividad en ratas inducidas tratadas con Caléndula



Fuente: Elaboración propia

Resultado: Los resultados de la efectividad en ratas inducidas con el tratamiento del extracto etanólico de las hojas de *Caléndula officinalis* L. (Caléndula) fue a 1000 mg/Kg 80% a 500mg/kg 20% y a 250mg/kg 0% de efectividad respectivamente. El fármaco control Omeprazol, presento un 100% de eficacia gastroprotectora.

Decisión: por lo tanto, los resultados confirman que el fármaco control presenta una efectividad mayor con lo cual se rechaza la hipótesis alterna y se acepta la hipótesis nula: el extracto etanólico a partir de las hojas de *Caléndula officinalis* L. (Caléndula) no tiene igual efecto gastroprotector en comparación con el omeprazol.

IV. DISCUSIÓN

4.1 Discusión de resultados

En cuanto a la primera hipótesis podemos señalar que los resultados de la marcha Fitoquímica revelaron la presencia de compuestos flavonoides, fenólicos, alcaloides. El hallazgo de estos metabolitos fue de suma importancia ya que al revisar los estudios de plantas con actividad gastroprotectora, se pudo evidenciar en los estudios de Mogrovejo (20) la presencia de flavonoides como los responsables de inducir el efecto gastroprotector, Bucciarelli (21) también menciona a los flavonoides como responsable del efecto gastroprotector y Águila (22) también menciona a los flavonoides como agente antimicótico y a las saponinas, polisacáridos, aminoácidos, y taninos como coadyuvantes del proceso, potencializando su efecto.

En cuanto a la segunda hipótesis, si existe efecto gastroprotector a partir del extracto de las hojas de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) en ratas albinas cepa Holtzman, se pudo evidenciar que todas las concentraciones presentan un efecto significativo en el proceso gastroprotector y que las concentraciones mayores son más efectivas en provocar este proceso. Estos estudios son comparados a los realizados por Bucciarelli (21) quien evaluó la actividad antiulcerosa del extracto etanólico de varias plantas entre ellas las hojas de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) evidenciando que la concentración de 22% fue eficaz en el modelo experimental con una inhibición del 84.4%, asimismo Mogrovejo ⁽¹⁵⁾ encontró que las concentraciones óptimas de su especie vegetal con propiedad cicatrizante fue al 10%.

Finalmente, en cuanto a la tercera hipótesis las hojas de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) elaborado a partir del extracto etanólico tiene efecto gastro protector significativo en ratas albinas cepa Holtzman. Bucciarelli (21) quien analizó la *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA). Demostró que es efectiva en las lesiones gástricas en ratones provocados por un factor agresivo como el etanol. La reacción de caracterización realizada sobre el extracto obtenido sugiere la presencia de flavonoides en la planta estudiada. Estos compuestos poseen amplios efectos biológicos, entre los cuales se incluye la actividad antiulcerosa en este modelo experimental.

El pretratamiento con el extracto etanólico de la *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) u Omeprazol inhibió la formación de lesiones gástricas inducidas por el etanol. La gravedad de las mismas se refleja en el índice de ulcera, que fue significativamente menor en los grupos tratados en comparación con el control. Todos los estudios revisados por otros autores evidenciaron que sus productos vegetales no alcanzan la actividad gastroprotectora de los controles, esto no quiere decir que no se puedan usar, sino que pueden potencializarse con el empleo de algún excipiente durante la preparación de la formulación.

4.2 Conclusiones

Los estudios realizados en el presente trabajo nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- El extracto etanólico de las hojas de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) presenta componentes fitoquímicos tales como flavonoides, alcaloides, compuestos fenólicos, aceite.
- El extracto etanólico de las hojas de la *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) posee efecto gastroprotector en ratas con lesiones gástricas a una concentración de 1000 mg/kg. Con un efecto de 80%.
- El efecto gastroprotector del extracto etanólico de las hojas de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) en lesiones gástricas inducidas en ratas albinas Holtzman en comparación con el Omeprazol, se pudo evidenciar que las concentraciones ensayadas de 1000 mg/kg. (80%), 500mg/kg (20%) y 250 mg/kg. (0%) tienen un efecto gastroprotector y significativo pero que a su vez no superan al Omeprazol con 100%.

4.3 Recomendaciones

- Realizar estudios con la finalidad de dilucidar los metabolitos secundarios encontrados y determinar las estructuras químicas probable responsable de la actividad gastroprotectora.
- Realizar estudios con otras partes útiles de la planta (flores, tallo, raíz) con la finalidad de demostrar posibles actividades farmacológicas.
- Realizar estudios de sinergia con otras especies vegetales a fin de aumentar o potencializar la eficacia terapéutica del extracto etanólico de las hojas de *Caléndula officinalis* L. (Caléndula)

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Salaverry O, Cabrera J. Florística de algunas plantas medicinales. Rev. Perú. med. exp. salud pública. 2014
2. Rainer W, Douglas S. Plantas medicinales de los Andes y de la Amazonía. La flora mágica y medicinal del norte. Trujillo, Perú. 2015.
3. Catalogación por la biblioteca de la OMS: Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Ginebra 27, Suiza. 2013.
4. Truyols J, Martínez A, García A. ULCERA GASTRICA Y DUODENAL. Guía de Actuación Clínica en A.P.
5. Valdivia M. Inflamación aguda y gastralgias. Rev. Gastroenterólogo. Perú. 2011.
6. López J. Resultado del compuesto con concentrado de las hojuelas de matiko y Llantén en plastibase, en la evolución restaurativa de una ulcera estandarizada de mucosa palatina de un roedor. Tesis para optar por el título de cirujano dentista en la Universidad de Chile. 2012
7. Arce R, Molina J, Morán F, Moreno J. Efecto protector del Aloe vera (sábila) en lesiones gástricas inducidas con etanol en ratas. Lima, Perú. 2007.
8. Huamán O, Sandoval M, Arnao I, Béjar E. "Efecto antiulceroso del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de Bixa orellana (achiote), en ratas". Rev. Anales. Facultad de Medicina. UNMSM. Lima- Perú. 2009.
9. Inocente T. Causa Gastroprotectora De la Extracción Hidroalcohólica De Las Hojillas De Mutisia acuminata R.&P. "Chinchemano" en lesiones gástricas inducidas por naproxeno sódico. Tesis para optar por el título profesional de Q.F. Universidad Norbert Wiener. Lima-Perú 2017
10. Reyes L. Efecto gastroprotector del extracto hidroalcohólico de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) sobre las úlceras gástricas inducidas en *Rattus norvegicus* var. Albinus. Tesis para Optar el Título de Químico Farmacéutico. Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. Universidad Católica los Ángeles Chimbote. 2019
11. Coronel A. Efecto regenerador del extracto acuoso de semilla de *Linum usitatissimum* (linaza) sobre la mucosa gástrica con úlcera inducida por etanol en ratas. Tesis para optar por el título profesional de licenciada en nutrición. UNMS. 2016.

12. Pandey S, Umre R, Dubey N, Ganeshpurkar A, Ganeshpurkar A, Shrivastava A. In vitro, in vivo and in silico antiulcer activity of ferulic acid. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018; 4(2): 248-253. DOI: 10.1016/j.fjps.2018.08.001
13. Shukla I, Alauddin, Azmin L, Chaturvedi S, Naseem Z, Agarwai N, Rao C. Gastroprotective effect of formononetin against ethanol-induced gastric ulceration in rats via augmentation of cytoprotective markers and curtailing apoptotic gene expression. *Phcog Mag*. 2018; 14(1): 605-12. DOI: 10.4103/pm.pm_205_18
14. Snalkumar K, Pariyani J. Anti-ulcer effect of extract of rhizome of *Curcuma longa*. L against aspirin-induced peptic ulcer in rats. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*. 2018; 8(5): 650-657. DOI: 10.5455/njppp.2018.8.1249201012018
15. Cechinel C. Estudos pré-clínicos e clínicos de espécies vegetais seleccionadas de países pertencentes ao Mercosul e aspectos toxicológicos. *Ciencias Farmacéuticas Infarma*. 2017; 29(4): 284-301: Doi: 10.14450/2318- 9312.
16. Benitez R, Sarria R. Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales [Internet]. 2018 [citado 4 agosto 2018]. Disponible en: <https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/view/3597/3642#toc>
17. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. España. CYTED [Internet]. [citado 2021]. Disponible en: <http://www.cytcd.org/es/cytcd>
18. Pruebas de toxicidad oral aguda. España. Ivami [Internet]. [citado 1992]. Disponible en: <https://www.ivami.com/es/evaluacion-biologica-de-dispositivos-medicos/706-pruebas-de-toxicologia-270-toxicidad-oral-aguda-b-oecd-423-2001-epa-oppts-870-1100-1998-directiva-92-69-cee-de-31-de-julio-de-1992-apartado-b-1-acute-oral-toxicity>
19. Marhuenda R, Bravo D. *Manual de Farmacoterapia*. Madrid: Elsevier 2005
20. Mogrovejo A. Determinación del efecto cicatrizante de un gel estandarizado de *Caléndula officinalis* L. (Caléndula) en animales de experimentación. 2014.
21. Bucciarelli A, Skliar MI. *Plantas medicinales de Argentina con actividad gastroprotectora*. Universidad Nacional del sur. Bahia Blanca, Argentina 2007.
22. Águila B, Menéndez R, González C, Fernández D. Extracto acuoso de *Caléndula officinalis*. Estudio preliminar de sus propiedades. *Revista Cubana plantas medicinales*.2000.

ANEXOS

Anexo A. Operacionalización de las variables

VARIABLES	Tipo de variable	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	N° DE ITEMS	VALOR FINAL	CRITERIOS
VARIABLE INDEPENDIENTE Extracto etanólico de las hojas de <i>Caléndula officinalis</i> L. (Caléndula)	Cualitativo y aplicada.	Producto obtenido por maceración, para la extracción de compuestos bioactivos, concentrado y almacenado en envase ámbar. Administrado en diversas concentraciones	Maceración en alcohol 70% por 10 días, para la extracción de compuestos bioactivos y luego concentrado en estufa a 40 °C	Fitoquímica: Marcha fitoquímica	Determinación de metabolitos primarios y secundarios	8	+++ Abundante ++ Moderado	Rango de presencia o ausencia
				Prueba de solubilidad	Alcohol 96°C Cloroformo Agua Isopropanol Metanol	5	+++ Muy soluble + Poco soluble	Concentración final
VARIABLE DEPENDIENTES Efecto gastroprotector en ratas albinas cepas Holtzman	Cuantitativo y transversal	Actividad gastroprotector del Extracto etanólico de las hojas de <i>Caléndula officinalis</i> L. (Caléndula).	Evaluación del extracto etanólico de las hojas de <i>Caléndula officinalis</i> L. (Caléndula).	Evaluación de lesiones gástricas	Sin lesión Severidad de la lesión Tamaño de lesiones	3	Crecimiento Sin crecimiento	Evidencia de inhibición de crecimiento

ANEXO B. CLASIFICACION TAXONÓMICA

ANEXO C. EVIDENCIAS FOTOGRÁFICAS DEL TRABAJO DE LABORATORIO

ANEXO D. EVIDENCIAS FOTOGRÁFICAS DEL TRABAJO DE CAMPO



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

"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N° 381-USM-2018

EL JEFE 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 completa) recibida de **Gladys CIPRIAN MENDOZA**, estudiante de la Universidad Nacional Garcilaso de la Vega, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica; ha sido estudiada y clasificada como: ***Calendula officinalis* L.** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ASTERIDAE

ORDEN: ASTERALES

FAMILIA: ASTERACEAE

GENERO: *Calendula*

ESPECIE: *Calendula officinalis* L

Nombre vulgar: "Caléndula"
Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán Santiago

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

Lima, 19 de octubre de 2018




Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ACE/ddb

Av. Avenida 1256, Jesús María
Apto. 14-0456, Lima 14, Perú

Teléfono:
619-7000 exts 5701, 5703, 5704

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

ANEXO 1

Recolección de la especie botánica *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA)



ANEXO 2

Imagen que muestra la planta de la caléndula, sus flores y hojas.



ANEXO 3

Altura y crecimiento de la planta de *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA)



ANEXO 4

Preparación del extracto etanólico.



ANEXO 5

Preparación para marcha Fitoquímica



ANEXO 6

Resultado marcha Fitoquímica.



ANEXO 7

Pesado de los animales de experimentación



ANEXO 8

Administración del etanol a los animales de experimentación



ANEXO 9

Disección de los animales de experimentación



ANEXO 10

Corte para visualizar el estómago de los animales de experimentación inducidos a lesiones gástricas.



ANEXO 11

Eutanasia y disección de la rata



ANEXO 12

Extracción del estómago para la apertura por la línea del tercio inferior



ANEXO 13

Control negativo: Grupo sin tratamiento con formación de úlceras con puntaje 3 con hemorragia y necrosis.



ANEXO 14

Daño en el estómago con edema e infiltración generalizada sin tratamiento.



ANEXO 15

Dosis de 250mg/kg: puntaje 3 con formación de úlceras perforadas de longitud menor de 5mm y diámetro menor de 2mm



ANEXO 16

Úlceras hemorrágicas menores de 2mm



ANEXO 17

Dosis de 500mg/kg: Puntaje 1 con formación de menos de 4 úlceras.



ANEXO 18

Formación de úlceras hemorrágicas de menos de 2mm de diámetro



ANEXO 19

Dosis de 1000 mg/kg, Puntaje 1 con formación de una ulcera fina menor de 1mm



ANEXO 20

Control positivo, con tratamiento con Omeprazol 40mg/kg y puntaje 0



ANEXO 21

Certificado de las ratas albinas Holtzman



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

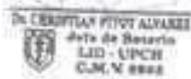
CERTIFICADO

Lima, 15 de Noviembre del 2018

Mediante la presente se certifica que los 31 ratas albinas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Holtzman, machos con un promedio de peso de 220 g, adquiridos el 15 de noviembre del 2018, se encuentran en estado sanitario y fisiológico para ser utilizado en cualquier protocolo biomédico.

Se expide este documento para fines pertinentes.

Atentamente,

DR. CHRISTIAN PIZARRO ALVAREZ
Médico de Laboratorio
LID - UNPCH
C.M.V. 8888

ANEXO 22

Hoja de validación de instrumentos a 250 mg/kg

			
UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE VEGA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA			
HOJA DE VALIDACION DE INSTRUMENTOS			
EFFECTO GASTROPROTECTOR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Caléndula officinalis</i> L. (CALÉNDULA) EN RATAS ALBINAS CEPAS HOLTZMAN			
PRUEBA DE SOLUBILIDAD			
Numero de tubos	Volumen	Solventes	Resultados
1		Etanol 96°	
2		Cloroformo	
3		Agua	
4		Isopropanol	
5		Metanol	

(-) La solubilidad no se visualiza
(+) La solubilidad en menor grado
(++) La solubilidad es moderada
(+++) La solubilidad es mayor

Observación.....

Fecha

Validado por

DNI

Firma:
.....



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICA

HOJA DE VALIDACION DE INSTRUMENTOS

EFFECTO GASTROPROTECTOR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
LAS HOJAS DE *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) EN RATAS
ALBINAS CEPAS HOLTZMAN

MARCHA FITOQUÍMICA			
Numero de tubos	Ensayo	Metabolito	
1	Wagner	Alcaloides	
2	Dragendorff	Alcaloides	
3	Reineckato	Alcaloides	
4	Mayer	Alcaloides	
5	Shinoda	Flavonoides	
6	Cloruro Férrico	Comp. Fenólicos	
7	Gelatina al 1%	Taninos	
8	Reacción de Bortranger	Quinonas	
9	SUDAN III	Aceite	

(-) La solubilidad no se visualiza
(+) La solubilidad en menor grado
(++) La solubilidad es moderada
(+++) La solubilidad es mayor

Observación.....

Fecha

Validado por

DNI

Firma:

.....



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICA

HOJA DE VALIDACION DE INSTRUMENTOS

EFFECTO GASTROPROTECTOR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS
DE *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) EN RATAS ALBINAS CEPAS
HOLTZMAN

		RESUMEN DE OBSERVACIONES				
Concentración	Nº rata	0 días	7 días	14 días	21 días	28 días
250 mg	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					

Donde:

- ⋄ No presenta (N)
- ⋄ Si presenta (S)
- ⋄ No pudo observarse (-)

- ↑ SNC ACTIVIDAD MOTORA
- ↓ SNC ACTIVIDAD MOTORA
- OJOS
- OREJA
- EFFECTOS GENERALES
- EFFECTOS SUBJETIVOS
- OTRAS OBSERVACIONES

Observación.....

Fecha.....

Validado por.....

DNI.....

Firma:

.....

ANEXO 23

Hoja de validación de instrumentos al 500 mg/kg



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICA

HOJA DE VALIDACION DE INSTRUMENTOS

EFFECTO GASTROPROTECTOR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
LAS HOJAS DE *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) EN RATAS
ALBINAS CEPAS HOLTZMAN

PRUEBA DE SOLUBILIDAD			
Numero de tubos	Volumen	Solventes	Resultados
1		Etanol 96°	
2		Cloroformo	
3		Agua	
4		Isopropanol	
5		Metanol	

(-) La solubilidad no se visualiza
(+) La solubilidad en menor grado
(++) La solubilidad es moderada
(+++) La solubilidad es mayor

Observación.....

Fecha

Validado por

DNI

Firma:

.....



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICA

HOJA DE VALIDACION DE INSTRUMENTOS

EFFECTO GASTROPROTECTOR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
LAS HOJAS DE *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) EN RATAS
ALBINAS CEPAS HOLTZMAN

MARCHA FITOQUIMICA			
Numero de tubos	Ensayo	Metabolito	
1	Wagner	Alcaloides	
2	Dragendorff	Alcaloides	
3	Reineckato	Alcaloides	
4	Mayer	Alcaloides	
5	Shinoda	Flavonoides	
6	Cloruro Férrico	Comp. Fenólicos	
7	Gelatina al 1%	Taninos	
8	Reacción de Bortranger	Quinonas	
9	SUDAN III	Aceite	

(-) La solubilidad nose visualiza
(+) La solubilidad en menor grado
(++) La solubilidad es moderada
(+++) La solubilidad es mayor

Observación.....

Fecha

Validado por

DNI

Firma:

.....



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICA

HOJA DE VALIDACION DE INSTRUMENTOS

EFFECTO GASTROPROTECTOR DE EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS
DE *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) EN RATAS ALBINAS CEPAS
HOLTZMAN

		RESUMEN DE OBSERVACIONES				
Concentración	Nº rata	0 días	7 días	14 días	21 días	28 días
500 mg	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					

Donde:

- ◊ No presenta (N)
- ◊ Si presenta (S)
- ◊ No pudo observarse (-)

↑ SNC ACTIVIDAD MOTORA
↓ SNC ACTIVIDAD MOTORA
OJOS
OREJA
EFECTOS GENERALES
EFECTOS SUBJETIVOS
OTRAS OBSERVACIONES

Observación.....

Fecha

Validado por

DNI

Firma:

.....

ANEXO 24

Hoja de validación de instrumentos al 1000 mg/kg



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICA

HOJA DE VALIDACION DE INSTRUMENTOS

EFFECTO GASTROPROTECTOR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
LAS HOJAS DE *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) EN RATAS
ALBINAS CEPAS HOLTZMAN

PRUEBA DE SOLUBILIDAD			
Numero de tubos	Volumen	Solventes	Resultados
1		Etol 196°	
2		Cloroformo	
3		Agua	
4		Isopropanol	
5		Metanol	

(-) La solubilidad nose visualiza
(+) La solubilidad en menor grado
(++) La solubilidad es moderada
(+++) La solubilidad es mayor

Observación.....

Fecha

Validado por

DNI

Firma:

.....



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICA

HOJA DE VALIDACION DE INSTRUMENTOS

EFFECTO GASTROPROTECTOR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
LAS HOJAS DE *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) EN RATAS
ALBINAS CEPAS HOLTZMAN

MARCHA FITOQUÍMICA			
Numero de tubos	Ensayo	Metabolito	
1	Wagner	Alcaloides	
2	Dragendorff	Alcaloides	
3	Reineckato	Alcaloides	
4	Mayer	Alcaloides	
5	Shinoda	Flavonoides	
6	Cloruro Férrico	Comp. Fenólicos	
7	Gelatina al 1%	Taninos	
8	Reacción de Bortranger	Quinonas	
9	SUDAN III	Aceite	

(-) La solubilidad nose visualiza
(+) La solubilidad en menor grado
(++) La solubilidad es moderada
(+++) La solubilidad es mayor

Observación.....

Fecha

Validado por

DNI

Firma:

.....



**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICA**

HOJA DE VALIDACION DE INSTRUMENTOS

**EFFECTO GASTROPROTECTOR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS
DE *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) EN RATAS ALBINAS CEPAS
HOLTZMAN**

		RESUMEN DE OBSERVACIONES				
Concentración	Nº rata	0 días	7 días	14 días	21 días	28 días
1000 mg	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					

Donde:

- ❖ No presenta (N)
- ❖ Si presenta (S)
- ❖ No pudo observarse (-)

- ↑ SNC ACTIVIDAD MOTORA
- ↓ SNC ACTIVIDAD MOTORA
- OJOS
- OREJA
- EFFECTOS GENERALES
- EFFECTOS SUBJETIVOS
- OTRAS OBSERVACIONES

Observación.....

Fecha.....

Validado por.....

DNI.....

Firma:

.....



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICA

HOJA DE VALIDACION DE INSTRUMENTOS

EFFECTO GASTROPROTECTOR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
LAS HOJAS DE *Caléndula officinalis* L. (CALÉNDULA) EN RATAS
ALBINAS CEPAS HOLTZMAN

GRUPO EXPERIMENTAL			
Nombre de grupo	Nº de ratas por grupo	Dosis Administrada (mg/kg - pc)	% Inhibición
Control	5	-	
Inducidos sin Tratamiento	5	-	
Omeprazol	5	20	
Grupo Experimental 1	5	250	
Grupo Experimental 2	5	500	
Grupo Experimental 3	5	1000	

Observación.....

Fecha

Validado por

DNI

Firma:

.....

ANEXO 26



ANEXO 27



ANEXO 28

