

## EFECTO ANTIINFLAMATORIO EN RATONES DE EXTRACTOS DE *Calceolaria Tripartita* R & P, COMPARACIÓN FITOQUÍMICA CON EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Calceolaria melissifolia* "BENTHAM"

### Antiinflammatory effect in mice of extracts of *Calceolaria tripartita* R & P, compared phytochemical with the hydroalcoholic extract of *Calceolaria melissifolia* "Bentham"

Olinda Mayhuasca<sup>1</sup>, Pablo Bonilla R.<sup>1</sup>, Marlene Ballón<sup>1</sup>, Maria Ferreira<sup>1</sup>, Eriberto Carrasco<sup>1</sup>

#### RESUMEN

Los estudios de investigación se orientaron a comprobar la actividad antiinflamatoria, atribuida por el uso popular, en el distrito de Pilcomayo, provincia de Huancayo, departamento de Junín, de la especie *Calceolaria tripartita* R & P. Se trabajó con las partes aéreas (hojas y tallos) de la planta perteneciente al Género *Calceolaria* y a la Familia *Scrophulariaceae*. Se hicieron extracciones continuas por Soxhlet. Se realizó un screening fitoquímico preliminar del extracto etanólico en el cual se halló: alcaloides, catequinas, esteroides y/o triterpenos, flavonoides, saponinas y taninos. De igual forma se procedió con el extracto diclorometánico, encontrándose: aceites esenciales, ácidos grasos, cumarinas, esteroides y triterpenos. La actividad farmacológica se realizó según el método del edema auricular inducido por aceite de croton en ratones, evaluando la actividad antiinflamatoria de los extractos etanólico y diclorometánico a una dosis de 1 mg/oreja, frente a fármacos de conocida actividad antiinflamatoria como son la dexametasona acetato y la indometacina, los cuales fueron empleados a una dosis de 0,1 mg/oreja y 0,5 mg/oreja respectivamente. Ambos extractos poseen actividad antiinflamatoria, presentando mayor actividad el extracto etanólico. Por otra parte al realizar el estudio antimicrobiano del extracto acuoso de las partes aéreas de *Calceolaria melissifolia* Benth. Subsp. *Pseudocabra* (Edwin) Molau., procedente de la provincia de Celendín, departamento de Cajamarca, constituido por compuestos fenólicos tipo flavonoides de las que se aislaron e identificaron tres como 7,4'-di-O-alquil-3,5,3'-trihidroxi-flavonol; 5,7,4'-tri-O-alquil-3',5'-dihidroxi-flavanona y 5,7,4'-trihidroxi-flavona mediante métodos cromatográficos y espectroscópicos UV-Visible en metanol y con reactivos de desplazamiento, además de taninos y esteroides; se encontró que inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y una inhibición parcial del crecimiento de *Escherichia coli*.

**Palabras clave:** *Calceolaria tripartita*, extractos etanólico y diclorometánico, actividad antiinflamatoria, *Calceolaria melissifolia*, flavonoides, actividad antimicrobiana.

#### SUMMARY

The studies of investigation were orientated to verify the antiinflammatory activity, attributed for the popular use, in the District of Huancayo's Pilcomayo Provincia, Department of Junín, of the species *Calceolaria tripartita* R and P. One worked with the air parts leafes of the plant belonging to the Kind *Calceolaria* and to the Family *Scrophulariaceae*. They were done extracciones constant by Soxhlet. There was realized a preliminary screening fitoquímico of the etanolic extract in which it was situated: alkaloids, catequins, steroids, triterpenoids, flavonoids, saponins and tannins. From equal form one came with the diclorometanic extract, being: essential oils, oily acid, cumarins, steroids and triterpenoids. The pharmacological activity was realized according to the method of the ear edema induced by oil of croton in mice. Evaluating the antiinflammatory activity of the etanolic extract and diclorometanic to a dose of 1 mg/ear, opposite to medicaments of known antiinflammatory activity since they are the dexametasona acetate and the indometacina, which were used to a dose of 0,1 mg/ear and 0,5 mg/ear respectively. Both extracts possess antiinflammatory

<sup>1</sup> Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara" Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. pbonillar@unmsm.edu.pe

activity, presenting major activity the etanolic extract. On the other hand on having realized the antimicrobial study of the watery extract of the *Calceolaria's melissifolia* Benth. Pseudoscabra (Edwin) Molau., air parts, proceeding from Celendín's province, Cajamarca's department, constituted for fenolic compounds type flavonoids of that three isolated and identified as 7,4'-di-O-alkyl-3,5,3'-trihydroxiflavonol; 5,7,4'-tri-O-alkyl-3', 5'-dihydroxiflavanone and 5,7,4'-trihydroxiflavone by means of chromatographic and spectroscopic methods UV-Visible in methanol and with reagents of displacement, in addition to tannins and steroids; one was that inhibits the growth of *Staphylococcus aureus* and a partial inhibition of the growth of *Escherichia coli*.

**Key words:** *Calceolaria tripartita*, extracts etanolic and diclorometanic, antiinflammatory activity, *Calceolaria melissifolia*, flavonoids, antimicrobial activity.

## INTRODUCCIÓN

El uso popular de la *Calceolaria tripartita* para dolores articulares fue lo que nos motivó a realizar el presente trabajo de investigación cuya finalidad es comprobar la actividad antiinflamatoria de esta especie. Se realizó el análisis fitoquímico así como un ensayo farmacológico de los extractos etanólico y diclorometánico utilizando el método del edema auricular inducido por aceite de croton en ratones, evaluando la capacidad para disminuir la inflamación en animales de experimentación comparando el grado de efectividad de los extractos frente a fármacos de conocida actividad antiinflamatoria<sup>1-9</sup>. En la especie *Calceolaria melissifolia* se trazó como objetivo el estudio antimicrobiano de extractos de esta planta que según el uso popular son de gran utilidad en enfermedades hepáticas y renales, en edemas cardíacos, infecciones bronquiales y de garganta, aftas y partiduras de labios, como purgante, etc.<sup>10-14</sup>.

La *Calceolaria tripartita* es una hierba anual rastrojera.

**Clasificación Taxonómica.** Según el sistema filogenético de Engler Prant modificado por Melchior en 1964, en la Universidad Agraria La Molina y certificado con el voucher respectivo, como: *Calceolaria tripartita* R & P, nombre popular: antoshjo, pampa zapatilla, ayac zapatillan, ñutu sapatillan; globito, zapatito, parchia chicuy

La especie *Calceolaria melissifolia*, procedente de la provincia de Celendín, Cajamarca, es un arbusto que crece de 0,5 a 2 m de alto, se recolectó, estabilizó, molió y de la revisión sobre su fitoquímica, se encontró que posee algunos metabolitos secundarios comunes, entre ellos, los flavonoides, se estudió el efecto antimicrobiano de extractos de esta planta de uso medicinal.

**Clasificación Taxonómica.** Como *Calceolaria melissifolia* Benth. subsp. Pseudoscabra (Edwin) Molau, nombre vulgar: "zapatito" o "globito"<sup>10-14</sup>.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material Botánico.** Se utilizaron tallos y hojas de *Calceolaria tripartita*, recolectadas en el distrito de Pilcomayo, Huancayo, Junín; y de *Calceolaria melissifolia*, procedente de Celendín, Cajamarca.

**Material de Laboratorio.** Equipos y Reactivos establecidos en el Esquema de Marcha Fitoquímica. Material de vidrio y de porcelana necesarios para las reacciones, Equipo Soxhlet, Baño María, Balanza analítica, Estufa de aire circulante.

**Material biológico.** Ratones albinos machos de tres meses de edad y con un peso entre 20 y 24 g sometidos a un mismo régimen dietético.

Bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*.

Bacterias Gram negativas: *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Klebsiella* sp.

**Preparación de la muestra.** La muestra recolectada fue secada a temperatura ambiente bajo sombra, molida, tamizada y almacenada en frascos de vidrio ámbar.

**Obtención de los extractos.** Se obtuvo el extracto etanólico y diclorometánico, de *Calceolaria tripartita* R & P, ambos por extracción continua en un equipo Soxhlet. A partir de 75 g del material seco y molido con 600 ml del respectivo solvente hasta agotamiento, se concentró a sequedad para realizar las reacciones de identificación así como los ensayos farmacológicos en animales de experimentación.

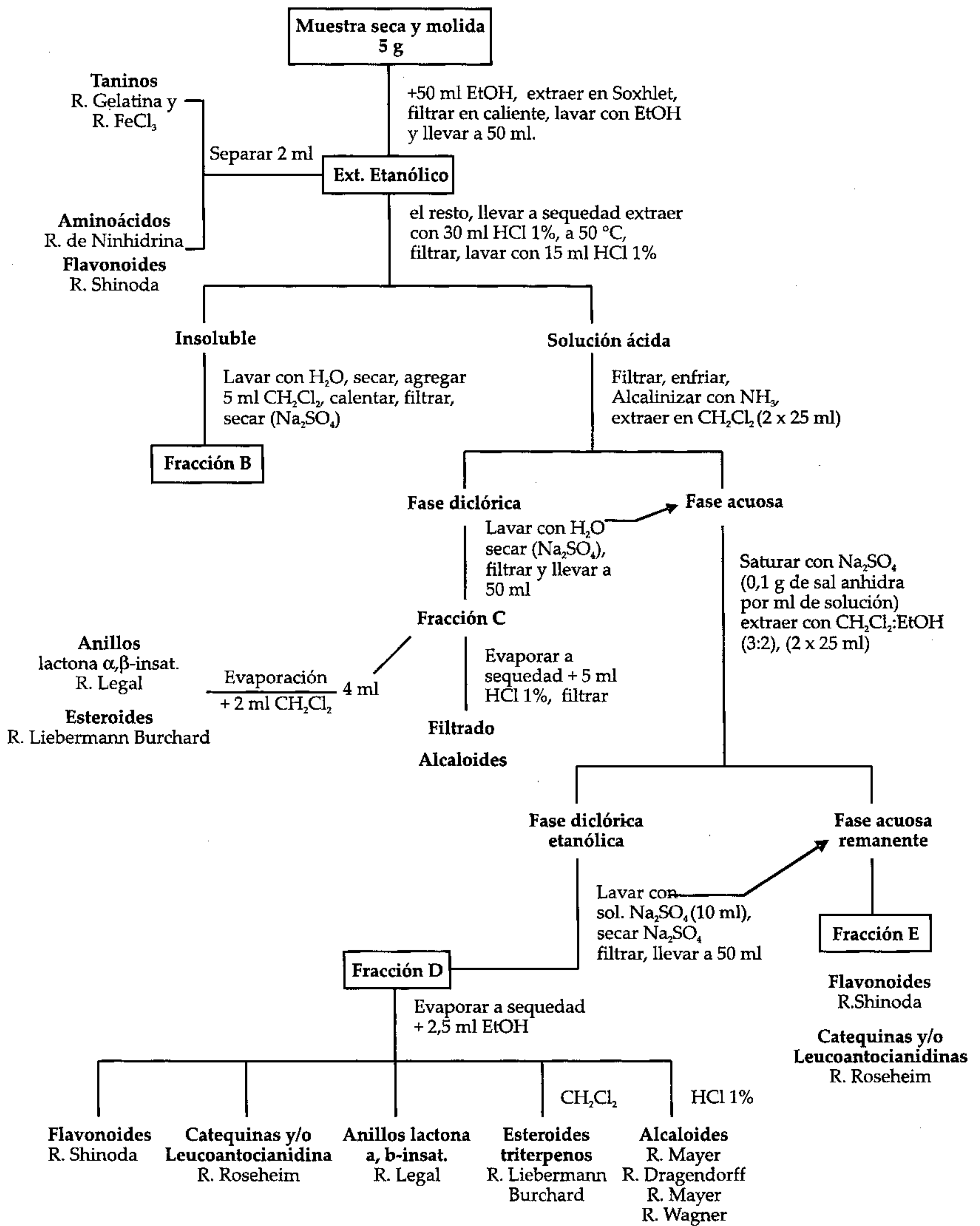


Figura 1. Screening Fitoquímico para el Extracto Etanólico



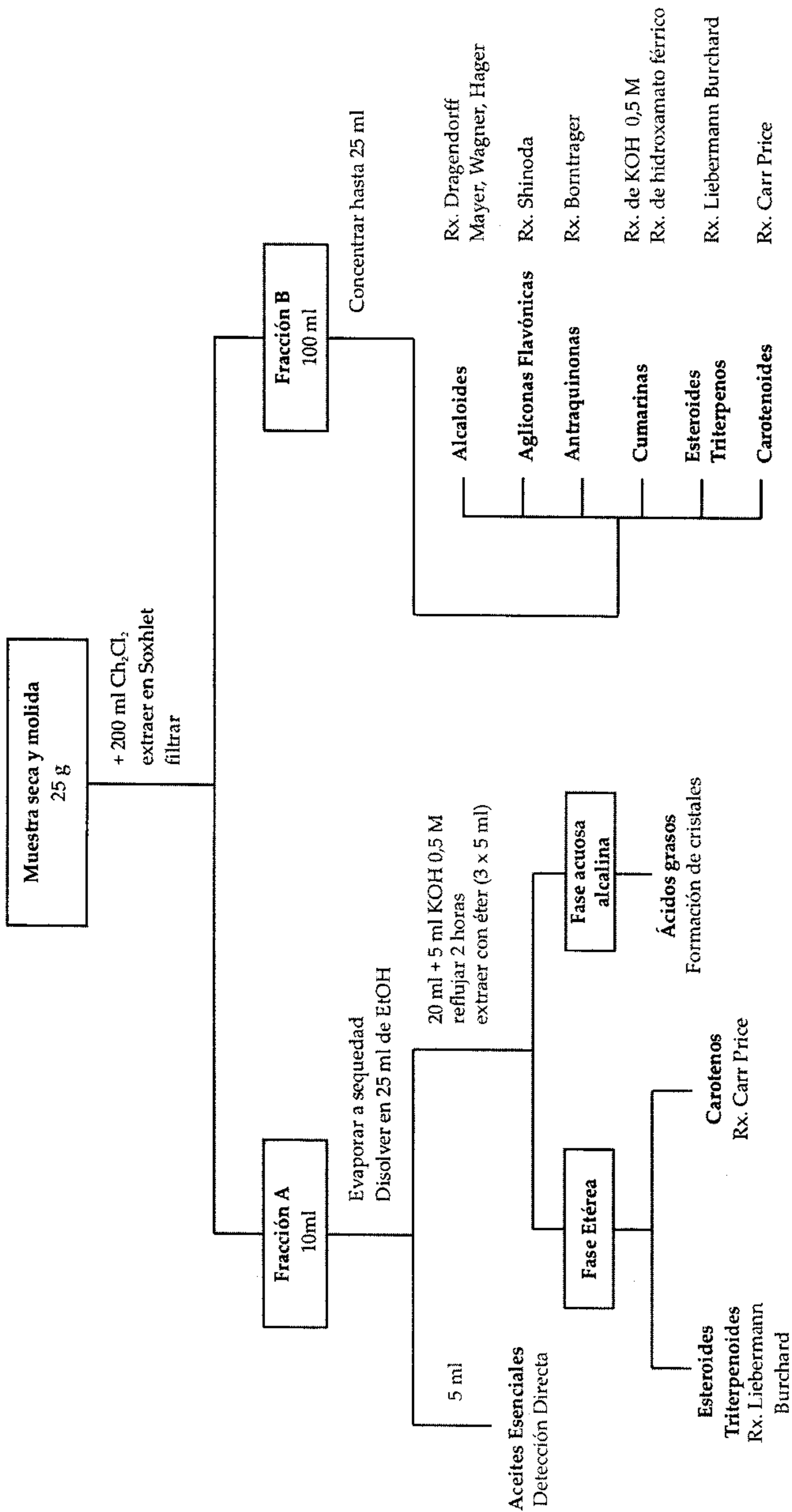


Figura 2. Screening Fitoquímico para el Extracto Diclorometánico<sup>15</sup>.

### Técnica de extracción de componentes de *Calceolaria melissifolia* Benth

Se realizaron extracciones hidroalcohólica y acuosa con 200 g de muestra seca y molida, luego se filtró y concentró hasta un extracto seco para las pruebas de reconocimiento y solubilidad.

**Aislamiento y Purificación.** Mediante ensayos cromatográficos, para lo cual se tomó en cuenta las pruebas de solubilidad, eligiéndose, de este modo los sistemas de solventes más adecuados. Cromatografía en capa fina unidimensional ascendente en cromatoplasmas de 5 cm x 10 cm y 20 cm x 20 cm. Fase fija Silicagel G 60, 0,25 mm y 0,50 mm de espesor. Muestra: Extracto etanólico. Fase móvil o Sistema de solventes: Benceno:Acetato de etilo: Acetona (3:1,2:1,2) v/v. Tiempo de desarrollo: Aprox. 1.5 horas. Reveladores Luz UV de 365 y 254 nm, Vapores de amoníaco, Potasa alcohólica al 1%, Acido sulfúrico 50%, Solución de tricloruro férrico 10%.

### Pruebas para la identificación de Grupos Funcionales y Metabolitos Secundarios

**Aceites Esenciales.** Por Detección Directa; **Alcaloides:** Reactivo de Dragendorff, Reactivo de Mayer, Reactivo de Wagner, Reactivo de Hager; **Carotenoides:** Reacción de Carr Price; **Cardenólidos:** Reacción de Legal. **Cumarinas:** Reacción de Hidróxido de Potasio 0,5 M. Rx. de hidroxamato férrico. **Esteroides y/o Terpenoides:** Reacción de Lieberman-Burchard.

**Flavonoides.** Reacción de Shinoda. **Grupos Aminos Primarios y Secundarios:** Reacción de Ninhidrina. **Leucoantocianidinas y Catequinas:** Reacción de Rosenheim. **Quinonas:** Reacción de Borntrager. **Saponinas:** Prueba de la Espuma. **Taninos:** Reacción de Gelatina. Reacción de Cloruro Férrico<sup>15-17</sup>.

### Estudio Farmacológico de *Calceolaria tripartita* R & P.

En los extractos diclorometánico y etanólico de *Calceolaria tripartita* R & P se evaluó la actividad antiinflamatoria en ratones albinos de 20 – 24 g de peso, procediéndose previamente a la estandarización de las condiciones ambientales y de alimentación durante 20 días. La alimentación fue a base de requerimientos vitamínicos necesarios para su mantenimiento.

**Edema Auricular por Aceite de Croton.** Se fundamenta en la irritación local tóxica provocada por un agente flogístico –aceite de croton– que será inhibida por una respuesta antiinflamatoria.

Se usaron ratones albinos machos de 20 – 24 g de peso, se les privó de alimento 12 horas antes del ensayo con libre acceso al H<sub>2</sub>O. Se formaron 5 grupos de seis ratones por grupo, cada ratón recibió 200 µg de aceite de croton<sup>23</sup> disuelto en 20 µl de acetona, se le aplicó en la superficie interior de la oreja derecha del ratón, igual volumen de solvente se aplica a la oreja izquierda.

Los animales del grupo control recibieron solamente la aplicación del agente irritante y el vehículo. Los del grupo tratado recibieron los extractos etanólico y diclorometánico en una dosis de 1 mg disueltos en 20 µl de acetona inmediatamente después de haberle producido el edema. Los ratones del grupo standard fueron tratados con dexametasona acetato a una dosis de 0,1 mg/oreja<sup>(24)</sup> disueltos en 20 µl de acetona, y con indometacina a una dosis de 0,5 mg/oreja<sup>22,23</sup> disueltos en 20 µl de acetona. Cuatro horas después los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y un sector de cada oreja fue tomado usando un sacabocados de 8 mm de diámetro. El edema fue calculado por la medida diferencial del peso de la oreja izquierda no tratada y de la oreja derecha tratada. El edema fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{Ec - Et}{Ec} \times 100$$

Ec = Edema medio del grupo control ; Et = Edema medio del grupo tratado<sup>22-28</sup>.

**Estudio Antimicrobiano de *Calceolaria melissifolia* Benth subsp. Pseudoscabra** (Edwin) Molau. Se estudió el extracto acuoso de la *Calceolaria melissifolia* empleándose el método Turbidimétrico, usando como medio de cultivo Caldo Triptica-sa Soya (TSB), frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, las cuales presentaron patrones de resistencia frente a antimicrobianos<sup>11-13</sup>.

### RESULTADOS

Identificación de los constituyentes químicos del extracto diclorometánico de hojas y tallos de *Calceolaria tripartita*. Se identificaron aceites esencia-

les, ácidos grasos, cumarinas, esteroides y/o triterpenoides.

Identificación de los constituyentes químicos del extracto etanólico de hojas y tallos de *Calceolaria tripartita*. Se identificó alcaloides, esteroides y/o triterpenoides, compuestos fenólicos como taninos, flavonoides, catequinas, además de saponinas.

Identificación de los constituyentes químicos del extracto acuoso de hojas y tallos de *Calceolaria melissifolia*. Se encontró compuestos fenólicos como taninos, flavonoides, además de esteroides y/o triterpenoides y saponinas. Mediante cromatografía en capa delgada a escala preparativa del extracto acuoso de hojas y tallos de *Calceolaria melissifolia* se obtuvieron tres fracciones a las que denominamos 1, 2 y 3 que dieron reacción positiva para flavonoides, mostrando la fracción 3 mayor concentración (Tabla 1).

**Tabla 1.** Fracciones del extracto acuoso de hojas y tallos de *Calceolaria melissifolia*.

Reactivos	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3
Shinoda	++	+	+++
KOH/EtOH	++	+	+++
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	++	+	+++
FeCl <sub>3</sub>	++	+	+++

Por cromatografía en capa delgada a escala preparativa de la fracción 3 se obtuvieron varias bandas mediante diversos reveladores, de las cuales se aislaron tres denominándoseles fracciones 3.1, 3.2 y 3.3 respectivamente, las que resultaron positivas frente a las reacciones de Shinoda, tricloruro de hierro, ácido sulfúrico al 50% y a la luz UV 365, 254 nm, luego fueron elucidadas mediante espectroscopia UV-Visible en metanol y con reactivos de desplazamiento químico (21), cuyos resultados se muestran en los cuadros 2-4.

**Tabla 2.** Espectroscopia UV  $\lambda$  de la fracción 3.1 de *Calceolaria melissifolia*.

Reactivos	$\lambda$ Máx. nm
MeOH	286, 324
MeONa	288, 334, 362
Al Cl <sub>3</sub>	294, 306, 376
AlCl <sub>3</sub> /HCl	308, 378
AcONa	286, 324

**Tabla 3.** Espectroscopia UV  $\lambda$  de la fracción 3.2 de *Calceolaria melissifolia*.

Reactivos	$\lambda$ Máx. nm
MeOH	284, 330
MeONa	290, 332, 364
Al Cl <sub>3</sub>	282, 312
AlCl <sub>3</sub> /HCl	282, 312
AcONa	284, 330

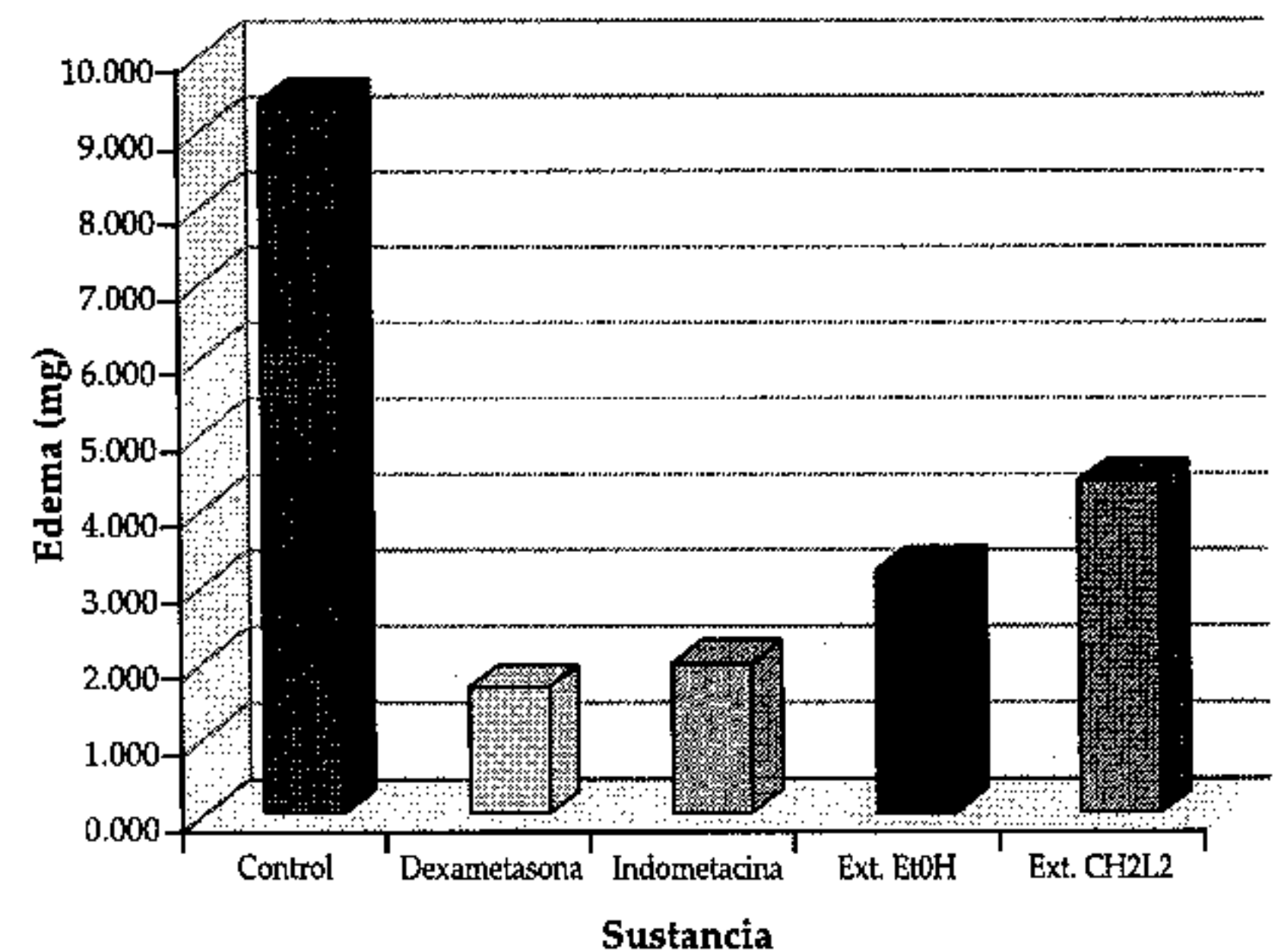
**Tabla 4.** Espectroscopia UV  $\lambda$  de la fracción 3.3 de *Calceolaria melissifolia*.

Reactivos	$\lambda$ Máx. nm
MeOH	266, 284, 318, 342
MeONa	276, 310, 324, 394
Al Cl <sub>3</sub>	274, 302, 342, 384
AlCl <sub>3</sub> /HCl	276, 302, 340, 394
AcONa	276, 304, 378

**Tabla 5.** Efecto de la aplicación de los extractos de *Calceolaria tripartita* R & P. modelo del edema auricular inducido por aceite de croton

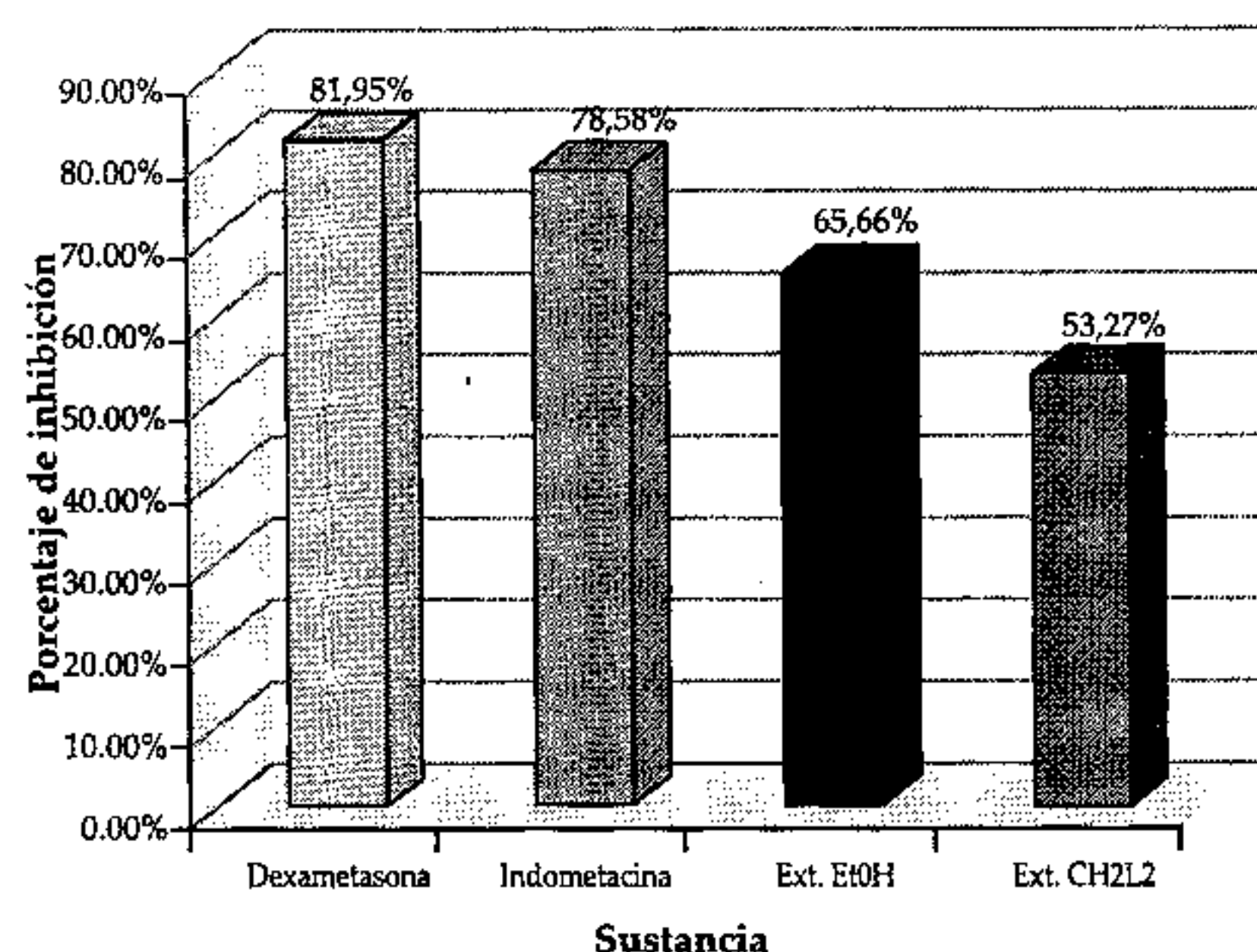
Sustancia	Dosis (mg)	Edema (mg) Media E.S.M.	Desviación Estándar	% de Inhibición
Control	0.1	9,4167 ± 0,5671	1,3891	-
Dexametasona	0.5	1,7000 ± 0,1915*	0,4690	81,95
Indometacina	1.0	2,0167 ± 0,3736*	0,9152	78,58
Ext. EtOH	1.0	3,2333 ± 0,1282*	0,3141	65,66
Ext. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	α	4,4000 ± 0,3540*	0,8672	53,27

α El grupo control sólo recibió aceite de croton y acetona. Estas dos sustancias también fueron aplicadas a los demás grupos. \* p < 0, 05 comparando con el grupo control según el Test de Tukey H.S.D. Número de animales por grupo = 6



**Figura 1.** Modelo del edema auricular inducido por aceite de croton de los extractos de *Calceolaria tripartita*. Dosis utilizadas: aceite de croton 200  $\mu$ g/oreja, dexametasona acetato 0.1 mg/oreja, Indometacina 0.5 mg/oreja, ext. EtOH 1 mg/oreja, ext. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1 mg/oreja.





**Figura 2.** Efecto antiinflamatorio de los extractos de *Calceolaria tripartita* en el modelo de edema auricular inducido por aceite de croton. Dosis utilizadas: dexametasona acetato 0.1 mg/oreja, Indometacina 0.5 mg/oreja, ext. EtOH 1 mg/oreja, ext. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1 mg/oreja.

**Tabla 6.** Crecimiento de bacterias frente al extracto acuoso de *Calceolaria melissifolia* Bentham subsp pseudocabra (Edwin) Molau.

Concentración bacterias	166,67 µg/ml	277,78 µg/ml	500,00 µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	+/-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+
<i>Klebsiella sp.</i>	+	+	+
<i>Proteus sp.</i>	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+/-	+/-	+/-

(+) Crecimiento; (+/-) Inhibición parcial; (-) Inhibición

## DISCUSIÓN

Utilizamos el método de extracción Soxhlet considerando la forma de aplicación popular de esta planta como antiinflamatorio y porque presenta ventajas en comparación con otros métodos de extracción; teniendo presente que por este método se obtienen sólo compuestos termoestables. Mediante la marcha fitoquímica preliminar se identificaron los constituyentes químicos del extracto diclorometánico de hojas y tallos de *Calceolaria tripartita*, como aceites esenciales, ácidos grasos, cumarinas, esteroides y/o triterpenoides; y los constituyentes químicos del extracto etanólico de hojas y tallos de *Calceolaria tripartita*; como alcaloides, esteroides y/o triterpenoides, taninos, flavonoides, catequinas, saponinas.

Los constituyentes químicos del extracto acuoso de hojas y tallos de *Calceolaria melissifolia*, como taninos, flavonoides, esteroides y/o triterpenoides,

saponinas. A continuación mediante cromatografía en capa delgada a escala preparativa se obtuvieron del extracto acuoso de *Calceolaria melissifolia* tres fracciones a las que denominamos 1, 2 y 3, que dieron reacción positiva para flavonoides, mostrando la fracción 3 mayor concentración (tabla 1)<sup>15-21</sup>. El sistema de solventes cloroformo: metanol (19:1) v/v resultó ser el más adecuado porque permite apreciar el mayor número de componentes con resolución óptima, de la que mediante cromatografía a escala preparativa de la fracción 3 se aislaron tres denominándoseles fracciones 3.1, 3.2 y 3.3 respectivamente, las que resultaron positivas frente a las reacciones de Shinoda, triclóruo de fierro, ácido sulfúrico al 50% y a la luz UV 365, 254 nm, las que fueron elucidadas mediante espectroscopia UV-Visible en metanol y con reactivos de desplazamiento químico<sup>19-21</sup>, cuyos resultados se muestran en los cuadros 2- 4, según Mabry<sup>21</sup>.

La fracción 3.1 a la luz UV da una fluorescencia azul verdosa y con amoníaco se intensifica, lo que inicialmente hace pensar que podría tratarse de flavanona carente de 5-OH libre o flavanoles con 3-OH libre y con o sin 5-OH libre<sup>21</sup>.

El espectro metanólico de esta fracción muestra picos de absorción en la banda I (324 nm) presentando una semejanza con el de taxifolina (flavonol) cuyas longitudes de onda máximas se encuentran a 290 y 327 nm, esto da información más concreta quedando la posibilidad que sea isoflavona o flavonol (dihydroflavonol), descartándose que sea una isoflavona dado que el color frente a la reacción de Shinoda es amarillo<sup>15</sup> lo que no es observado en esta fracción. Con los reactivos de desplazamiento: al añadir MeONa se observa un desplazamiento batocrómico en la banda I lo que confirma la presencia de grupos OH libres posiblemente en las posiciones 3, 3', 4', caso que es observado en la banda II como un ligero cambio batocrómico que podría deberse a la formación de un puente de hidrógeno entre los grupos 4-carbonilo y 5-OH libre además de indicar la ausencia de grupos OH libres en otras posiciones del anillo o a su posible sustitución. La adición de AlCl<sub>3</sub> ocasiona un desplazamiento batocrómico tanto en la banda II como en la banda I lo que manifiesta formación de complejos estables entre grupos hidroxil-cetona vecinos siendo las posibilidades 5-OH con 4-carbonilo y 3-OH con 4-carbonilo además de la formación de complejos inestables por la posible presencia de grupos o-dihidroxilo libres en el anillo B. El HCl adicionado, mantiene el espectro obtenido con AlCl<sub>3</sub> lo cual confirma que el efecto batocrómico de las bandas se debe a los grupos hidroxil-cetona

vecinos y no a grupos o-dihidroxiolo libres porque el gran efecto batocrómico logrado con el  $\text{AlCl}_3$  se mantiene pero debido a que los valores obtenidos con MeONa manifiestan cambios en la banda I no se puede descartar la presencia de grupos OH libres en el anillo B por tanto se puede pensar en la presencia de estos grupos en posiciones 3' y 4' estando uno de ellos sustituido, siendo más común la sustitución de 4'-OH.

El espectro metanólico no es alterado por la adición de AcONa lo que descarta que los grupos 7-OH y 4'-OH estén libres. Teniendo en cuenta la biogénesis de los compuestos flavónicos, los principales sustituyentes son grupos alquilo (Metilo) y/o azúcares, descartándose que el flavonoide esté glicosidado debido al  $r_f$  determinado en la cromatografía en capa fina, cuya mezcla de solventes da buenos resultados con agliconas no polares (28, 40) Por lo expuesto se plantea como el flavonoide: 7, 4'-di-O-alquil-3, 5, 3'-trihidroxi-flavanonol o 7, 4'-di-O-alquil-taxifolina<sup>15-21</sup>.

La fracción 3.2 a la luz UV presenta fluorescencia amarillo-verdosa manifestándose una intensificación de la fluorescencia en  $\text{NH}_3/\text{UV}$  esto hace pensar que podría tratarse de: aurona carente de 4'-OH libre, flavanona carente de 5-OH libre, flavonol con 3-OH libre y con o sin 5-OH libre<sup>24</sup>. Con la reacción de Shinoda se manifiesta una coloración rojiza, lo cual descarta la posibilidad de que sea una aurona porque ésta no da positivo a dicha reacción.

El espectro metanólico muestra picos de absorción en las bandas I (284 nm) y II (330 nm) que nos brinda información sobre el tipo de flavonoide por ello se presume que podría tratarse de: flavonol o isoflavona, el espectro metanólico de esta fracción es muy parecido al de la fracción 3.1 por ello se supone que podría ser del mismo tipo flavónico (dihidroflavonol, flavanona). Con los reactivos de desplazamiento: La adición del MeONa produce un desplazamiento batocrómico de la banda I esto permite especular la presencia de grupos OH-libres en las posiciones 3, 3'', 4', la banda II no sufre modificaciones lo que indica la posible sustitución de OH libres o que están ausentes en el anillo A. Con  $\text{AlCl}_3$  no se observan cambios significativos en la banda II que manifiestan la ausencia de grupos hidroxil-cetona vecinos o que el grupo 5-OH esté sustituido, lo mismo sucede en la banda I; por ello deducimos la ausencia del grupo 3-OH libre, posible sustitución del grupo o-dihidroxiolo o uno de ellos esté sustituido (3', 4'') se puede observar, ade-

más, un cambio hipsocrómico en la banda I que es causado cuando hay grupos OH libres en el anillo B en posición meta (3', 5') descartándose la posibilidad que 4' esté libre y que el sustituyente sea un glicósido por su comportamiento poco polar. El HCl no produce cambio en las bandas obtenidas con  $\text{AlCl}_3$  que confirma la ausencia de grupos hidroxil-cetona vecinos y o-dihidroxiolo libres por lo que se supone, algunos de ellos, estén sustituidos. El AcONa no altera el espectro metanólico descartándose la existencia de grupos OH libres en las posiciones 7 y 4' lo que es común dada la biogénesis de esos compuestos. Se plantea el siguiente compuesto: 5, 7, 4'-tri-O-alquil-3'', 5' dihidroxi-flavanona<sup>15-21</sup>.

La fracción 3.3 a la luz UV presenta una coloración púrpura que cambia a púrpura verdoso en presencia de amoníaco, esto indica que podría tratarse de: flavonas o flavonoles 3-OH sustituido con 5-OH libre pero sin 4'-OH libre, 6 u 8 -OH flavona y 3-O sustituidos flavonoles con 5-OH. Isoflavonas, dihidroflavonoles y flavanonas con 5-OH (28, 39). El espectro metanólico muestra picos de absorción en las bandas I (266, 284 nm) y II (318, 341 nm) lo que indica que podría tratarse de: flavona, con los reactivos de desplazamiento. La adición de MeONa produce efectos batocrómicos en ambas bandas lo que hace suponer la presencia de OH libres principalmente en posiciones 5, 7, 3' y 4' por ser las más comunes. El  $\text{AlCl}_3$  produce efecto batocrómico en la banda II, que refiere la presencia de grupos hidroxil-cetona vecinos y O-dihidroxiolo libres en el anillo A; en la banda I no se observan cambios, lo cual refuerza que se trata de una flavona (por carecer de grupo 3-OH) y la ausencia de grupos o-dihidroxiolo libres o en su defecto uno de ellos esté sustituido. El HCl adicionado descarta la presencia de grupos o-dihidroxiolo libres en el anillo A, quedando solo la posibilidad que el grupo 5-OH esté libre con el que se forma el complejo estable que no es destruido por el HCl, no hay modificaciones en la banda I confirmándose la ausencia de los grupos 3-OH y o-dihidroxiolo libres; se observa también un pico a 394 nm que puede deberse a la ionización del grupo 4'-OH caso que igualmente sucede con la adición del MeONa. En presencia de AcONa se observa efectos batocrómicos en las bandas I y II lo que confirma la presencia de grupos 7, 4'-OH libres. Correspondería a la estructura de la apigenina<sup>15-21</sup>.

Los extractos de *Calceolaria tripartita* fueron sometidos al ensayo del edema auricular en ratones en razón al uso externo que se le da en la medicina



popular. El edema auricular inducido por aceite de croton en ratones es uno de los ensayos comúnmente usados para evaluar la actividad antiinflamatoria por vía tópica, pues tiene las siguientes ventajas: la respuesta es local, comprometiendo la piel de la oreja, así el modelo *in situ* evita el metabolismo y excreción de la droga; además utiliza cantidades muy pequeñas de la misma<sup>24,30</sup>. El aceite de croton actúa como un irritante vascular (dérmico) con infiltración de leucocitos polimorfonucleares y edema intercelular<sup>24,30</sup>. En el Modelo del edema auricular por aceite de croton, utilizado, ambos extractos reducen significativamente el edema inducido por aceite de croton ( $p < 0,05$ ) cuando son aplicados tópicamente a una dosis de 1 mg por oreja. Los dos extractos son menos potentes que las drogas usadas como referencia, pero el extracto etanólico no presenta una diferencia significativa con respecto a la Indometacina (0,5 mg/oreja), lo que sí ocurre con la droga esteroidea (Acetato de Dexametasona) usada a una dosis de 0,1 mg por oreja. Resultó con mayor actividad antiinflamatoria el extracto etanólico lo cual dá validez al uso popular de esta especie contra los dolores articulares<sup>22,28</sup>.

El extracto acuoso de *Calceolaria melissifolia* Benth subsp. *Pseudoscabra* (Edwin) Molau ejerce según el cuadro 6 una inhibición parcial de crecimiento bacteriano a la concentración de 166, 67  $\mu\text{g/ml}$  e y una inhibición a 277, 78 y 500  $\mu\text{g/ml}$  frente a *Staphylococcus aureus* resistente a gentamicina y Acido nalidixico. No muestra actividad antimicrobiana frente a Gram negativos ni frente a *Bacillus cereus* aunque se puede reportar una inhibición parcial de *Escherichia coli* resistente a kanamicina, neomicina, amoxicilina, cefalexina, nitrofurantoina, sulfametoxazol- trimetoprim a las concentraciones de 166, 67, 277, 78 y 500  $\mu\text{g/ml}$ <sup>11,13</sup>.

Se ha comprobado que *Calceolaria tripartita* R & P: tiene actividad antiinflamatoria significativa. El extracto etanólico de *Calceolaria tripartita* R & P contiene alcaloides, catequinas, esteroides y/o triterpenos, flavonoides, saponinas y taninos. El screening fitoquímico de extracto acuoso y alcohólico de *Calceolaria melissifolia* Benth subsp. *Pseudoscabra* (Edwin) Molau dio positivo para flavonoides, esteroides, taninos y saponinas. Los flavonoides aislados a partir de la fracción etanólica 3 serían: Fracción 3.1: 7, 4'-di-O-alquil-3, 5, 3'-trihidroxi-flavanonol o 7, 4'-di-O-alquil-taxifolina. Fracción 3.2: 5, 7, 4'-tri-O-alquil-3', 5'-dihydroxiflavanona. Fracción 3.3; 5, 7, 4'-trihydroxiflavona o apigenina. El extracto acuoso de *Calceolaria melissifolia* inhibe

el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y produce una inhibición parcial del crecimiento de *Escherichia coli*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Mayhuasca O, Vargas V.** *Estudio experimental del efecto antiinflamatorio de la Calceolaria tripartita*. Tesis de Q.F. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica. 2001.
2. **Garbarino J, Chamy M, Piovano M.** *Diterpenos de Scrophulariaceae. Química de la Flora de Chile*; Universidad de Chile, 1992.
3. **Molau U.** *Flora Neotropica Monografía 47, Scrophulariaceae Part. I Calceolaria*; publicado para la Organización para la Flora Neotrópica por The New York Botanical Garden, Julio 1988.
4. **Soukup Jaroslav.** *Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana S.D.B.* Editorial Salesiana, 1987.
5. **Goodman Gilman.** *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, 9a edición, Editorial Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A. de C.V. México, 1996.
6. **Litter M.** *Compendio de Farmacología*, 4ta edición, Editorial El Ateneo, Argentina, 1994.
7. **Salomón P.** *Estudio Fitoquímico y Farmacológico de Calceolaria deflexa*, Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico, UNMSM, Medicina Humana, 1967.
8. **Arellano P.** *Farmacognosia de la C. deflexa R & P*; Tesis Doctoral en Medicina Humana, UNMSM, 1971.
9. **Arellano Jiménez P.** *El libro verde. Guía de recursos terapéuticos vegetales*. Ministerio de Salud. 1992.
10. **Arellan M, Hinostroza.** *Determinación de la actividad diurética de Calceolaria melissifolia*, Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico, UNMSM, 1994.
11. **Ballón M, Ferreyra M.** *Aislamiento e identificación de flavonoides de Calceolaria melissifolia, avances en su estudio antimicrobiano*. Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico, UNMSM, 1995.
12. **Ramírez D, Salazar S.** *Estudio Fitoquímico y Microbiológico de cinco especies del género Calceolaria*, Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico, UNMSM, 1995.

13. **Castro Aguilar G, Lerna Martínez N.** *Determinación de la actividad antimicrobiana de plantas medicinales de Huancayo y Huarochirí.* Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. 1993.
14. **Molau U, Sánchez I.** *Calceolaria (Scrophulariaceae) Las especies del Dpto. de Cajamarca, Perú,* Universidad Nacional Agraria La Molina (Biblioteca Agrícola), Enero 1986.
15. **Lock O.** *Investigación Fitoquímica,* 2a. Edición, Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial, Lima – Perú, 1994.
16. **Domínguez X.** *Métodos en la Investigación Fitoquímica;* Primera Edición; Editorial Limusa. México DF. 1993.
17. **Fort D.** *Marcha Fitoquímica y Reacciones de Coloración;* Tesis para optar al Título de Licenciado en Química; PUCP, Lima, 1992.
18. **Geissman TA, Crout DHG.** *Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism,* Freeman, Cooper Company. 1969.
19. **Harborne J B.** *Phytochemical Methods. A guide to Modern Techniques of Plant Analysis.* London Chapman and Hall. 1973.
20. **Harborne J B.** *The flavonoids. Advances in research since 1986-1994.* Primera Edición. 1994.
21. **Mabry TJ, Markhan, Thomas M B.** *The Systematic identification of flavonoids.* Springer Verlag New York.1970.
22. **Germano D, Caldeira T, Mazella A, Sertie J.** *Topical anti-inflammatory activity and toxicity of *Petiveria alliacea*;* Fitoterapia 1993; LXIV(5).
23. **Pinzon R. et al.** *Manual de Técnicas de Investigación,* CYTED – Subprograma X – Química Fito-farmacéutica; 1995.
24. **Recio M C. et al.** *Investigations on the steroidal Anti-Inflammatory Activity of Triterpenoids from *Diospyros leucomelas*;* Planta Médica 61, 9-12; 1995.
25. **Onwukaeme N.** *Anti-inflammatory activities of flavonoids of *Baphia nitida* Lood. (Leguminosae) on mice and rats;* Journal of Ethnopharmacology 46, 121-124; 1995.
26. **Alva H, Vargas M.** *Determinación de la Actividad Antiinflamatoria de los extractos de las hojas de *Plantago major* L. "llantén";* Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico, UNSLG, 1994.
27. **Carrillo J.** *Determinación de la Actividad Antiinflamatoria y Antiespasmódica del *Piper arboreum*;* Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico, UNSLG, 1997.
28. **Patahack K, Singla A.** *"Flavonoids as medicinal agents. Recent advances.* Fitoterapia Vol. LXII, N° 5. 1991.