

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Actividad antioxidante y antitusígena del extracto  
hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* L.  
Brown "siete pisos". Ayacucho - 2014.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR:

**Bach. ÑAHUI CORAS, Roy Ronald**

AYACUCHO – PERÚ

2015

Acta de Sustentación de Tesis

R.D.Nº 256-FC de la S-UNSCH-2015

Bach. Roy Ronald ÑAHUI CORAS


En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde de día jueves diecisiete de diciembre del año dos mil quince en el auditorio de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, reunidos los docentes bajo la presidencia (e) del Mg José Manuel Diez Macavilca, quien además es miembro y con la asistencia del Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo, Edwin Carlos Enciso Roca (Asesor) y magister Maricela López Sierralta, quien además actuará como secretaria docente; para recepcionar la sustentación de tesis: Actividad antioxidante y antitumorigénica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* "siete pisos". Ayacucho 2014, presentado por el bachiller Sr. Roy Ronald ÑAHUI CORAS, quien pretende optar el título de Farmacia y Bioquímica.

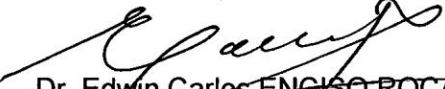
El presidente inicia el acto de sustentación solicitando a la secretaria (e) dar lectura a la Resolución Decanal Nº 256-FC de la S-UNSCH-2015 para que inicien la sustentación cediendo al sustentante el tiempo correspondiente.

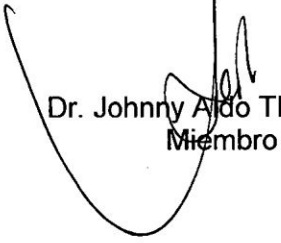
Culminada la exposición el jurado calificador procede a realizar las observaciones y preguntas que crea conveniente. Luego el presidente solicita al sustentante y público en general para que abandone el auditorio y el jurado calificador pueda deliberar y proceder a evaluar:

JURADOS	TEXTO	EXPOSICIÓN	RESPUESTAS	PROM
Mg José Manuel Diez Macavilca	17	17	17	17
Dr Edwin Carlos Enciso Roca	17	17	17	17
Dr Johnny Aldo Tinco Jayo	17	18	17	17
Mg Maricela López Sierralta	16	18	17	17
PROMEDIO TOTAL:				17

De la evaluación realizada el sustentado obtiene la nota promedio de diecisiete (17), de lo cual dan fé los miembros del jurado calificador, estampando su firma al pie de la presente. Culmina el acto de sustentación siendo las seis de la noche.

  
Mg. José Manuel DIEZ MACAVILCA  
Presidente (e)-miembro

  
Dr. Edwin Carlos ENCISO ROCA  
Miembro-Asesor

  
Dr. Johnny Aldo TINCO JAYO  
Miembro

  
Mg. Maricela LÓPEZ SIERRALTA  
Miembro-Secretaria -Docente (e)

*A mis padres Sergio y Juana por su apoyo incondicional que me brindan en todo momento y a mi esposa y mis dos hijas que son la razón de mi ser.*

## AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, en especial a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica y a los docentes que compartieron sus experiencias y conocimientos en mi formación profesional.

A mi asesor Dr. Q.F. Edwin C. ENCISO ROCA, por todo el apoyo incansable que me brindó hasta la culminación de este trabajo de investigación.

A mis compañeros que contribuyeron con su valioso apoyo desinteresado.



## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Antecedentes	3
2.2 <i>Leonotis nepetifolia</i>	5
2.2.1 Identificación taxonómica	5
2.2.2 Descripción botánica	5
2.2.3 Farmacobotánica	6
2.2.4 Estudio farmacológico	6
2.3 Radicales libres	7
2.4 Estrés oxidativo.	8
2.5 Antioxidantes	8
2.6 Compuestos fenólicos	9
2.7 Sistema de protección antioxidante	12
2.8 La tos	12
2.8.1 Reflejo tusígeno	12
2.8.2 Mecanismo de la tos	13
2.9 Antitusivos y su clasificación	13
2.10 Codeína	14
III. MATERIALES Y METODOS	17
3.1 Lugar de ejecución	17
3.2 Población y muestra.	17
3.3 Métodos para la recolección de datos	17
3.4 Análisis estadístico	21
IV. RESULTADOS	22
V. DISCUSIÓN	26
VI. CONCLUSIONES	32
VII. RECOMENDACIONES	33
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS	39

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1</b> Según el sistema de clasificación de Cronquist A. 1988,	5
<b>Tabla 2</b> Diseño experimental de la actividad antitusígena de las hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) Brown	20
<b>Tabla 3</b> Diseño experimental de la actividad antioxidante de las hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) Brown.	20
<b>Tabla 4</b> Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) Brown "siete pisos", Ayacucho – 2015	23
<b>Tabla 5</b> Análisis de varianza del porcentaje de la actividad secuestradora del DPPH por parte de los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) Brown "siete pisos", Ayacucho - 2015	45
<b>Tabla 6</b> Comparación de medias mediante la prueba de tukey la actividad antioxidante del ácido ascórbico y de los tratamientos administrados del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) Brown "siete pisos", Ayacucho – 2015	46
<b>Tabla 7</b> Comparación de medias mediante la prueba de Dunnet de la actividad antitusígena de codeína fosfato y de los tratamientos administrados del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) Brown "siete pisos", Ayacucho - 2015	47
<b>Tabla 8</b> Comparación de medias mediante la prueba de Duncan de la actividad antitusígena de los tratamientos administrados del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) Brown "siete pisos", Ayacucho - 2015	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1</b> Sitios de acción de los antitusígenos	14
<b>Figura 2</b> Estructura química de la codeína	15
<b>Figura 3</b> Variación de porcentaje de actividad antioxidante por efecto de ácido ascórbico y el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) Brown “siete pisos”, Ayacucho – 2015	24
<b>Figura 4</b> Variación de porcentaje de actividad antitusígena por efecto de la administración de la codeína y el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) Brown “siete pisos” en cobayos, Ayacucho – 2015	25

## ÍNDICES DE ANEXOS

	Página
<b>Anexo 1</b> Certificado taxonómico de <i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) Brown.	40
<b>Anexo 2</b> Descripción botánica de <i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) Brown.	41
<b>Anexo 3</b> Esquema de las reacciones a realizarse en el extracto hidroalcohólico.	42
<b>Anexo 4</b> Fotos de <i>leonotis nepetifolia</i> (L.) Brown	43
<b>Anexo 5</b> Pesado de cobayos.	44
<b>Anexo 6</b> Observacion de número toses.	45
<b>Anexo 7</b> Análisis de varianza del porcentaje de la actividad secuestradora del DPPH porparte de los metabolitos secundarios del extracto hidroalcoholico de las hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> L. Brown "siete pisos".	46
<b>Anexo 8</b> Comparación de medias mediante la prueba de Tukey la actividad antioxidante del ácido ascórbico y de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) Brown "siete pisos", Ayacucho – 2015.	47
<b>Anexo 9</b> Comparación de medias mediante la prueba de Dunnet de la actividad antitusígena de codeína fosfato y de los tratamientos administrados del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) Brown "siete pisos", Ayacucho – 2015.	48
<b>Anexo 10</b> Comparación de medias mediante la prueba de Duncan de la actividad antitusígena de los tratamientos administrados del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) Brown "siete pisos", Ayacucho – 2015.	49
<b>Anexo 11</b> Matriz de consistencia.	50

## RESUMEN

La contaminación y la mala alimentación son una de las causas que desencadenan problemas hepáticos y bronquiales. El objetivo principal de este trabajo de investigación fue determinar la actividad antioxidante y antitusígena del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown "Siete pisos", se desarrolló en el laboratorio del área de Farmacia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga en la ciudad de Ayacucho. El tipo de investigación realizado fue básico experimental. La muestra fue recolectada en los jardines de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, región Ayacucho. Para evaluar la actividad antioxidante y antitusígena, se realizó el tamizaje fitoquímico siguiendo los protocolos establecidos por Lock de Ugaz y Miranda Cuellar. La actividad antioxidante, se evaluó por la captación del radical DPPH usando como patrón de referencia ácido ascórbico. Se determinó la presencia de los metabolitos secundarios tales como: flavonoides, taninos y/o fenoles, alcaloides, quinonas, triterpenos-esteroides, catequinas, saponinas. Para la determinación de la actividad antitusígena se ha empleado el modelo in vivo, en Cobayos machos, divididos en 5 grupos, donde se administró como: blanco (solución salina fisiológica), fármaco de referencia (codeína fosfato) y los extractos hidroalcohólicos a una dosis de 100, 200 y 400 mg/kg. la captación de radical DPPH se expresaron en porcentajes de captación de radical DPPH que dieron como resultado 83,7; 77,7 y 56 % siendo la concentración de 400 mg/kg con 83.77 % de mayor actividad antioxidante. De igual modo La actividad antitusígena se expresó en porcentajes de inhibición de la tos la cual dió como resultado 75,6; 57,8 y 40 %, siendo la concentración de 400 mg con 75,6 % de mayor actividad antitusígena. Se concluye que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown "siete pisos" tiene actividad antioxidante y antitusígena.

**Palabras clave:** Actividad antioxidante y antitusígena, *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown.

## I. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad se conoce el uso medicinal de las plantas; la naturaleza proporciona un gran número de compuestos que se aplican como medicamentos, alimentos colorantes, los cuales han servido como fuente de inspiración para la síntesis de nuevas moléculas con actividad biológica. En países como Perú existen numerosas plantas con propiedades medicinales de carácter relevante que se vienen utilizando de manera empírica desde nuestros ancestros. El estrés oxidativo se origina por desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la capacidad antioxidante celular (CAC), la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) mitocondrial es constante, entre 2% y 5% del oxígeno para la cadena respiratoria se reduce para generar el anión superóxido,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2^-$ ,  $OH^-$  radicales libres potencialmente dañinos para la célula.<sup>1</sup> La tos es un reflejo defensivo indispensable y también es un síntoma común de enfermedades tales como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el cáncer de pulmón. El control de la tos sigue siendo una importante necesidad médica no cubierta y, a pesar de que los opioides de acción central se han mantenido como los medicamentos antitusivos de elección desde hace décadas poseen muchos efectos secundarios no deseados, como la sedación y los síntomas gastrointestinales.<sup>2</sup>

Uno de los síntomas más molestos y agotadores de las enfermedades respiratorias, sin duda alguna es la tos. Impide hablar, ocasiona ruido, no deja dormir bien, lastima la garganta y provoca dolores de pecho y torax cuando esta es fuerte, persistente o dura mucho si esta se extiende más de 10-14 días, pasa a ser un síntoma de alarma.<sup>3</sup>

La tos es un mecanismo de defensa que protege las vías aéreas de los efectos adversos de las sustancias inhaladas. Sirve además para expulsar las secreciones que se acumulan cuando se altera el mecanismo normal de limpieza mucociliar.<sup>4</sup>

El reflejo es complejo o abarca al sistema nervioso central y periférico, lo mismo que al músculo liso del árbol bronquial. Se ha sugerido que la irritación de la mucosa bronquial produce broncoconstricción, la cual, a su vez, estimula a los receptores de la tos (que tal vez represente un tipo especializado de receptor de estiramiento) localizados en los receptores traqueobronquiales.<sup>5</sup>

De otro lado, respecto al papel de los radicales libres en la obstrucción de las vías respiratorias en pacientes asmáticos, existen evidencias que apoyan la correlación entre la gravedad de la enfermedad y de la producción de radicales de oxígeno por los neutrófilos en pacientes asmáticos que sugieren que las especies reactivas de oxígeno podrían jugar un papel directo o indirecto en la modulación de la inflamación de las vías respiratorias.<sup>6</sup>

En este sentido, dado que *Leonotis nepetifolia*, una especie de distribución mundial, y sobre la base de su uso en la medicina tradicional como antiasmático, se realizó el presente estudio para evaluar la actividad antioxidante y antitusígena del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown que se atribuyen propiedades terapéuticas en el tratamiento de la degeneración, muerte celular y la tos, para este trabajo de investigación se desarrolló mediante la captación de radical DPPH y un modelo animal de tos refleja inducida por ácido cítrico en cobayos.<sup>6</sup>

#### **Objetivo general**

- Evaluar la actividad antioxidante y antitusígena del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos".

#### **Objetivos específicos**

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos".
- Determinar el porcentaje de captación del radical libre DPPH en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos".
- Evaluar la dosis con mejor actividad antitusígena del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos", respecto al estándar codeína.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

Existen innumerables trabajos que se han realizado con el objetivo de evaluar la actividad antitusígena de extractos vegetales tanto en nuestro medio como en todo el mundo, por ejemplo, se ha ensayado la actividad antitusiva de especies como: *Glycyrrhiza glabra* y *Adhatoda vasica*, en donde estudiaron su actividad antitusivo usando una tos modelo inducido por dióxido de azufre de gas en ratones, en la cual el efecto de los extractos de etanol de *Glycyrrhiza glabra* y *Adhatoda vasica* mostraron inhibición del reflejo de la tos en una dosis de 800 mg/kg y 200 mg/kg de peso corporal por vía oral en comparación con el grupo de control. Los ratones mostraron una inhibición de 35,62 %, en el tratamiento de la tos con *Glycyrrhiza glabra* y la inhibición de 43,03 % en el tratamiento con *adhatoda vasica* dentro los 60 minutos de la prueba. La actividad antitusígena del extracto era comparable a la de sulfato de codeína (10 m/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg de peso corporal), que produjo 24,80 %, 32,98 %, 45,73 % de inhibición respectivamente a los 60 minutos del experimento<sup>7</sup>, *Marsilea minuta* L.<sup>8</sup> *Bryophyllum pinnatum* (*B. pinnatum*) (BP) Lam.<sup>9</sup>, *Ballota limbata*<sup>10</sup>, entre otros, encontrándose que poseen actividad antitusiva potencial, Las últimas dos décadas han visto un aumento en todo el mundo.

El uso de la medicina tradicional y Complementaria y la medicina alternativa en los países desarrollados y países en desarrollo. El interés actual en todo el mundo en la medicina tradicional ha dado lugar a un rápido desarrollo y estudios de muchos remedios empleadas por diversos grupos étnicos del mundo. La información se registra en nombre común del nombre científico, nombre común, la familia, parte utilizada, componente activo y de referencia. Científicos de campos divergentes están investigando nuevas plantas con actividad antitusivo y expectorante. Entre ellos se ha registrado especies de la familia lamiaceae tales como: *Coleus amboinicus* Lour, *Ocimum sanctum* Linn, *Thymus vulgaris* L.<sup>11</sup>



La actividad antioxidante fue estudiada a través de la actividad de recolección de residuos DPPH; la actividad larvicida fue estudiada en los náuplios de artemia salina, actividad plaguicida mediante un gorgojo del arroz y la actividad antibacteriana fue estudiada mediante la técnica de micro dilución en *Bacillus subtilis*, *escherichia coli*, etc.<sup>12</sup>

*Leonotis Nepetifolia*, es conocida por sus propiedades anti-frío, anti-tos, anti-inflamatorias y anti-diarreicas desde las edades y bienestar utilizado por las comunidades tribales locales como etnomedicina. El presente estudio es un intento de investigar la composición fitoquímica preliminar de esta planta. El resultado revela la presencia de componentes bioactivos que contienen alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, glucósidos, esteroides y saponinas en diferentes disolventes. La presencia de estos fitoquímicos se puede correlacionar con la potencial medicinal de esta planta.<sup>13</sup> También se estudió la evaluación del potencial antioxidante de hojas de *Leonotis nepetifolia* y su efecto inhibitorio en líneas celulares de cáncer MCF7 y Hep29.<sup>14</sup>

Se estudiaron las flores, las hojas, los tallos de *Leonotis nepetifolia* L. Brown por separado a los extractos etanólicos y metanólicos de cada muestra. La actividad anti-inflamatoria de cada extracto se determinó mediante la prueba de edema inducido por TPA. Ello que es una investigación para evaluar la capacidad de los compuestos de prueba o extractos de prevenir una reacción inflamatoria en respuesta a la edemogen 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Todos los extractos ensayados mostraron, en algún grado, la actividad antiinflamatorio en el ensayo de edema inducido por TPA en ratones. Sin embargo, la actividad más elevada se obtuvo con el extracto EtOAc de hojas (65,75%), flores (69,06%) y tallos (72,93%). Con el fin de aislar los posibles componentes implicados, todos los extractos se sometieron a cromatografía. Aunque varios componentes como: Diterpenoides, cumarinas e iridoides han sido aislados de esta especie, sólo el estigmasterol y leonotinin fueron aislado en esta oportunidad. La identidad de cada compuesto se logró mediante la comparación de sus características físicas y espectroscópicas los datos con los reportados previamente. La presencia de leonotinin en *Leonotis nepetifolia* L. Brown está de acuerdo con los informes fitoquímicos anteriores de esta especie. La actividad anti-inflamatoria de estigmasterol está bien documentado y su presencia en esta especie podría dar cuenta de la actividad anti-inflamatoria. Por otra parte, muestra los resultados de la evaluación de la actividad anti-inflamatoria. Aunque han sido frecuentemente

aislado del género *Leonotis*, a nuestro entender esta es la primera vez que se determina su actividad anti-inflamatoria. Se sabe que los ésteres de forbol TPA, como en la piel inducen la inflamación, y una respuesta hiperproliferativa con una infiltración de neutrófilos. También se sabe que estimula TPA fosfolipasa A2 que en consecuencia ocurre un comunicado de ácido araquidónico y prostaglandinas. Por otra parte, varios estudios habían informado que algunos labdanotype diterpenos inhiben la enzima PLA2, que es importante involucrado en el proceso de inflamación. Además, ha informado de que los extractos de etanol de *L. Intermedia* y *L. leonorus* mostró una alta actividad inhibitora de la síntesis de prostaglandina, puede ser la hipótesis que la actividad anti-inflamatoria podría ser debido a una efecto de inhibición en la síntesis de prostaglandina.<sup>15</sup>

## 2.2 *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown.

### 2.2.1. Identificación taxonómica

**Tabla 1.-** según el sistema de clasificación de Cronquist A. 1988, y es como sigue:

Categoría taxonómica	Nomenclatura
DIVISIÓN	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	MAGNOLIOPSIDA
Sub Clase	ASTERIDAE
ORDEN	LAMIALES
FAMILIA	LAMIACEAE
GÉNERO	<i>Leonotis</i>
ESPECIE	<i>Leonotis nepetifolia</i> (L.)Brown.
N.V.	"siete pisos"

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis* FCB-UNSCH.

### 2.2.2. Descripción botánica

Es una planta herbácea anual, de aproximadamente de 2 metros de alto; de tallos simples o poco ramificados, aristados, hojas simples, largamente pecioladas de limbo aovado, con el ápice puntiagudo y base atenuada, de bordes lobulados, de disposición opuesta, penninervias y provistas de pelos. Inflorescencias en verticilios globosos, con muchas flores dispuestas en los nudos del tallo; flores tubuladas, bilabiadas, muy vistosas, de aspecto aterciopelado, heteroclamídeas, bisexuales pentámeras, de simetría zigomorfa: cáliz de cinco sépalos soldados en la base, con cinco dientes conspicuos en el

ápice en forma de espiras, con el diente posterior más largo y ancho que el resto; corola con cinco pétalos anaranjados o rojos formando un tubo largo que termina en dos labios, labio superior formado por tres pétalos soldados, densamente pubescente y labio inferior con dos pétalos soldados casi sin pelos; estambres libres en número de cuatro didínamo (dos largos y dos cortos); ovario súpero de estilo ginobásico, bicarpelar, tetralocular conteniendo un óvulo en cada lóculo; fruto tetraquenio. (Anexo 2)

### **2.2.3. Farmacobotánica**

*Leonotis nepetifolia* L Brown "siete pisos" es una planta medicinal importante que se ha utilizado para tratar el asma bronquial, la diarrea, la fiebre, la gripe y la malaria y también como analgésico. Del mismo modo, tradicionalmente se utiliza para tratar enfermedades renales, reumatismo, dismenorrea. En la India, se emplea en el tratamiento de quemaduras, hinchazón de los senos, tiña, escaldaduras; afecciones de la piel, paludismo y dolores reumáticos.<sup>16</sup> En la India la infusión de las hojas se utiliza tradicionalmente para curar el dolor de estómago en los niños y también para curar la tos y el resfriado. Esta planta también se utiliza por sus propiedades antidiarreicas y antiinflamatorias por varias comunidades en el subcontinente indio y también en todo el mundo.<sup>13</sup> Estudios etnobotánicos farmacológicos realizados en la ciudad de Viçosa, Brasil, reportó su empleo tradicional como antirreumático.<sup>17</sup> Las hojas se usan contra el reumatismo; hernia, diabetes y hepatitis; el tallo, en la ictericia y como estimulante del músculo esquelético; las semillas, en la malaria y como diurético; la raíz, en la inflamación de mama, quemaduras, vómito pre natal; y las flores, en heridas, quemaduras e ictericia.<sup>18</sup>

### **2.2.4. Estudio farmacológico**

Muchos estudios farmacológicos con *Leonotis nepetifolia* se han realizado con el fin de demostrar su empleo en la medicina tradicional. Se ha reportado su actividad anticonvulsivante.<sup>19, 20</sup> Esta planta exhibió varias actividades biológicas tales como antifúngica y antibacteriana.<sup>13</sup> Se ha demostrado experimentalmente su actividad antiinflamatoria en un modelo de edema inducido. El extracto acuoso de *Leonitis nepetifolia* a dosis de 1,0 g/kg mostró actividad contra la malaria en ratones infectados con *Plasmodium berghei* e *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*. El extracto metanólico a una concentración de 50 mg/ml mostró actividad antibacteriana frente a *Bacillus subtilis*. El extracto acuoso a una concentración de 3,0 mg/ml mostró actividad espasmolítica en la tráquea de

cobayos. El extracto hidroalcohólico a 1% mostró actividad insecticida sobre *Mosca domestica* <sup>18</sup>

### 2.2.5. Composición química

Estudio fitoquímicos preliminares de esta planta reveló la presencia de componentes bioactivos que comprenden alcaloides, flavonoides, fenoles, taninos, glucósidos, esteroides y saponinas en diferentes disolventes, lo que se puede correlacionar con su potencial medicinal.<sup>13</sup> *Leonotis nepetifolia* es una planta rica en alcaloides (leonurina y estacidreno), glucósidos iridoides (leonurida, leonurina y leonuridina), diterpenoides (leocardina), flavonoides (rutina, quercetina, hiperósido, apigenina), aceites volátiles, taninos y vitamina A. La raíz contiene n-octacosanol, ácido N-octacosanoico, quercetina, cumarinas como 4, 6, 7-trimetoxi-5-metilcromeno-2-ona, el campesterol y el betasitosterol. El aceite de semilla contiene ácidos oleico, linoleico, palmítico y esteárico. El aceite, extraído de las semillas es similar al aceite de oliva. Las hojas contienen neptaefolina, neptaefurano, neptaefuranol, neptaefolinol, leonitina, neptaefolinina y (-)-55, ácido 6-octadecadienoico.<sup>18</sup>

### 2.3. Radicales libres

Son especies químicas (átomos, iones y moléculas) con un electrón desapareado en su orbital más externo lo que le da una configuración espacial inestable, por lo tanto una gran capacidad para reaccionar con otras sustancias.<sup>21</sup> En ese estado, el radical es extremadamente reactivo e inestable y entra en reacción con sustancias químicas inorgánicas u orgánicas (proteínas, lípidos, carbohidratos) en especial con moléculas clave de las membranas y con ácidos nucleicos, además; los radicales libres inician reacciones autocatalíticas, estas especies se producen de manera fisiológica como parte de las reacciones orgánicas de óxido-reducción.<sup>22</sup>

#### 2.3.1 Formación de los radicales libres

**a) Fuentes endógenas:** Los radicales libres son elaborados continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula e inactivados por un conjunto de mecanismos (unos enzimáticos y otros de atrapamiento). Al elevarse las concentraciones fisiológicas de las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden acarrear importante alteraciones funcionales.<sup>23</sup>

**b) Fuentes exógenas:** los radicales libres se producen como respuesta a la: Contaminación ambiental, la exposición a radiaciones ionizantes, luz ultravioleta,

ciertas drogas, toxinas fúngicas, pesticidas o xenobióticos, reactivos, solventes industriales, componentes del tabaco, los medicamentos.<sup>24</sup>

### 2.3.2 Especie reactivas del oxígeno (ERO)

El oxígeno molecular ( $O_2$ ) tiene dos electrones no apareados en su orbital externo, su reactividad resulta de esta propiedad birradical. Debido a su labilidad química, puede dar origen a ERO, que son moléculas muy reactivas, tiene una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman. Su gran reactividad se debe a que posee electrones desapareados que les hace reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos de óxido-reducción.<sup>25, 26</sup>

Las principales especies reactivas del oxígeno son:

- Radical hidroxilo ( $HO^\bullet$ )
- Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )
- Anión superóxido ( $O_2^\bullet$ )
- Oxígeno singlete ( $^1O_2$ )
- Peróxido ( $ROO^\bullet$ ).<sup>26</sup>

### 2.4. Estrés oxidativo:

El estrés oxidativo es un estado que se caracteriza por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la capacidad antioxidante de las células. En el paso a la vida oxigenada las células se dotaron de sistemas antioxidantes que pueden ser enzimáticos y por lo tanto involucran mecanismos complejos, y no enzimáticos en los que participan biomoléculas que generalmente poseen menor peso molecular que las enzimas. Los ROS, se producen constantemente en la mitocondria, entre 2 a 5% del oxígeno que entra en la cadena respiratoria se reduce de forma univalente para dar radical superóxido. Las sustancias que participan en las reacciones de los sistemas de defensa antioxidante se inactivan o deterioran en determinadas situaciones, este deterioro puede ser causado por alguna enfermedad crónica o transitoria que provoca incrementos sustanciales en la producción de oxidantes y prooxidantes.<sup>27</sup>

### 2.5. Antioxidantes

Aproximadamente el 5 % o más del oxígeno inhalado ( $O_2$ ) se convierten en especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como el  $O_2^\bullet$ ,  $H_2O_2$  y  $OH^\bullet$ , por reducción univalente del oxígeno molecular ( $O_2$ ), los antioxidantes son moléculas que tienen la capacidad de prevenir o retardar la oxidación de sustratos biológicos generalmente, lípidos y ácidos nucleicos, el antioxidante al

reaccionar con un radical libre le cede un electrón oxidándose y se transforma en un radical débil, con escasos o nulos efectos tóxicos.<sup>28</sup>

Para que un antioxidante tenga actividad antiradicalaria debe cumplir una característica básica que es generar un radical más estable y menos dañino después de reaccionar con la especie radical, esta reacción se basa en una transmisión redox en la que está implicada la donación de un electrón o un átomo de hidrógeno a la especie radicalaria. Como resultado de esta transferencia, se formara un radical derivado del antioxidante que puede tener carácter inerte, estable o presentar cierta reactividad.<sup>29</sup>

#### **Clasificación de los antioxidantes**

- **Exógenos:** vitamina E, vitamina C, beta caroteno, flavonoides, licopenos.
- **Endógenos:** glutatión, coenzima Q, ácido tióctico.
- **Cofactores:** cobre, zinc, manganeso, hierro, selenio.<sup>30</sup>

#### **2.6. Compuestos fenólicos**

Son metabolitos secundarios producidas por todas las plantas, un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo y que ocurren frecuentemente como glicósidos, combinados con grupos de azúcar; pueden ser detectados por el intenso color verde, azul o negro, que producen cuando se les agrega una solución acuosa o alcohólica al 1% de cloruro ferrico.<sup>31</sup>

La naturaleza química de los compuestos polifenólicos es muy heterogena y engloba un amplio surtido de disposiciones estructurales de familias de polifenoles que pueden englobar desde estructuras libres a conjugadas (estructuras polifenólicas unidas a otras sustancias de distinta naturaleza). Así, los flavonoides son compuestos polifenólicos que reflejan un gran número de estos diseños estructurales.<sup>32</sup>

#### **Clasificación**

Los polifenoles se pueden clasificar de muchas maneras debido a su diversidad estructural. Según su estructura química tenemos dos grandes grupos:

##### **a. Ácidos fenólicos**

Derivados del ácido benzoico C6-C1 y derivados del ácido cinámico C6-C3.<sup>33</sup>

Estos compuestos tienen una función carboxílica y un grupo hidroxílico fenólico, estos compuestos derivan del ácido benzoico (anisaldehido, vanillina, ácido verátrico, ácido anísico, ácido gálico) y del ácido cinámico (clorogénico, caféico, ferúlico y sináptico, p-cumárico, elágico).<sup>34</sup> Algunos autores afirman que el ácido

elálgico tiene como función detectar y restaurar las células carente del gen p53, gen encargado de la apoptosis y del control de la proliferación celular responsable del cáncer.<sup>35</sup>

Los ácidos fenólicos tienen propiedades antisépticas urinarias, propiedades antiinflamatorias de los derivados salicílicos. Inhiben la 5-lipooxigenasa de granulocitos humanos, de ello resulta una inhibición en la formación de hidroperóxidos y leucotrieno que podrían justificar el empleo en el tratamiento de enfermedades inflamatorias o alérgicas.<sup>36</sup>

Los ácidos fenólicos tienen la gran importancia debido a su amplia actividad biológica como son: antioxidantes, antivirales, antitumorales, antifúngicos, antimutagénicos, hepatoprotectores, antiinflamatorias e inmunoestimulantes. La actividad antioxidante de los ácidos fenólicos denominados ácidos de serie cinámica son más activos que los derivados hidroxilo del ácido benzoico debido a que poseen grupos oh y carbonilo no unidos directamente al anillo benzenico.<sup>37</sup>

#### **b. Flavonoides (C6\_C3\_C6)**

Formados por dos grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado, antocianos, isoflavonas, flavonas, flavononas, flavonoles y flavononoles, taninos condensados y lignanos.<sup>33</sup>

Los flavonoides son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza. Se han identificado más de 5.000 flavonoides diferentes. Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima como 23 mg/día, siendo la quercitina el predominante con un valor medio de 16 mg/día. En un principio, fueron consideradas sustancias sin acción beneficiosa para la salud humana, pero más tarde se demostraron múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libre. Aunque diversos estudios indican que algunos flavonoides poseen acciones prooxidantes, éstas se producen sólo a dosis altas, constatándose en la mayor parte de las investigaciones la existencia de efectos antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos, y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías. El termino denota un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura benzopirona, los cuales están ampliamente distribuidos en reino vegetal y se encuentran de forma universal en las plantas vasculares, en forma de glicósido. Químicamente, estas sustancias son de



naturaleza fenólica y se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general C6-C3-C6, los cuales pueden formar o no un tercer anillo.<sup>38</sup>

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. Estos contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos que tiene excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer. Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoides y antiinflamatorias), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (prevención de la placa de ateroma).<sup>39</sup>

### **Clasificación**

Los flavonoides se clasifican en varios grupos de acuerdo con las variantes estructurales que presentan: flavonas, flavonoles, flavanoles, isoflavonas y antocianidinas.

### **Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos**

Los flavonoides forman parte del denominado sistema de defensa antioxidante exógeno del organismo, es decir, aquellas defensas que se adquieren a través de la dieta. Existen tres tipos de mecanismos que pueden explicar la actividad antioxidante de estas defensas:

- a. La transferencia de electrones que determina que el antioxidante se transforme en una molécula radical activa.
- b. La transferencia de electrones que determina la formación de una molécula antioxidante inactiva o estable.
- c. Pequeñas moléculas que actúan como enzimas antioxidantes.

El mecanismo por el cual ejercerían su actividad antioxidante los flavonoides sería la transferencia de electrones que conlleva la aparición de una molécula



radical activa, pero también estaría implicada la capacidad de estos compuestos para quelar metales.<sup>40</sup>

Para que un compuesto fenólico sea clasificado como antioxidante debe cumplir condiciones básicas:

- Cuando se encuentra en una concentración baja con relación al sustrato que va a ser oxidado pueda retrasar o prevenir la auto oxidación o la oxidación medida por un radical libre
- El radical formado tras el secuestro sea estable y no pueda actuar en oxidaciones posteriores.<sup>41</sup>

### **2.7 Sistema de protección antioxidante**

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con resto de las moléculas presentes, en determinado microambiente-membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular.<sup>42</sup>

### **2.8. La tos**

La tos es una espiración explosiva que actúa como mecanismo protector para limpiar el árbol traqueobronquial de las secreciones y del material extraño. No obstante, si es excesiva o molesta se convierte en uno de los síntomas más frecuentes por los que se solicita la ayuda médica. Los motivos de consulta suelen ser las molestias derivadas de la propia tos, la interferencia en la vida cotidiana y a preocupación de que pudiera reflejar la existencia de un cáncer.<sup>43</sup>

#### **2.8.1 Reflejo tusígeno**

Los bronquios y la tráquea son tan sensibles al contacto ligero que las cantidades excesivas de sustancias extrañas u otra causa de irritación inicial al reflejo de la tos. La laringe y la carina (el punto en que la tráquea se bifurca en los dos bronquios) son especialmente sensibles, y los bronquiolos terminales e incluso los alveolos son sensibles a estímulos químicos corrosivos como el dióxido de azufre gaseoso y el cloro gaseoso. Los impulsos nerviosos aferentes procedentes de las vías respiratorias se dirigen al bulbo raquídeo principalmente por los nervios vagos.<sup>44</sup>

### **2.8.2 Mecanismo de la tos**

La tos se puede iniciar de manera voluntaria o refleja. El reflejo defensivo tiene ramas o componentes aferentes y eferentes. La rama aferente comprende los receptores situados en el territorio de distribución sensorial de los nervios trigémino, glossofaríngeo, laríngeo superior y vago. La rama eferente comprende el nervio laríngeo recurrente y los nervios raquídeos. La tos comienza por una inspiración profunda, sigue con el cierre de la glotis, la relajación del diafragma y la contracción de este músculo contra la glotis cerrada. El importante aumento de la presión intratorácica positiva origina estrechamiento de la tráquea. Cuando se abre la glotis, la enorme diferencia de presión entre la vía respiratoria y la atmósfera, junto con el estrechamiento de la tráquea, causan el flujo rápido a través de la tráquea. Las fuerzas de cizallamiento que se desarrollan ayudan a eliminar el moco y las partículas extrañas.<sup>43</sup>

### **2.9 Antitusivos y su clasificación**

Los antitusivos son fármacos que inhiben el reflejo de la tos. Según el lugar de acción, se pueden clasificar como sigue:

**2.9.1 Actúan sobre el centro de la tos.** Los más utilizados son derivados opioides, que poseen, en mayor o menor grado, actividad opioide (codeína, dihidrocodeína, morfina y metadona), o que no la poseen (dextrometorfano, dimemorfano y folcodina). Son también eficaces la noscapina, algunos antihistamínicos H1 antiguos que poseen propiedades anticolinérgica y sedante (cloperastina, difenhidramina y bromofeniramina). En casos de tos muy resistente se ha recurrido a benzodiazepinas con actividad anticonvulsivante (clonazepam). Otros fármacos activos son la levodropropizina, el fominobeno y la glaucina.<sup>45</sup>

**2.9.2 Actúan sobre la rama aferente del reflejo de la tos.** Pueden alterar la sensibilidad de los receptores periféricos los anestésicos locales administrados por vía tópica (p. ej., para broncoscopías) o intravenosa (lidocaína en postanestesia). En la tos causada por inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) se ha probado el nifedipino y algunos antiinflamatorios no esteroideos (sulindaco y naproxeno).<sup>45</sup>

**2.9.3 Modifican los factores mucociliares o actúan sobre la rama eferente del reflejo de la tos.**

El anticolinérgico bromuro de ipratropio por vía inhalatoria, el glicerol yodado y el guaimesal.<sup>45</sup>

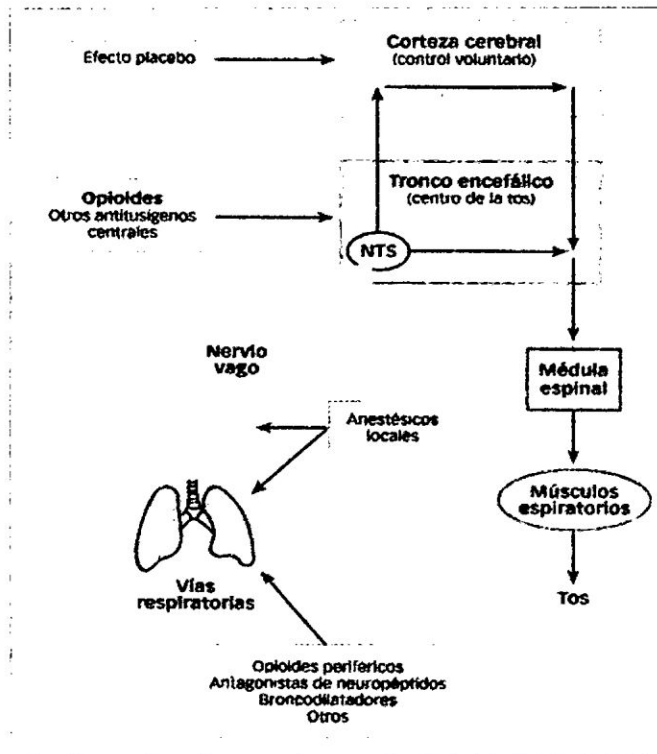


Figura 1. Sitios de acción de los antitusivos <sup>46</sup>

### 2.10 Codeína

Los opiáceos disminuyen la sensibilidad del "centro de la tos". Aunque no se ha llegado a comprender claramente cómo ejercen su efecto, los opiáceos parecen actuar mediante una acción agonista sobre los receptores opioides, deprimiendo a un hipotético "centro de la tos" localizado en el tronco del encéfalo.<sup>47</sup>

La codeína (metilmorfina) es el fármaco antitusígeno más utilizado y su efectividad sirve de referencia a nuevos fármacos. El efecto antitusígeno se alcanza con dosis subanalgésicas o en la parte inferior del intervalo de dosificación como analgésico. La dosis antitusígena (vía oral) usual en los adultos es de 10-20 mg cada 4-6 horas (dosis máxima, 120 mg/día) y de 50 mg cada 12 horas para el preparado de acción retardada; en los niños de 6-12 años: la mitad de la dosis de los adultos; en los niños de 2 a 6 años: 0,25 mg/kg cada 6 horas. No se recomienda el uso en los recién nacidos y menores de 2 años de edad. En geriatría se recomienda dosis menores que en el adulto o un mayor intervalo de dosificación.<sup>47</sup>

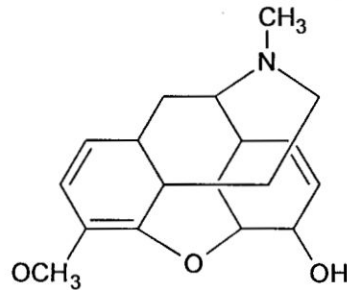


Figura 2. Estructura química de la codeína<sup>45</sup>

### **Acción farmacológica**

Antitusígeno: ejerce su acción sobre los centros bulbares, además tienen acción analgésica central, empleándose como analgésico de leve a moderado y con acción antidiarreica.<sup>48</sup>

### **Farmacocinética**

Se absorben bien por vía oral con una biodisponibilidad del 50% para la codeína y del 20% para la dihidrocodeína. La Cmax se alcanza en una hora para la codeína y en 1,5-2 horas para la dihidrocodeína. La codeína se elimina principalmente por metabolización: el 90% por N- y O-desmetilación, y el resto por conjugación.

Lógicamente, la N-desmetilación la convierte en morfina, claramente activa; este proceso está sometido a polimorfismo genético, de forma que los metabolizadores lentos responderían menos a la codeína. La excreción es renal, con una semivida para ambos compuestos de 3-4 horas.

Existe una formulación oral de dihidrocodeína de liberación prolongada cuyo efecto dura unas 12 horas<sup>48</sup>

### **Reacciones adversas**

Puede producir depresión respiratoria, agravado la situación de pacientes enfisematosos; en ocasiones produce bronco constricción y reducción de la secreción bronquial. A diferencia que la morfina no ocasiona farmacodependencia, no depresión profunda o coma.<sup>46</sup>

**Contraindicaciones:** hipersensibilidad al codeína fosfato, arritmia cardíaca, historia de convulsiones alcoholismo o inestabilidad emocional, disfunción hepática o renal, hipotiroidismo, hipertrofia prostática u obstrucción reciente cirugía del tracto urinario.<sup>49</sup>

### **Interacciones**

Las fenotiazidas, inhibidores de la monoaminoxidasa y antidepresores tricíclicos pueden intensificar y prolongar los efectos depresores de los opioides (codeína),

la cual pueden entrañar alteraciones en la velocidad de transformación metabólica del opioide o alteración en los neurotransmisores que participan en las acciones de estos últimos fármacos.<sup>50</sup>

### **Dosis**

La dosis antitusígena (vía oral) usual en los adultos es de 10-20 mg cada 4-6 horas (dosis máxima, 120 mg/día) y de 50 mg cada 12 horas para el preparado de acción retardada; en los niños de 6-12 años la mitad de la dosis de los adultos, en los niños de 2-6 años 0.25 mg/kg cada 6 horas. No se recomienda el uso en los recién nacidos y menores de 2 años de edad. En geriatría se recomiendan dosis menores que en adultos.<sup>51</sup>

### III. MATERIALES MÉTODOS

#### 3.1 Lugar de ejecución.

El presente trabajo de investigación, se desarrolló en los laboratorios de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de abril a junio del 2015.

#### 3.2 Población y muestra.

**3.2.1 Población:** Hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos" que crece en los jardines de la ciudad universitaria de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, región Ayacucho.

**3.2.2 Muestra:** 2,5 kg de hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos". Se seleccionaron por conveniencia las plantas con hojas intactas; luego fueron lavadas, secadas en una habitación ventilada, sobre el papel periódico aproximadamente por una semana. Una de las plantas fue enviada para su identificación al herbarium huamangensis de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

#### 3.2.3 Animales de experimentación

Se utilizaron 25 cobayos machos de 350g a 520g, que fueron adquiridos del INIA de Ayacucho y llevados al Bioterio de farmacia de la UNSCH; los cuales estuvieron en adaptación durante siete días a una temperatura ambiente, alimentados con dieta balanceada.

#### 3.3 Métodos para la recolección de datos

##### 3.3.1 Preparación del extracto hidroalcohólico

Se pesaron 2 kg muestra seca y molida, para macerarlo se colocó en frasco color ambar al cual se le adiciono 7 litros de alcohol de 80% hasta que cubra a la muestra por un centímetro de diferencia. El tiempo que se maceró la muestra fue

durante siete días agitándolo cada día constantemente para su mejor distribución homogénea.<sup>52</sup>

### **3.3.2 preparación de las concentraciones del extracto hidroalcohólico**

Se filtró el extracto hidroalcohólico macerado, luego se llevó a concentrar en Baño María a 40°C obteniendo el extracto de consistencia semilíquida y finalmente se llevó a estufa a una temperatura de 40°C hasta obtener la sequedad del extracto.<sup>31</sup> El extracto seco se almacenó en la refrigeradora hasta la preparación de concentraciones de 100, 200 400 mg/kg de peso del animal.

### **3.3.3 procedimiento para realizar el análisis fitoquímico**

Se realizó las reacciones con pruebas de coloración y precipitación para identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico.<sup>31</sup> (ANEXO 3).

### **3.3.4 Determinación de la actividad antitusígena**

#### **Fundamento:**

Para evaluar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos" consiste en determinar la pérdida de la coloración violeta intensa de DPPH, cuando este es capturado por un antioxidante reduciéndose a DPPH-H dando una coloración amarilla<sup>53</sup>

#### **Fármacos de referencia:**

- Fosfato de codeína, se aplicó directamente por vía oral a una concentración de 10 mg/kg.
- Ácido ascórbico, se utilizó a 10, 50 y 100 µ/ml.

#### **Procedimiento experimental<sup>54</sup>**

Se ha empleado 25 cobayos machos con un peso corporal entre 350 a 520 g

- Se les aclimató o acondicionó 2 días en jaulas metálicas en un ambiente adecuado, con agua y alimento balanceado, para eliminar los efectos de estrés.
- Un día antes se sometió a prueba a cada animal y se escogieron solamente los cobayos que tosieron entre 10 y 25 toses durante un periodo de 5 minutos.
- Los cobayos se dividieron en 5 grupos de 5 cobayos machos por grupo.
- Los cobayos machos fueron colocados individualmente en una jaula de vidrio transparente (20×14×12).

- A cada uno de los ratones de cada grupo se expuso por 5 minutos a un aerosol de ácido cítrico en agua a 10% p/v, a una velocidad de 0.16 l/s y a una presión de 0.5 bar.
- Durante la exposición, los animales fueron observados y se registró el tiempo para el comienzo de la primera tos, el número total de toses durante los 5 minutos de exposición y durante los siguientes 5 minutos.
- Se administró el tratamiento, y a uno de los grupos se le administró la droga de referencia, fosfato de codeína (10 mg/kg).
- Una hora después del tratamiento, todos los animales fueron expuestos al aerosol de ácido cítrico.
- La actividad antitusiva se calculó como el porcentaje de inhibición del número de toses, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ IH} = \frac{\text{N}^{\circ}\text{TC} - \text{N}^{\circ}\text{TP}}{\text{N}^{\circ}\text{TC}} \times 100$$

Dónde:

N° TC : Numero de toses totales promedio del control

N° TP : Numero de toses totales promedio del problema

### **3.3.5 Determinación de la actividad antioxidante mediante secuestro del radical libre (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), DPPH.<sup>55</sup>**

#### **Fundamento**

La técnica empleó el DPPH que tiene un electrón desapareado y es de color azul violeta, se basa en la desaparición de dicho color hacia el amarillo pálido por la reacción de la sustancia antioxidante, de tal manera que el mejor compuesto destructor es el mejor antioxidante<sup>56</sup>

#### **Procedimiento**

1. Se preparó una solución metanólica de DPPH de 20 mg/l
2. Se preparó una solución metanólica del extracto a una concentración de 300 µg/ml (solución A)
3. Se calibró el espectrofotómetro a cero con una solución blanco de metanol: agua (2:1)
4. Se preparó un blanco de muestra con 0,75 ml de muestra (solución A) y 1,5 ml de metanol
5. Se preparó un patrón de referencia con 1,5 ml de DPPH y 0.75 ml de agua destilada



6. Se preparó la muestra, con 0,75 ml de solución A y 1,5 ml de DPPH obteniéndose una concentración final de 100 µg/ml. Inmediatamente se dejó a temperatura ambiente por cinco minutos y se realizó la lectura de las absorbancias a 517 nm en el espectrofotómetro
7. Se midió la absorbancia del patrón de referencia y del blanco de la muestra.
8. Se diluyó la solución A (2) con metanol a una proporción de 1:1 para obtener una concentración final de 50 µg/ml (solución B) y luego en una proporción de 1:9, para obtener una concentración final de 10 µg/ml (solución C)
9. Con las soluciones B y C se procedió igual que en 6 y 7
10. El estándar ácido ascórbico se preparó siguiendo el mismo procedimiento que conlleva a lograr concentraciones de 100, 50 y 10 µg/ml.
11. Los extractos fueron evaluados por triplicado.

Con los valores de absorbancia obtenidos se determinó el porcentaje de captación de radicales libres DPPH, mediante la siguiente fórmula:

$$\%AA = 100 - \frac{Am - Ab}{Ac} \times 100$$

Dónde:

Ac : Absorbancia del DPPH

Am : Absorbancia de la muestra

Ab : Absorbancia del blanco de la muestra

%AA : Porcentaje de captación del radical libre

**Tabla 2.-** diseño experimental de la actividad antitusígena de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown.

Grupo	Tratamiento	Dosis
1	Solución salina fisiológica	4 ml/kg
2	Ácido cítrico (AC) + Codeína fosfato (Co)	Cod=10 mg/kg
3	Ácido cítrico (AC) + Extracto	100
4	Ácido cítrico (AC) + Extracto	200
5	Ácido cítrico (AC) + Extracto	400

**Tabla 3.-** Diseño experimental de la actividad antioxidante de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown.

Muestras	Procedimiento	Ab 517 nm
Blanco	0.75 ml de M <sub>A</sub> + 1.5 ml de metanol	Leer
Patrón	0.75 ml agua + 1.5 ml DPPH	Leer
M <sub>A</sub>	0.75 ml de M <sub>A</sub> + 1.5 ml DPPH	Leer
M <sub>B</sub>	0.75 ml de M <sub>B</sub> + 1.5 ml DPPH	Leer
M <sub>C</sub>	0.75 ml de M <sub>C</sub> + 1.5 ml DPPH	Leer

### **3.4 Análisis estadístico**

#### **3.4.1 Actividad antitúsígena**

Del mismo modo, para la actividad antitúsígena, se expresaron mediante el Análisis de Varianza entre las tres concentraciones del ensayo farmacológico, con un nivel de significancia estadística del 95%. Las comparaciones entre cada tratamiento se hizo con la prueba Duncan y Dunnet, para cuyo efecto se recurrió al uso del programa SPSS versión 21.

#### **3.4.2 Actividad antioxidante**

Los resultados de la actividad antioxidante se expresaron mediante gráficos en función de las medias de desviación estándar. Las diferencias entre las medias fueron contrastadas mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey, con un nivel de significancia estadística del 95%.

## V. RESULTADOS

**Tabla 4.-** Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* "siete pisos", Ayacucho – 2015

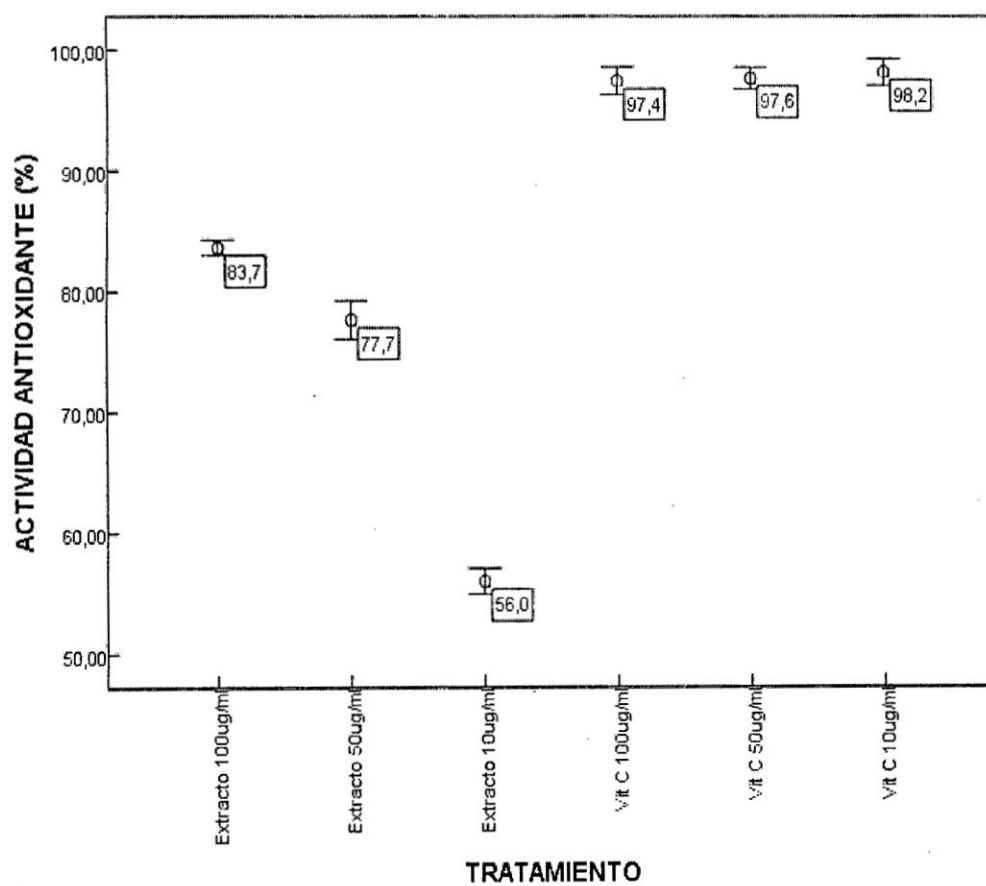
Metabolitos secundarios	Ensayos	Observaciones	Resultados
Flavonoides	Shinoda	Coloración rojo intenso	+++
Saponinas	Espuma	Formación de espuma	+++
Fenoles y taninos	Cloruro férrico	Coloración verde intenso	+++
Catequina	Catequinas	Color verde carmelita	+++
Alcaloides	Hager	Coloración naranja	+++
Alcaloides	Mayer	Formación de precipitado blanco	+
Alcaloides	Wagner	Formación de precipitado marrón	+++
Triterpenos y esteroides	Liebermann-burchard	Coloración verde oscuro- negro	+++

**Leyenda:**

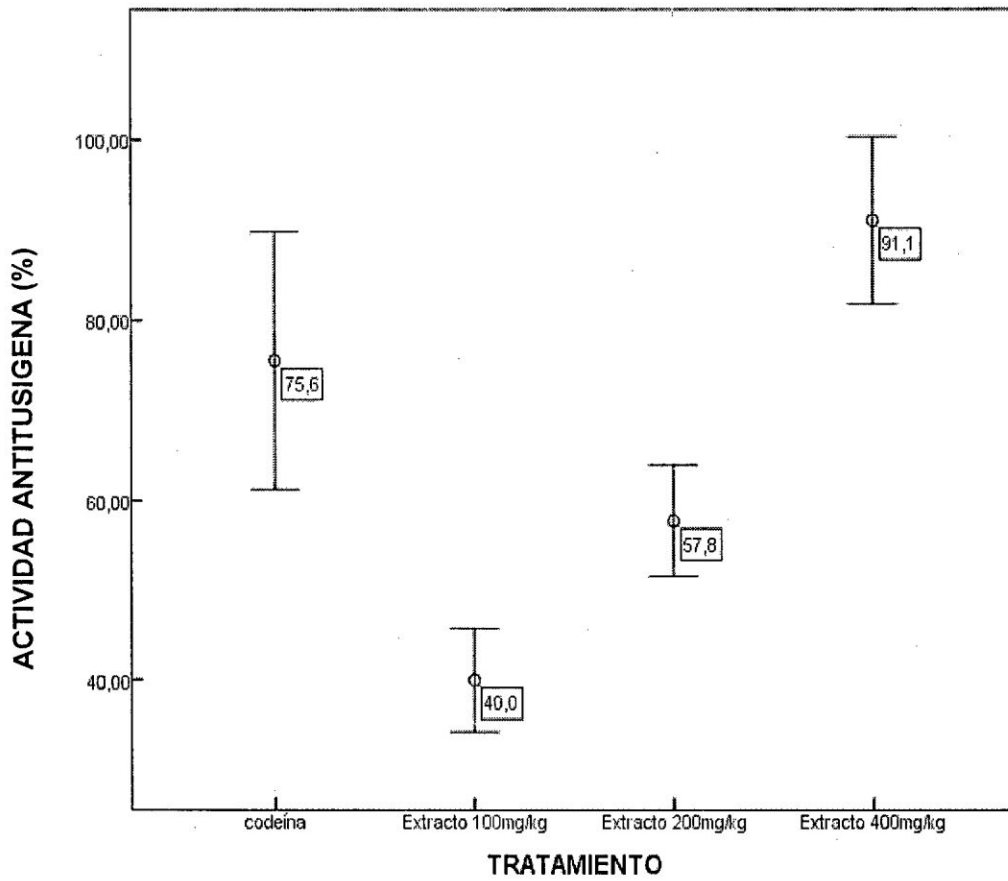
(+) : Escaso

(++) : Moderado

(+++): Abundante



**Figura 3.-** Variación de porcentaje de actividad antioxidante por efecto de ácido ascórbico y el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown “siete pisos”, Ayacucho – 2015.



**Figura 4.-** Variación de porcentaje de actividad antitusígena por efecto de la administración de la codeína y el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown “siete pisos” en cobayos, Ayacucho – 2015.

## V. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación viene a ser una contribución al conocimiento terapéutico de las propiedades farmacológicas del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos" que fueron recolectadas y seleccionadas en los jardines de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Afirman que los extractos hidroalcohólicos son los que extraen la mayor diversidad de componentes químicos presentes en drogas. En donde la concentración de principios activos es óptima; facilitándose la dosificación de los mismos.<sup>57</sup>

El tamizaje fitoquímico se realizó siguiendo los protocolos establecidos por Lock de Ugaz y Miranda Cuellar.

En la tabla 1, muestra los resultados del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos" como: flavonoides, saponinas, fenoles y taninos, catequinas, alcaloides, triterpenos y esteroides. La prueba de Shinoda identifica la presencia flavonoides formándose una coloración de rojo a amarillo para que sea positivo, en la identificación de fenoles y/o taninos se indica que debe observarse una coloración azul verdosa al agregar unas gotas de cloruro férrico, así mismo, la prueba de catequinas se evidencian por fluorescencia verde al exponer a la luz UV<sup>31</sup>

Para identificar la presencia de alcaloides se debe evidenciar la presencia de precipitado<sup>52</sup>, para la identificación de saponinas debe observarse la formación de espuma<sup>31</sup>. Estudio realizados por otros autores corroboran la presencia de estos metabolitos encontrados mediante el tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos", se evidenció mediante el tamizaje fitoquímico realizado en diferentes solventes, la presencia de: alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, glucósidos, esteroides y saponinas<sup>13</sup>

Una manera de inducir el reflejo de la tos y así estudiar su fisiología y la posibilidad de modificación terapéutica, está dada por inhalación de diferentes sustancias, agua destilada, partículas, sustancias broncoconstrictoras tales como histamina o metacolina y sustancias irritantes como el ácido cítrico o capsaicina.<sup>58</sup>

En la figura 3, se muestra los resultados del porcentaje de captación de radical libre DPPH en el extracto hidroalcohólico *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos," todas las muestras al decolorar el DPPH, con un porcentaje de captación del radical libre en 83.875%, 77.1225% y 56.25% a concentraciones de 100, 50 y 10 µg/ml respectivamente. Los resultados fueron comparados con el estándar ácido ascórbico, que mostró tener actividad antioxidante en un 96,875 %, 97,25 % y 97,75 % a concentraciones de 100, 50 y 10 µg/ml. Es importante recalcar que la actividad antioxidante es dependiente de la concentración del extracto y del microambiente en el que se encuentra el compuesto, pudiendo interactuar entre sí, produciéndose efectos sinérgicos o inhibitorios.

En la tabla 2, se observa el análisis de varianza para el porcentaje de inhibición de la tos por tratamiento de los extractos hidroalcohólicos, demostrando que son significativos a un nivel de confianza del 95%, indicando que si existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los tratamientos ensayados.

En la tabla 3, muestra los resultados de la prueba de Tukey para el porcentaje de la inhibición de la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólico *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos", donde la actividad antioxidante de las tres diferentes concentraciones son estadísticamente diferentes entre sí, pero el porcentaje de la actividad antioxidante de ácido ascórbico (100, 50 y 10 µ/ml) son estadísticamente similares, también son diferentes los porcentajes de la actividad antioxidante entre la muestra y el estándar.

Los flavonoides se encuentran en los vegetales y se han identificado más de 5000 flavonoides con capacidad para neutralizar los radicales libres responsables de determinadas patologías o del agravamiento de las mismas, cuando los flavonoides tienen sustituciones en anillo A o b, son aquellas estructuras que tienen una buena acción inhibitoria de la formación del radical hidroxilo,<sup>30,37</sup> entonces la actividad antioxidante depende de la estructura química, posición y número de sustituciones en el núcleo del flavonoide.<sup>59</sup>

La actividad antioxidante se evaluó utilizando el método de captación de radical 1,1 difenil-2- picril hidracilo (DPPH), donde se observa que los compuestos



fenólicos y flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico mostraron actividad antioxidante dependiente de la concentración (GRAFICO N° XI), pero la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos" en comparación del control ácido ascórbico fue en menor porcentaje (ANEXO 6). De la actividad antioxidante de los flavonoides se sabe que las flavonas y flavonoles se muestran activos contra los radicales libres<sup>36</sup>

Los flavonoides pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres<sup>35</sup>. Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones. Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas, así como sus propiedades antitrombóticas y antiinflamatorias. Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides, son: la presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B; que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones. Doble ligadura, en conjunción con la función 4- oxo del anillo C41-42. Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante. Siguiendo estos criterios, el flavonoide quercitina es el que mejor reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante. Su capacidad antioxidante medida como Trolox es de 4,7 mM, lo que resulta 5 veces mayor al demostrado por las vitaminas E y C y tiene una hidrosolubilidad similar a la de la vitamina E. La función antioxidante de la quercitina muestra efectos sinérgicos con la vitamina C. El ácido ascórbico reduce la oxidación de la quercitina, de manera tal que combinado con ella permite al flavonoide mantener sus funciones antioxidantes durante más tiempo. Por otra parte, la quercitina protege de la oxidación a la vitamina E, con lo cual también presenta efectos sinergizantes. Así, se ha demostrado que el flavonoide inhibe la fotooxidación de la vitamina E en la membrana celular de las células sanguíneas en presencia de hematoporfirina como fotosensibilizador. Los flavonoides retiran oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células<sup>39</sup>

Además, flavonoides como la quercitina y el kaempferol son importantes para el control de las concentraciones intracelulares de glutatión. Actuando a nivel del gen de regulación, son capaces de aumentar el nivel en un 50%, induciendo el sistema antioxidante celular y contribuyendo así a la prevención de enfermedades<sup>39</sup>

Por lo tanto se puede afirmar, que la actividad antioxidante del hidroalcohólico *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos," se debe a la presencia de los compuestos fenólicos tales como los ácidos fenólicos y flavonoides.

Menciona que en el hombre se estudia la prevención de la tos provocada por la nebulización, como en los animales, cobayo, perro y gato, en soluciones diluidas de amoníaco, ácido sulfúrico o ácido cítrico, el más conveniente.<sup>60</sup>

En la figura 4, se muestra los resultados de la actividad antitusígena, para el porcentaje de inhibición de la tos por tratamientos con diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* "siete pisos" L Brown, demostrando que la concentración de mayor actividad inhibitoria de la tos es de 400 mg/kg con 91,1% de actividad antitusígena comparado con el estándar que tuvo 75,6% de actividad antitusígena, menor que la muestra. De esta manera de demostrado que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* "siete pisos" L Brown tiene actividad antitusígena.

La tabla 4, muestra las diferencias significativas del tratamiento del extracto hidroalcohólico en diferentes concentraciones con el tratamiento del estándar o control, en este caso es la codeína fosfato, mediante la prueba de t de Dunnett (bilateral) a un nivel de confianza de 95%, la cual indica que si existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los tratamientos ensayados.

En la tabla 5, muestra los resultados de la comparación de las 3 diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico, mediante la prueba de Duncan a un nivel de confianza de 95%, la cual indica que si hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre estas concentraciones.

Mencionan que la saponina tiene un efecto expectorante y antitusígeno debido principalmente a la presencia de la glicerina que es una saponina, también tiene una acción antiulcerosa que estimula la producción de moco protector.<sup>61</sup>

Estudiaron el potencial de antitusivo *Glycyrrhiza glabra* y *Adhatoda vasica* usando una tos modelo inducido por dióxido de azufre de gas en ratones, en la cual el efecto los extractos de etanol de *Glycyrrhiza glabra* y *Adhatoda vasica* mostraron inhibición del reflejo de la tos en una dosis de 800 mg/kg y 200 mg/kg

de peso corporal por vía oral en comparación con el grupo de control. Los ratones mostraron una inhibición de 35,62 %, en el tratamiento de la tos con *Glycyrrhiza glabra* y la inhibición de 43,03 % en el tratamiento con *adhatoda vasica* dentro los 60 minutos de la prueba. La actividad antitusiva del extracto era comparable a la de sulfato de codeína (10 m/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg de peso corporal), que produjo 24,80 %, 32,98 %, 45,73 % de inhibición respectivamente a los 60 minutos del experimento<sup>7</sup>.

Los flavonoides son compuestos químicos derivados del benzopirano a los que se le han atribuido muy variados efectos farmacológicos, entre ellos: antiinflamatorio, antimicrobiano, antialérgico, hepatoprotector, antitrombótico, antineoplásico, antiulceroso, hormonal (estrógeno), antidiabético, expectorante, antihemorrágico, diurético y antiviral, muchos de los cuales se han comprobado *in vivo e in vitro*.<sup>62</sup>

Se afirma que las drogas activas sobre el aparato respiratorio (antitusígenos, antiasmáticos, mucolíticos y expectorantes) se debe a la presencia de metabolitos secundarios tales como: los alcaloides, naftoquinonas, saponosidos, oleorresinas, aceites esenciales, etc.<sup>63</sup>

Se investigó la comparación de los efectos antitusígenos de 20mg de fosfato de codeína, dextrometorfano 30 mg y 30 mg noscapina usando la tos inducida por ácido cítrico en sujetos normales. En la cual la protección por 20 mg de codeína, dextrometorfano 30 mg, noscapina 30 mg, y el placebo contra la tos inducida por ácido cítrico se determinó en dieciocho sujetos sanos. Dio como resultados que las diferencias de las drogas ocurrieron en dos horas y media después de la ingestión de los fármacos, pero o a una hora y quince minutos. Solo codeína 20 mg tuvo una mayor acción antitusígeno que el placebo, pero el dextrometorfano 30 mg también no difirió de la codeína 20 mg, pero si la noscapina 30 mg difirió con la codeína 20 mg, en conclusión esta técnica puede ofrecer una prueba de detección útil para la actividad de nuevos compuestos potenciales en el hombre.<sup>64</sup>

Por esta razón se eligió como estándar a la codeína por presentar mejor efecto terapéutico contra la tos.

El mecanismo de acción secretolítico de las saponinas ha sido opiniones controvertidas. Tradicionalmente se le ha atribuido su efecto irritante gástrico que provoca una estimulación vagal responsable a nivel bronquial de un incremento de secreción mucosa fluida. Este mecanismo según algunos autores, no parece

muy plausible, y proponen la hipótesis de que las saponinas actúan como tensioactivos directamente sobre la mucosa bronquial, disminuyendo la viscosidad de la secreción mucosa. No obstante algunos opinan que la concentración de saponinas que alcanza el pulmón tras la administración oral sería demasiado baja para explicar este efecto. Por otra parte se ha investigado que las saponinas tienen un efecto expectorante y broncodilatador, por inhibición de la internalización de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgica en las células del epitelio alveolar en las células del músculo bronquial.<sup>65</sup>

Por lo tanto se puede afirmar que la actividad antitusígena del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* "siete pisos" se debe al a presencia de los compuestos fenólicos, saponinas y los alcaloides.

## VI CONCLUSIONES

- 1 El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos", tiene actividad antioxidante y antitusígena.
- 2 El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos", posee los metabolitos secundarios como: flavonoides, saponinas, fenoles y taninos, catequinas, alcaloides, triterpenos y esteroides.
- 3 La concentración que presenta mejor actividad antioxidante y antitusígena del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos" fue de 400 mg/kg.

## VII RECOMENDACIONES

- 1 Proseguir con los estudios de la actividad antioxidante y antitusígena in vivo de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown puesto que demostró tener actividad antioxidante y antitusígena, sobre todo más actividad antitusígena.
- 2 Aislar los flavonoides responsables de dicha actividad, por métodos más específicos como por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).
- 3 Realizar estudios de toxicidad de las hojas *Leonotis nepetifolia* (L) Brown.
- 4 Realizar estudios de fraccionamiento con solventes de distintas polaridades a las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown, para determinar la actividad antioxidante y antitusígena.

## VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lagos G, Gediel V, Villegas S. especies reactivas de oxígeno y respuesta antioxidante en pacientes con VIH positivos y donantes voluntarios de sangre revista médica de Risalda [revista en internet]; 2012 [acceso 16 de setiembre de 2014]; 18(1):54-62. Disponible en: <http://recursosbiblioteca.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/3302/1/V18N1A9.pdf>
2. Pang W, Lin S, Dai Q, Zhang H, Hu J. Antitussive activity of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) pax extracts and improvement in lung function via adjustment of multi-cytokine levels. Moléculas [revista en internet]. 2011 [acceso, 14 de noviembre de 2013]; 16(4):3360-3370. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/16/4/3360>
3. Giachetto G. Cuando y como tratar la tos: un problema frecuente. Revista archivo pediatría. Montevideo Uruguay [revista en internet] 2001. [acceso 15 de agosto 2014]; 72(4). Disponible en: <http://www.scielo.edu.uy/pdf/adp/v72n4/giachetto-tos.pdf>.
4. Chaparro C, García A, Torres C. Neumología. 4ª ed. Medellín-Colombia: corporación de investigación biológica; 1993.
5. Goodman L Gilman A. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica; México: McGraw-Hill Interamericana; 1996.
6. Kanazawa H, Kurihara N, Hirata K, Takeda T. The role of free radicals in airway obstruction in asthmatic patients. CHEST Journal [revista en internet]. 1991 [acceso, 14 de noviembre de 2014]; 100(5):1319-1322. Disponible en: <http://journal.publications.chestnet.org/article.aspx?articleid=1064368>
7. Jahan, Y., & Siddiqui, H. H. Study of antitussive potential of *Glycyrrhiza glabra* and *Adhatoda vasica* using a cough model induced by sulphur dioxide gas in mice. International Journal of Pharmaceutical Sciences & Research [revista en internet]. 2012 [acceso, 14 de noviembre de 2013]; 3(6). Disponible en: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=09758232&AN=88282640&h=Q%2BF9I%2BctITGQvIcby1udtIseQv4sM5HSTkB3QaXSI5xf22%2Bfx%2FvqmxJVvEoux8%2BTe8hkuzeWxG8yc0MfPrNhXA%3D%3D&crl=c>
8. Chakraborty R, Biplab De ND, Sen S. Antitussive, expectorant activity of *Marsilea minuta* L., an Indian vegetable. Journal of advanced pharmaceutical technology & research [revista en internet]. 2013 [acceso 14 de noviembre de 2013]; 4(1):61. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3645357/>
9. Salami E, Ozolua R, Okpo S, Eze G, Uwaya DO. Studies on the anti-asthmatic and antitussive properties of aqueous leaf extract of *Bryophyllum pinnatum* in rodent species. Asian Pacific journal of tropical medicine [revista en internet]. 2013 [acceso, 14 de noviembre de 2013]; 6(6):421-425. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S199576451360067X>
10. Haq RU, Farooq U, Wahab A, Raza M, Ahmad VU, Khan RA. Investigation of antitussive and toxicological activity of *Ballota limbata* in mice. Pharmaceutical biology, [revista en internet]. 2011 [acceso 19 de abril de 2014]; 49(6):627-632. Disponible en: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/13880209.2011.563317>
11. Seema G, Vikas G, Bansal P, Ranjit S, Mukesh M. Herbal Antitussives and Expectorants – a Revive. Review Article [revista en internet] 2010 [acceso 17 de noviembre] 3(6): 1668-1674. Disponible en: <http://globalresearchonline.net/journalcontents/volume5issue2/Article-002.pdf>

12. Prakash U, Bhuvaneswari S, Balamurugan A, Vaishnavi S, Sunisha S, Sindhu M, et al, Sekar B. Studies on antibacterial, antioxidante, larvicidal, pesticidal activies and photochemistry of *Leonotis nepetifolia* (Linn) R.Br, [revista en internet]. 2013 [acceso 12 de setiembre de 2014]; 4(2), 303-309. Disponible en: <http://pharmascope.org/ijrps/downloads/Volume%204/Issue%202/31-10282.pdf>
13. Syed I., Suradka S. and Koche D. phytochemical analysis of *leonotis nepetifolia* (L.) r. br., a wild medicinal plant of lamiaceae. Bioscience Discovery [revista en internet]. 2012 [acceso 14 de setiembre de 2014]; 3(2): 197-196, Disponible en: <http://biosciencediscovery.com/Vol.%203%20No.%202/Imran%2052-54.pdf>
14. Usharani V, Anuradha V, Aroumougame S, Mathivanan N, Dhanalakshmi, Sagadevan E et al. Evaluation of antioxidant potential of leaves of *Leonotis nepetifolia* and its inhibitory effect on MCF7 and Hep2 cancer cell lines. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, [revista en internet]. 2013 [acceso 19 de setiembre de 2014]; 2013; 3(2): 103-110. Disponible en: <http://www.apjtdcm.com/zz/20132/3.pdf>
15. Parra H, García G, Nieto A, Martínez M. Anti-inflammatory Activity of Some Extracts and Isolates from *Leonotis nepetaefolia* on TPA-induced Edema Model. Rev. Soc. Quím. Méx [revista en internet] 2004 [acceso 17 de noviembre], 48, 293-295. Disponible en: <http://www.jmcs.org.mx/PDFS/V48/Vol4/16-Anti-inflammatory.pdf>
16. Dhawan NG, Khan AS, & Srivastava P. A general appraisal of *Leonotis nepetifolia* (L) R. Br: an essential medicinal plant. Bull. Env. Pharmacol. Life Sci [revista en internet]. 2013 [acceso, 14 de noviembre de 2013]; 2(8):118-121. Disponible en: [http://www.bepils.com/july\\_2013/19.pdf](http://www.bepils.com/july_2013/19.pdf)
17. Carvalho CA, Molinari RF, Silva SR, Pinto R, Fani MO. Medicinal plants used by the population of Viçosa, mg, brasil-preliminary study. Revista Eletrônica de Farmácia [revista en internet]. 2011 [acceso, 14 de noviembre de 2013]; 8(4):14. Disponible en: <https://www.revistas.ufg.br/index.php/REF/article/view/16648>
18. Pingale R, Pokharkar D, Phadtare S. A Review on ethnopharmacolgy, phytochemistry and bioactivity of *Leonitis nepetifolia*. International Journal of PharmTech Research [revista en internet]. 2013 [acceso, 14 de noviembre de 2013]; 5(3). Disponible en: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=sit e&authtype=crawler&jrnl=09744304&AN=90515929&h=MEELkwshk1ytGWbwTRRKJFazuxXrsHevoR3d2txUfdEAaqC7dTd5rOGBByi8auuIKLDmEZktpI71xMu%2BiAVC1g%3D%3D&crI=c>
19. Kumar, S., Madaan, R., Bansal, G., Jamwal, A., & Sharma, A. Plants and plant products with potential anticonvulsant activity a review. Pharmacognosy Communications [revista en internet]. 2012 [acceso, 14 de noviembre de 2013]; 2(1):3-99. Disponible en: <http://phcogcommn.org/sites/default/files/Plant%20Drugs.pdf>
20. Ayanwuyi LO, Yaro AH, Adamu HYS. Studies on anticonvulsant activity of methanol capitulum extract of *Leonotis nepetifolia* Linn. Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences [revista en internet]. 2009 [acceso, 14 de noviembre de 2013]; 8(1):73-79. Disponible en: <http://www.njps.net/pdf/62.pdf>
21. Cruz J, Licea M, Hernández P, Enrique A, Yanes M. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. Rev. Mex Patol Clin [revista en internet]. 2011 [acceso, 05



- de noviembre de 2013]; 58(1):4-15. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2011/pt1111b.pdf>
22. Cotran R, Kumar V, Robbins T. Patología estructural y funcional. 6ª ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2000.
  23. Echavarría B, Franco A, Martínez A. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuesto fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe de Colombia. VITAE, Rev. de la Facultad de Química Farmacéutica [revista en internet] 2009. [acceso enero2014]; 16(1): 126-131. Disponible en: <https://www.senam.mx/simposio2009/sm/compuestofenolicos/M2/SM2009-M220-1108.pdf>
  24. Rodríguez J, Menéndez J, Trujillo Y. Radicales libres en la biomédica y estrés oxidativo. Rev. Med. Milit. "Dr. Luis Díaz Soto" Cuba [revista en internet]. 2001. [acceso noviembre 2013]; Vol. 30(1): 36-44. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol30\\_1\\_01/mil07100.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol30_1_01/mil07100.pdf)
  25. Maldonado S, Jiménez V, Guapillo V, Ceballos R, Méndez B. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónicas-degenerativas. Rev Med UV, [revista en internet] 2010. [acceso diciembre 2013 ]; Vol. 1(1): 1-8 Disponible en: [http://www.uv.mx/rm/num\\_anteriores/revmedica\\_vol10\\_num2/articulos/radicales.pdf](http://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol10_num2/articulos/radicales.pdf)
  26. Venero J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidante. Rev. Cubana Med. Milit. [revista en internet]. 2002. [acceso noviembre 2013]; 30(1): 15-20. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol31\\_2\\_02/MIL09202.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol31_2_02/MIL09202.pdf)
  27. Halliwell B. antioxidants in human health and disease. Annu. Rev. Nutri. [revista en internet]. 1996 [acceso, 28 de noviembre de 2013]; 16:33-50. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.Un.16.070196.000341>
  28. Kumar V, Kumar S. Plants as natural antioxidants. Revista Natural Product Radiance [revista en internet]. 2006 [acceso, 05 de Diciembre de 2013]; 5(4):326-334. Disponible en: [http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/7962/1/NPR%205\(4\)%20326-334.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/7962/1/NPR%205(4)%20326-334.pdf)
  29. Urgantondo, V. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente al estrés oxidativo en modelos celulares. Universidad de Barcelona, facultad de Farmacia. España.
  30. Criado C, Moya M. Vitaminas y antioxidantes. Servicio de Medicina Interna y Urgencias. Ed. Sanidad y Ediciones, S.L. Barcelona. actuaciones el médico.
  31. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. 2da Edición. Fondo editorial; 1994.
  32. Muñoz, A.; ramos, E.; Evaluación de la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos en recursos en recursos vegetales promisorios. Centro de investigación y bioquímica y nutrición. Facultad de Medicina humana. Lima. USMP: Perú.
  33. Gimeno E. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. OFFARM, ámbito farmacéutico nutrición, [revista en internet] 2004. [acceso diciembre 2014]; 23(6). Disponible en [http://apps.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet\\_f=10&pident\\_articulo=13063508&pident\\_usuario=0&pident\\_revista=4&fichero=4v23n06a13063508pdf001.pdf](http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet_f=10&pident_articulo=13063508&pident_usuario=0&pident_revista=4&fichero=4v23n06a13063508pdf001.pdf)
  34. Villar del fresno, A. farmacognosia general. Editorial Síntesis. España. 1999.

35. Zapata K, Cortes F, Rojano B. polifenoles y actividad antioxidante del fruto de guayaba agria (*psidium araca*) alimentos y biotecnología [revista en internet] 2013 [acceso octubre 2014]; 24(5): 1-14 disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?S071807642013000500012&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?S071807642013000500012&script=sci_arttext)
36. Bruneton J. Plantas medicinales. Fitoquímica y farmacognosia. Editorial Acribia. S.A. Zaragoza-España. 2001
37. Edna A. Determinación de perfil de compuestos fenólicos en arazá (*Eugenia stipitata*). [tesis de maestría]. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogota D.C., Colombia. 2012.
38. Cartaya O, Reynaldo I. Flavonoides Características químicas y aplicaciones revistas científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal [revista en internet] 2001. [acceso julio 2015]; vol. 22, Núm. 2,2001, Pp 5-14. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215009001>
39. Martinez S, Gonzalez J, Culebras J, Tuñón M. los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Rev. Nutr. Hosp [revista en internet] 2002. [acceso en agosto 2015]; 17(6): 271-278. Disponible en: [http://www.recursosdeenologia.com/docs/2002\\_los\\_flavonoides\\_propiedades-y\\_acciones\\_antioxidantes.pdf](http://www.recursosdeenologia.com/docs/2002_los_flavonoides_propiedades-y_acciones_antioxidantes.pdf)
40. Inocente C. Actividad antioxidante y antimicrobiana de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de la corteza de *Tripalis americana* L. (tangarana colorada). [tesis pregrado]. Universidad Mayor de San Marcos. Facultad de farmacia y bioquímica Lima-Perú 2009
41. Gonzales J. Caracterización de Compuestos Fenólicos Presentes en la Semilla y Aceite de Chía (*Salvia hispánica* L), mediante electroforesis capilar. [Tesis maestría]. México, D.F. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Instituto Politécnico Nacional. 2010.
42. Molynex p. The use of the stable free radical diphenyl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Sangklanakaran J.sci. technol. [revista en internet] 2003.[acceso setiembre 2014]; 26(2): 211-219. Disponible en: <http://rdo.psu.ac.th/sjstweb-old/journal/26-2/07-DPPH.dpf>
43. Harrison J. Manual de Medicina Interna. 17ª ed. México DF: Mc. Graw. Hill; 2010.
44. Guyton A, Hall J. Tratado de fisiología médica. 10ª ed. España: McGraw-Hill interamericana; 2001
45. Flórez J. Fármacos antitusígenos y mucolíticos. En: Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A. Farmacología humana. 5ª ed. Barcelona: Editorial Elsevier Masson. 2008. p. 827-837
46. Morcillo EJ, Cortijo J. Fármacos expectorantes, antitusígenos y mucolíticos En: Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza JC, Moro MA, Portolés A. Velázquez, Farmacología Básica y Clínica. 18ª ed. Madrid: Editorial Panamericana; 2009. p.717-728
47. Taylor M, Reide P. Farmacología. Barcelona: Harcourt Brace; 1999.
48. Flores R. Farmacología Humana. 2ª ed. Barcelona: Ediciones científicas y técnicas S.A.; 2003
49. Ministerio de Salud Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas. Formulario Nacional de Medicamentos Esenciales. Lima-Perú; 2008
50. Goodman L Gilman A. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica; Mexico: McGraw-Hill Interamericana; 1996
51. Lorenzo P, Moreno A, Leza J, Lizasoain L. Moro M. Velázquez, Farmacología Básica y clínica. 18ª ed. Madrid. España: Medica Panamericana; 2008

52. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales. Universidad La Habana: Universidad de La Habana; 2000.
53. Aguilar J. Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante e inmunomoduladora. [Tesis de Maestría]. Lima. Servicio de publicaciones e intercambio científico; UNMSM; 2007.
54. Arroyo JL, Cisneros CB, Modelos experimentales de investigación farmacológica. Lima: Asdimor; 2012.
55. Castañeda, C.; Ramos E.; Ibáñez, V. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Revista Horizonte Medico – Vol. 8 N° 1.
56. Miranda M. Métodos de Análisis de Drogas y Extractos. Universidad de la Habana – Cuba; 1996.
57. Schonfeldt P, Céspedes J, Supulveda R, Salamanca M. Aumento del umbral tusígeno en sujetos sanos con el uso de la levodropropizina. Revista Chilena de enfermedades respiratorias [revista en internet] 2005. [acceso 5 de setiembre de 2015]; 21(3): 165-70 Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rcher/v21n3/art03.pdf>.
58. Gola G. Tratado de Botánica 2ª ed. Barcelona-España: Labor S.A; 1965
59. Pietta PG. Flavonoides as antioxidants. J. Nat. Prod [revista en internet]. 2000 [acceso 09 de julio 2015]; 63(7):1035-1042. Disponible en: [http://www.ff.ul.pt/FCT/PTDC/QUI-QUI/101535/2008/\(Pietta%20P-G2000\).pdf](http://www.ff.ul.pt/FCT/PTDC/QUI-QUI/101535/2008/(Pietta%20P-G2000).pdf)
60. Litter M. farmacología experimental y clínica. 6ª ed. Buenos Aires: Talleres Gráficos; 1980
61. Kuklinski C. farmacognosia: Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural. Barcelona: Omega; 2003
62. Del pilar V, De la Caridad M, Rosales R, De la Caridad R, Leon J; Vdiadl M. Evaluacion farmacológica de *Pluchea carolinensis* jacq (salvia de la playa) en animales de experimentación. Revista Cubana Plantas Medicinales [revista en internet] 1999 enero. [acceso 20 de setiembre de 2015]; 6(3). Disponible en: [http://pvs.sid.cu/revistas/pla/vol4\\_2\\_99/pla04299.htm](http://pvs.sid.cu/revistas/pla/vol4_2_99/pla04299.htm)
63. Bravo L. Farmacognosia. Madrid España: Elsevier España S.A.; 2003.
64. Empey D, Laitinen L Young G, Bye C, Hugles D. Comparison of the goods antitussivos of 20 mg of phosphate of codeine, dextrometorfano 30 mg and 30 mg noscapina using the cough induced by citric acid in normal fellows. Revista europea de farmacología clínica [revista en internet] 1979 [acceso 5 noviembre]. Disponible en: <http://springer.com/article/10.1007/BF00568199>
65. Villa R, Cañigüeral S. La Hoja de Hiedra en el tratamiento de las Afecciones de Vías Respiratorias: Evidencias Preclínicas Y Clínicas. Revista de Fitoterapia. [revista en internet]; 2011 [acceso 17 de noviembre]; 11(1): 5-20. Disponible en: <http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RDF%2011.1-Hiedra.pdf>

**ANEXO**

## Anexo 1

### Certificado taxonómico de *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown. Ayacucho 2013



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN  
CRISTÓBAL DE HUAMANGA

### C E R T I F I C A

Que, el Bach. en Farmacia y Bioquímica, Sr. Roy Ronald, ÑAHUI CORAS, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	LAMIALES
FAMILIA	:	LAMIACEAE
GENERO	:	Leonotis
ESPECIE	:	<i>Leonotis nepetifolia</i> ( L.) Brown.
N.V.	:	"siete pisos"

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

Ayacucho, 26 de Noviembre del 2013

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Herbario Huamangensis  
  
Dpto. Ayacucho - Huamanga - Perú  
JEFE

## Anexo 2

### Descripción botánica de *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown Ayacucho – 2013

#### DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

**Nombre científico :** *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown.

**Nombre vulgar :** "siete pisos"

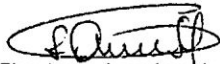
**Familia :** LAMIACEAE

#### **CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA:**

Es una planta herbácea anual, de aproximadamente 2 metros de alto; de tallos simples o poco ramificados, aristados, hojas simples, largamente pecioladas de limbo obovado con el ápice puntiagudo y base atenuada, de bordes lobulados, de disposición opuesta, penninervias y provistos de pelos. Inflorescencias en verticilos globosos, con muchas flores dispuestas en los nudos del tallo; flores tubuladas, bilabiadas, muy vistosas, de aspecto aterciopelado, heteroclamídeas, bisexuales pentámeras, de simetría zigomorfa: cáliz de 5 sépalos soldados en la base con 5 dientes conspicuos en el ápice en forma de espinas, con el diente posterior más largo y ancho que el resto, corola con 5 pétalos anaranjados o rojos formando un tubo largo que termina en 2 labios; labio superior formado por 3 pétalos soldados, densamente pubescente y labio inferior con 2 pétalos soldados casi sin pelos; Estambres libres en número de 4 didinamo (2 largos y 2 cortos); ovario súpero de estilo ginobásico, bicarpelar, tetralocular conteniendo un óvulo en cada lóculo, fruto tetraquenio.

#### **HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN:**

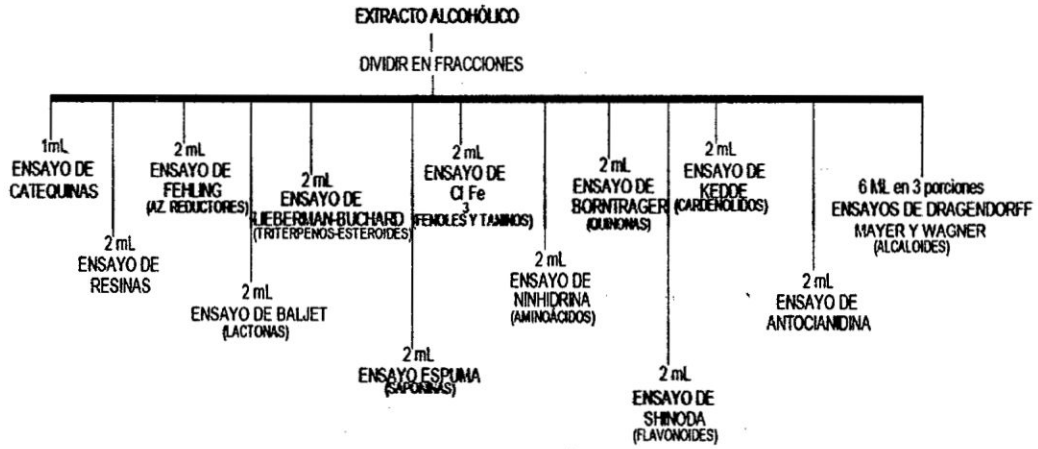
Es una especie originaria del África, se ha naturalizado en muchos lugares de América tropical, en nuestra región crece en forma silvestre en zonas cálidas y templadas, terrenos secos, en bordes de camino, terrenos abandonados.



Blga. Laura Aucasime Medina.

### Anexo 3

Esquema de las reacciones a realizarse en el extracto hidroalcohólico<sup>21</sup>



Anexo 4

Foto de *leonotis nepetifolia* (L.) Brown, tomado en los jardines de la Ciudad Universitaria – UNSCH. Ayacucho - 2014





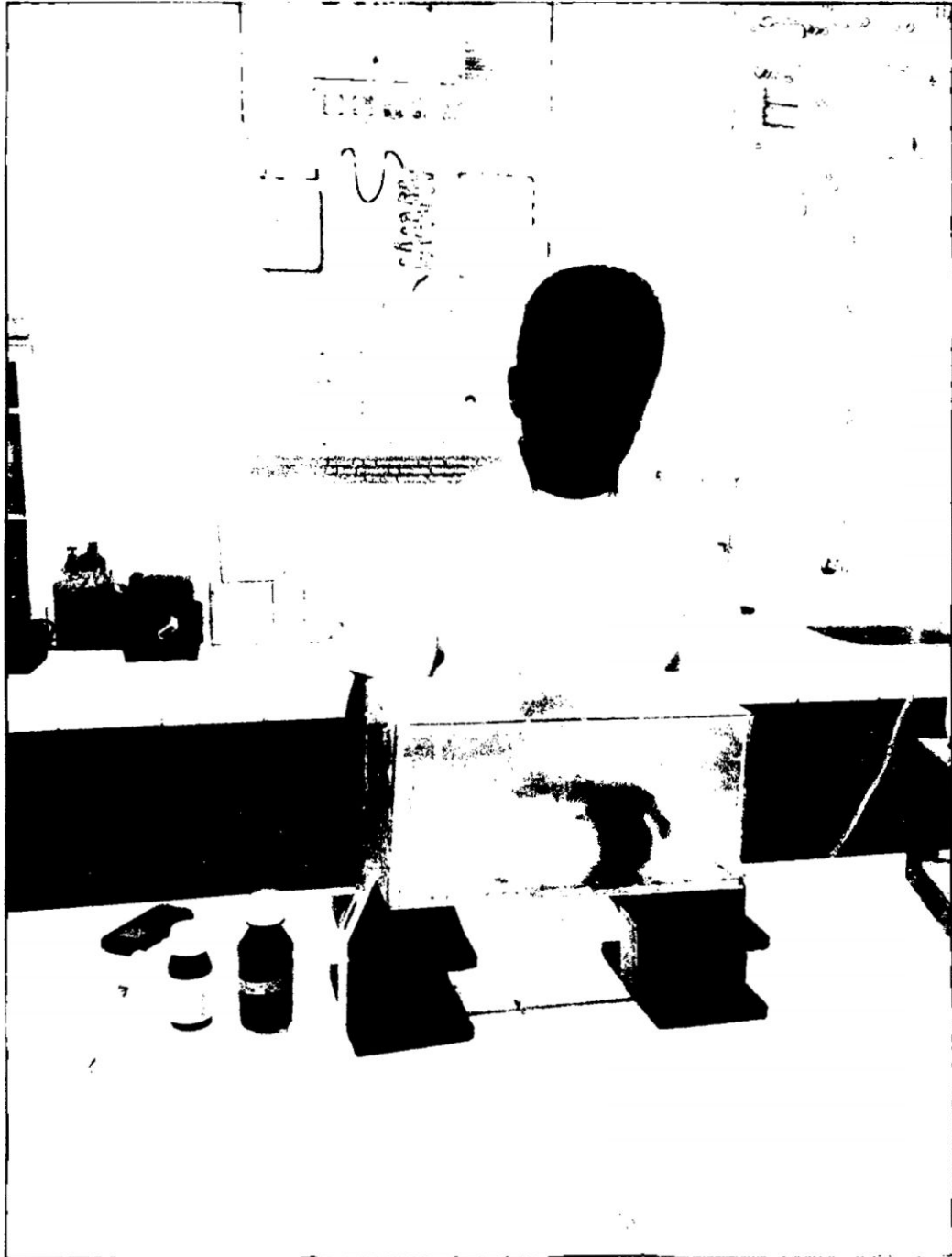
## Anexo 5

Pesado de cobayos, realizado en laboratorio de Farmacología de Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica – UNSCH. Ayacucho - 2015



**Anexo 6**

Observacion de número toses, realizado en laboratorio de Farmacología de Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica – UNSCH. Ayacucho - 2015



### Anexo 7

**Tabla 5.** Analisis de varianza del porcentaje de la actividad secuestradora del DPPH porparte de los metabolitos secundarios del extracto hidroalcoholico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* L. Brown "siete pisos", Ayacucho - 2015

#### ANOVA

##### ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4150,296	5	830,059	4069,056	,000
Dentro de grupos	2,448	12	,204		
Total	4152,744	17			

### Anexo 8

**Tabla 6.** Comparación de medias mediante la prueba de Tukey la actividad antioxidante del ácido ascórbico y de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown “siete pisos”, Ayacucho – 2015

#### ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

HSD Tukey <sup>a</sup>

TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Extracto 10ug/ml	3	56,0000			
Extracto 50ug/ml	3		77,6667		
Extracto 100ug/ml	3			83,6667	
Vit C 100ug/ml	3				97,4167
Vit C 50ug/ml	3				97,6250
Vit C 10ug/ml	3				98,1667
Sig.		1,000	1,000	1,000	,379

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

## Anexo 9

**Tabla 7.-** Comparación de medias mediante la prueba de Dunnett de la actividad antitusígena de codeína fosfato y de los tratamientos administrados del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown "siete pisos", Ayacucho - 2015

### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: ACTIVIDAD ANTITUSIGENA

T de Dunnett (bilateral)<sup>a</sup>

(I) TRATAMIENTO	(J) ESTANDAR	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Extracto 100mg/kg	codeína	-35,55556*	4,84322	,000	-48,1108	-23,0003
Extracto 200mg/kg	codeína	-17,77778*	4,84322	,006	-30,3331	-5,2225
Extracto 400mg/kg	codeína	15,55556*	4,84322	,014	3,0003	28,1108

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

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

### Anexo 10

**Tabla 8.-** Comparación de medias mediante la prueba de Duncan de la actividad antitusígena de los tratamientos administrados del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown “siete pisos”, Ayacucho - 2015

#### ACTIVIDAD ANTITUSIGENA

Duncan<sup>a</sup>

TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Extracto 100mg/kg	5	40,0000		
Extracto 200mg/kg	5		57,7778	
Extracto 400mg/kg	5			91,1111
Sig.		1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5,000.

**Anexo 11**  
**Matriz de consistencia**

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	MARCO TEÓRICO	METODOLOGÍA
Actividad antioxisigena del extracto hidroalcohólico de <i>Leonotis nepetifolia</i> "siete pisos". Ayacucho 2014.	¿Tendrá actividad antioxisigena el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> ?	<b>General</b> -Evaluar la actividad antioxisigena del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> "siete pisos".  <b>Específicos</b> -Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> "siete pisos". -Determinar el porcentaje de captación del radical libre DPPH en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> "siete pisos". -Evaluar la dosis con mejor actividad antioxisigena del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> "siete pisos" respecto al estándar codeína.	El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> "siete pisos" posee actividad antioxisigena y antioxisigena.	<b>Variable independiente</b> -Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> "siete pisos".  <b>Indicador</b> -Dosis de 150, 300 y 600 mg/kg -Concentraciones de 10, 50 y 100 µg/ml.  <b>Variable dependiente</b> -Actividad antioxisigena. -Actividad antioxisigena. <b>Indicador:</b> -Número de toses. -Porcentaje de actividad antioxisigena (%AA)	<b>Antecedentes.</b> <i>Leonotis nepetifolia</i> Farmacobotánica <b>Estudio farmacológico</b> <b>Composición química</b> <b>Radicales libres.</b> Especies químicas con un electrón desapareado en su orbital más externo lo que le da una configuración espacial inestable, por lo tanto una gran capacidad para reaccionar con otras sustancias <b>Estrés oxidativo</b> <b>Antioxidantes</b> <b>La tos.</b> Es una espiración explosiva que actúa como mecanismo protector para limpiar el árbol traqueobronquial de las secreciones y del material extraño. <b>Mecanismo de la tos.</b> La rama aferente comprende los receptores situados en el territorio de distribución sensorial de los nervios trigémino, glossofaríngeo, laríngeo superior y vago. La rama eferente comprende el nervio laríngeo recurrente y los nervios raquídeos. <b>Antitusivos y su clasificación.</b> <b>Codeína.</b> Es el fármaco antitusígeno más utilizado y su efectividad sirve de referencia a nuevos fármacos. Deprime el "centro de la tos" localizado en el tronco del encéfalo.	<b>Nivel de investigación.</b> Básica experimental <b>Población:</b> Hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> "siete pisos" que crece en los jardines de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, región Ayacucho. <b>Muestra.</b> 2.5 kg de hojas de <i>Leonotis nepetifolia</i> "siete pisos". <b>Unidad experimental:</b> 25 cobayos machos de 650+/- 50 g, adquiridos del INIA, Ayacucho. <b>Recolección de la muestra</b> <b>Obtención del extracto hidroalcohólico</b> <b>Tamizaje fitoquímico:</b> <b>Evaluación de la actividad antioxisigena:</b> Según el procedimiento propuesto por Arroyo y Cisneros <b>Determinación de la actividad antioxisigena mediante secuestro del radical libre (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), DPPH.</b> Según el procedimiento descrito por Aguilar <b>Diseño experimental.</b> Aleatorio, con cinco grupos de cinco unidades experimentales cada uno. <b>Análisis estadístico:</b> Los resultados de la actividad antioxisigena se expresaron mediante gráficos en función de las medias de desviación estándar. Las diferencias entre las medias serán contrastadas mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey con un nivel de significancia estadística del 95%. Del mismo modo, para la actividad antioxisigena, se expresarán mediante el Análisis de Varianza entre las tres concentraciones del ensayo farmacológico, con un nivel de significancia estadística del 95%. Las comparaciones entre cada tratamiento se realizó mediante la prueba de Dunnett y Duncan, con un nivel de confianza de 95%, para cuyo efecto se recurrirá al uso del programa SPSS versión 21.

# Actividad antioxidante y antitusígena del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* L. Brown “siete pisos”. Ayacucho – 2014

Roy Ronald Ñahui Coras.<sup>1</sup> Edwin Carlos Enciso Roca.<sup>2</sup>  
Farmacia y Bioquímica: UNSCH

## RESUMEN

La contaminación y la mala alimentación son una de las causas que desencadenan problemas hepáticos y bronquiales. El objetivo principal de este trabajo de investigación fue determinar la actividad antioxidante y antitusígena del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown “Siete pisos”, se desarrolló en el laboratorio del área de Farmacia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga en la ciudad de Ayacucho. El tipo de investigación realizado fue básico experimental. La muestra fue recolectada en los jardines de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, región Ayacucho. Para evaluar la actividad antioxidante y antitusígena, se realizó el tamizaje fitoquímico siguiendo los protocolos establecidos por Lock de Ugaz y Miranda Cuellar. La actividad antioxidante, se evaluó por la captación del radical DPPH usando como patrón de referencia ácido ascórbico. Se determinó la presencia de los metabolitos secundarios tales como: flavonoides, taninos y/o fenoles, alcaloides, quinonas, triterpenos-esteroides, catequinas, saponinas. Para la determinación de la actividad antitusígena se ha empleado el modelo in vivo, en Cobayos machos, divididos en 5 grupos, donde se administró como: blanco (solución salina fisiológica), fármaco de referencia (codeína fosfato) y los extractos hidroalcohólicos a una dosis de 100, 200 y 400 mg/kg. la captación de radical DPPH se expresaron en porcentajes de captación de radical DPPH que dieron como resultado 83,7; 77,7 y 56 % siendo la concentración de 400 mg/kg con 83.77 % de mayor actividad antioxidante. De igual modo La actividad antitusígena se expresó en porcentajes de inhibición de la tos la cual dió como resultado 75,6; 57,8 y 40 %, siendo la concentración de 400 mg con 75,6 % de mayor actividad antitusígena. Se concluye que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown “siete pisos” tiene actividad antioxidante y antitusígena.

**Palabras clave:** Actividad antioxidante y antitusígena, *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown.

## SUMMARY

Pollution and poor diet are one of the causes that trigger liver and bronchial problems. The main objective of this research was to determine the antioxidant and antitussive activity of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown "Seven floors", developed in the laboratory the area of Pharmacy of the National University of San Cristobal Huamanga in the city of Ayacucho. The research was conducted experimental basic. The sample was collected in the gardens of the National University of San Cristobal de Huamanga, District of Ayacucho, province of Huamanga, Ayacucho region. To evaluate the antioxidant and antitussive activity, the phytochemical screening was performed following the protocols established by Lock Ugaz and Miranda Cuellar. The antioxidant activity was evaluated by using DPPH radical uptake of ascorbic acid as a standard reference. flavonoids, tannins and / or phenols, alkaloids, quinones, steroids triterpenes, catechins, saponins, the presence of secondary metabolites such as was determined. To determine the antitussive activity has been used in vivo model, male guinea pigs were divided into 5 groups, where administered as white (physiological saline), reference drug (codeine phosphate) and hydroalcoholic extracts at a dose 100, 200 and 400 mg / kg. DPPH radical uptake expressed as a percentage of DPPH radical uptake which resulted 83.7; 77.7 and 56% with the concentration of 400 mg / kg with 83.77% higher antioxidant activity. Likewise The antitussive activity was expressed in percent inhibition of cough which resulted 75.6; 57.8 and 40%, with the concentration of 400 mg with 75.6% greater antitussive activity. It is concluded that the hydroalcoholic extract of leaves of *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown "seven-story" has antioxidant and antitussive activity.

**Keywords:** antioxidant and antitussive activity, *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown.



## INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad se conoce el uso medicinal de las plantas; la naturaleza proporciona un gran número de compuesto que se aplican como medicamentos, alimentos colorantes, los cuales han servido como fuente de inspiración para la síntesis de nueva moléculas con actividad biológica. En países como Perú existen numerosas plantas con propiedades medicinales de carácter relevante que se viene utilizando de manera empírica desde nuestros ancestros. El estrés oxidativo se origina por desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la capacidad antioxidante celular (CAC), la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) mitocondrial es constante, entre 2% y 5% del oxígeno para la cadena respiratoria se reduce para generar el anión superóxido,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2^-$ ,  $OH^-$  radicales libres potencialmente dañinos para la célula.<sup>1</sup> La tos es un reflejo defensivo indispensable y también es un síntoma común de enfermedades tales como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el cáncer de pulmón. El control de la tos sigue siendo una importante necesidad médica no cubierta y, a pesar de que los opioides de acción central se han mantenido como los medicamentos antitusivos de elección desde hace décadas poseen muchos efectos secundarios no deseados, como la sedación y los síntomas gastrointestinales.<sup>2</sup>

Uno de los síntomas más molestos y agotadores de las enfermedades respiratorias, sin duda alguna es la tos. Impide hablar, ocasiona ruido, no deja dormir bien, lastima la garganta y provoca dolores de pecho y torax cuando esta es fuerte, persistente o dura mucho si esta se extiende más de 10-14 días, pasa a ser un síntoma de alarma.<sup>3</sup>

La tos es un mecanismo de defensa que protege las vías aéreas de los efectos adversos de las sustancias inhaladas. Sirve además para expulsar las secreciones que se acumulan cuando se altera el mecanismo normal de limpieza mucociliar.<sup>4</sup>

El reflejo es complejo o abarca al sistema nervioso central y periférico, lo mismo que al músculo liso del árbol bronquial. Se ha sugerido que la irritación de la mucosa bronquial produce broncoconstricción, la cual, a su vez, estimula a los receptores de la tos

(que tal vez represente un tipo especializado de receptor de estiramiento) localizados en los receptores traqueobronquiales.<sup>5</sup>

De otro lado, respecto al papel de los radicales libres en la obstrucción de las vías respiratorias en pacientes asmáticos, existen evidencias que apoyan la correlación entre la gravedad de la enfermedad y de la producción de radicales de oxígeno por los neutrófilos en pacientes asmáticos que sugieren que las especies reactivas de oxígeno podrían jugar un papel directo o indirecto en la modulación de la inflamación de las vías respiratorias.<sup>6</sup>

En este sentido, dado que *Leonotis nepetifolia*, una especie de distribución mundial y al alcance de la mayoría de la población, sobre la base de su uso en la medicina tradicional como antiasmático, se realizó el presente estudio para evaluar la actividad antioxidante y antitusígena del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown que se atribuyen propiedades terapéuticas en el tratamiento de la degeneración, muerte celular y la tos, para este trabajo de investigación se desarrolló mediante la captación de radical DPPH y un modelo animal de tos refleja inducida por ácido cítrico en cobayos previamente seleccionados según la metodología de investigación.<sup>6</sup>

### Objetivo general

- Evaluar la actividad antioxidante y antitusígena del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos".

### Objetivos específicos

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos".
- Determinar el porcentaje de captación del radical libre DPPH en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos".
- Evaluar la dosis con mejor actividad antitusígena del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos", respecto al estándar codeína.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### Actividad antioxidante

Los resultados de la actividad antioxidante se

expresaron mediante gráficos en función de las medias de desviación estándar. Las diferencias entre las medias fueron contrastadas mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey, con un nivel de significancia estadística del 95%.

#### Actividad antitusígena

Del mismo modo, para la actividad antitusígena, se expresaron mediante el Análisis de Varianza entre las tres concentraciones del ensayo farmacológico, con un nivel de significancia estadística del 95%. Las comparaciones entre cada tratamiento se hizo con la prueba Duncan y Dunnett, para cuyo efecto se recurrió al uso del programa SPSS versión 21.

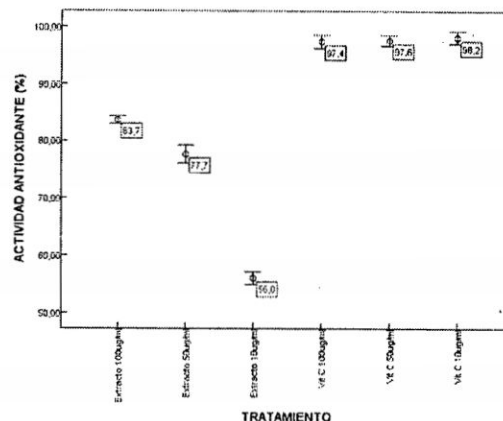
### RESULTADOS

**Tabla 4.-** Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* “siete pisos”, Ayacucho – 2015

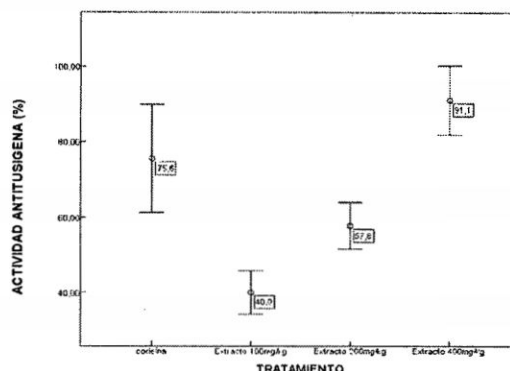
Metabolitos secundarios	Ensayos	Observaciones	Resultados
Flavonoides	Shinoda	Coloración rojo intenso	+++
Saponinas	Espuma	Formación de espuma	+++
Fenoles y taninos	Cloruro férrico	Coloración verde intenso	+++
Catequina	Catequinas	Color verde carmelita	+++
Alcaloides	Hager	Coloración naranja	+++
Alcaloides	Mayer	Formación de precipitado blanco	+
Alcaloides	Wagner	Formación de precipitado marrón	+++
Triterpenos y esteroides	Liebermann-burchard	Coloración verde oscuro- negro	+++

#### Leyenda:

- (+) : Escaso  
 (++) : Moderado  
 (+++) : Abundante



**Figura 3.-** Variación de porcentaje de actividad antioxidante por efecto de ácido ascórbico y el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown “siete pisos”, Ayacucho – 2015.



**Figura 4.-** Variación de porcentaje de actividad antitusígena por efecto de la administración de la codeína y el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown “siete pisos” en cobayos, Ayacucho – 2015.

### DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación viene a ser una contribución al conocimiento terapéutico de las propiedades farmacológicas del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L.) Brown “siete pisos” que fueron recolectadas y seleccionadas en los jardines de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Afirman que los extractos hidroalcohólicos son los que extraen la mayor diversidad de componentes químicos presentes en drogas. En donde la concentración de principios activos es óptima, facilitándose la dosificación de los mismos.<sup>57</sup>

El tamizaje fitoquímico se realizó siguiendo los protocolos establecidos por Lock de Ugaz y Miranda Cuellar.

En la tabla 1, muestra los resultados del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos" como: flavonoides, saponinas, fenoles y taninos, catequinas, alcaloides, triterpenos y esteroides. La prueba de Shinoda identifica la presencia flavonoides formándose una coloración de rojo a amarillo para que sea positivo, en la identificación de fenoles y/o taninos se indica que debe observarse una coloración azul verdosa al agregar unas gotas de cloruro férrico, así mismo, la prueba de catequinas se evidencian por fluorescencia verde al exponer a la luz UV<sup>31</sup>

Para identificar la presencia de alcaloides se debe evidenciar la presencia de precipitado<sup>52</sup>, para la identificación de saponinas debe observarse la formación de espuma<sup>31</sup>. Estudio realizados por otros autores corroboran la presencia de estos metabolitos encontrados mediante el tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos", se evidenció mediante el tamizaje fitoquímico realizado en diferentes solventes, la presencia de: alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, glucósidos, esteroides y saponinas<sup>13</sup>

Una manera de inducir el reflejo de la tos y así estudiar su fisiología y la posibilidad de modificación terapéutica, está dada por inhalación de diferentes sustancias, agua destilada, partículas, sustancias broncoconstrictoras tales como histamina o metacolina y sustancias irritantes como el ácido cítrico o capsaicina.<sup>58</sup>

En la figura 3, se muestra los resultados del porcentaje de captación de radical libre DPPH en el extracto hidroalcohólico *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos," todas las muestras al decolorar el DPPH, con un porcentaje de captación del radical libre en 83.875%, 77.1225% y 56.25% a concentraciones de 100, 50 y 10 µg/ml respectivamente. Los resultados fueron comparados con el estándar ácido ascórbico, que mostró tener actividad antioxidante en un 96,875 %, 97,25 % y 97,75 % a concentraciones de 100, 50 y 10 µg/ml. Es importante recalcar que la actividad

antioxidante es dependiente de la concentración del extracto y del microambiente en el que se encuentra el compuesto, pudiendo interactuar entre sí, produciéndose efectos sinérgicos o inhibitorios.

En la tabla 2, se observa el análisis de varianza para el porcentaje de inhibición de la tos por tratamiento de los extractos hidroalcohólicos, demostrando que son significativos a un nivel de confianza del 95%, indicando que si existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los tratamientos ensayados.

En la tabla 3, muestra los resultados de la prueba de Tukey para el porcentaje de la inhibición de la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólico *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos", donde la actividad antioxidante de las tres diferentes concentraciones son estadísticamente diferentes entre sí, pero el porcentaje de la actividad antioxidante de ácido ascórbico (100, 50 y 10 µ/ml) son estadísticamente similares, también son diferentes los porcentajes de la actividad antioxidante entre la muestra y el estándar.

La actividad antioxidante se evaluó utilizando el método de captación de radical 1,1 difenil-2-picril hidracilo (DPPH), donde se observa que los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico mostraron actividad antioxidante dependiente de la concentración (GRAFICO N° XI), pero la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos" en comparación del control ácido ascórbico fue en menor porcentaje (ANEXO 6). De la actividad antioxidante de los flavonoides se sabe que las flavonas y flavonoles se muestran activos contra los radicales libres<sup>36</sup>

Además, flavonoides como la quercitina y el kaempferol son importantes para el control de las concentraciones intracelulares de glutatión. Actuando a nivel del gen de regulación, son capaces de aumentar el nivel en un 50%, induciendo el sistema antioxidante celular y contribuyendo así a la prevención de enfermedades<sup>39</sup>

Por lo tanto se puede afirmar, que la actividad antioxidante del hidroalcohólico *Leonotis nepetifolia* (L) Brown "siete pisos," se debe a la presencia de los compuestos fenólicos tales como los ácidos fenólicos y flavonoides.

En la figura 4, se muestra los resultados de la actividad antitusígena, para el porcentaje de inhibición de la tos por tratamientos con diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* "siete pisos" L Brown, demostrando que la concentración de mayor actividad inhibitoria de la tos es de 400 mg/kg con 91,1% de actividad antitusígena comparado con el estándar que tuvo 75,6% de actividad antitusígena, menor que la muestra. De esta manera se demostró que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Leonotis nepetifolia* "siete pisos" L Brown tiene actividad antitusígena.

La tabla 4, muestra las diferencias significativas del tratamiento del extracto hidroalcohólico en diferentes concentraciones con el tratamiento del estándar o control, en este caso es la codeína fosfato, mediante la prueba de t de Dunnett (bilateral) a un nivel de confianza de 95%, la cual indica que si existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los tratamientos ensayados.

En la tabla 5, muestra los resultados de la comparación de las 3 diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico, mediante la prueba de Duncan a un nivel de confianza de 95%, la cual indica que si hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre estas concentraciones.

Mencionan que la saponina tiene un efecto expectorante y antitusígeno debido principalmente a la presencia de la glicerina que es una saponina, también tiene una acción antiulcerosa que estimula la producción de moco protector.<sup>61</sup>

Se investigó la comparación de los efectos antitusígenos de 20mg de fosfato de codeína, dextrometorfano 30 mg y 30 mg noscapina usando la tos inducida por ácido cítrico en sujetos normales. En la cual la protección por 20 mg de codeína, dextrometorfano 30 mg, noscapina 30 mg, y el placebo contra la tos inducida por ácido cítrico se determinó en dieciocho sujetos sanos. Dio como resultados que las diferencias de las drogas ocurrieron en dos horas y media después de la ingestión de los fármacos, pero o a una hora y quince minutos. Solo codeína 20 mg tuvo una mayor acción antitusígeno que el placebo, pero el dextrometorfano 30 mg también no difirió de la codeína 20 mg, pero si la noscapina 30 mg difirió con la codeína 20 mg, en conclusión

esta técnica puede ofrecer una prueba de detección útil para la actividad de nuevos compuestos potenciales en el hombre.<sup>64</sup>

El mecanismo de acción secretolítico de las saponinas ha sido opiniones controvertidas. Tradicionalmente se le ha atribuido su efecto irritante gástrico que provoca una estimulación vagal responsable a nivel bronquial de un incremento de secreción mucosa fluida. Este mecanismo según algunos autores, no parece muy plausible, y proponen la hipótesis de que las saponinas actúan como tensioactivos directamente sobre la mucosa bronquial, disminuyendo la viscosidad de la secreción mucosa. No obstante algunos opinan que la concentración de saponinas que alcanza el pulmón tras la administración oral sería demasiado baja para explicar este efecto. Por otra parte se ha investigado que las saponinas tienen un efecto expectorante y broncodilatador, por inhibición de la internalización de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgica en las células del epitelio alveolar en las células del músculo bronquial.<sup>65</sup>

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lagos G, Gediell V, Villegas S. especies reactivas de oxígeno y respuesta antioxidante en pacientes con VIH positivos y donantes voluntarios de sangre revista médica de Risalda [revista en internet]; 2012 [acceso 16 de setiembre de 2014]; 18(1):54-62. Disponible en: <http://recursosbiblioteca.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/3302/1/V18N1A9.pdf>
2. Pang W, Lin S, Dai Q, Zhang H, Hu J. Antitussive activity of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) pax extracts and improvement in lung function via adjustment of multi-cytokine levels. Moléculas [revista en internet]. 2011 [acceso, 14 de noviembre de 2013]; 16(4):3360-3370. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/16/4/3360>
3. Giachetto G. Cuando y como tratar la tos: un problema frecuente. Revista archivo pediatría. Montevideo Uruguay [revista en internet] 2001. [acceso 15 de agosto 2014]; 72(4). Disponible en: <http://www.scielo.edu.uy/pdf/adp/v72n4/giachetto-tos.pdf>.

4. Chaparro C, García A, Torres C. Neumología. 4ª ed. Medellín-Colombia: corporación de investigación biológica; 1993.
5. Goodman L Gilman A. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica; México: McGraw-Hill Interamericana; 1996.
6. Kanazawa H, Kurihara N, Hirata K, Takeda T. The role of free radicals in airway obstruction in asthmatic patients. CHEST Journal [revista en internet]. 1991 [acceso, 14 de noviembre de 2014]; 100(5):1319-1322. Disponible en: <http://journal.publications.chestnet.org/article.aspx?articleid=1064368>
7. Jahan, Y., & Siddiqui, H. H. Study of antitussive potential of *Glycyrrhiza glabra* and *Adhatoda vasica* using a cough model induced by sulphur dioxide gas in mice. International Journal of Pharmaceutical Sciences & Research [revista en internet]. 2012 [acceso, 14 de noviembre de 2013]; 3(6). Disponible en: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&authType=crawler&jrnl=09758232&AN=88282640&h=Q%2BF9I%2BctITGQvlcby1udtlseQv4sM5HSTk3QaXSI5xf22%2Bfx%2FvqmxJVvEoux8%2BTe8hkuzeWxG8yc0MfPrNhXA%3D%3D&crl=c>
8. Chakraborty R, Biplab De ND, Sen S. Antitussive, expectorant activity of *Marsilea minuta* L., an Indian vegetable. Journal of advanced pharmaceutical technology & research [revista en internet]. 2013 [acceso 14 de noviembre de 2013]; 4(1):61. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3645357/>
9. Salami E, Ozolua R, Okpo S, Eze G, Uwaya DO. Studies on the anti-asthmatic and antitussive properties of aqueous leaf extract of *Bryophyllum pinnatum* in rodent species. Asian Pacific journal of tropical medicine [revista en internet]. 2013 [acceso, 14 de noviembre de 2013]; 6(6):421-425. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S199576451360067X>
10. Haq RU, Farooq U, Wahab A, Raza M, Ahmad VU, Khan RA. Investigation of antitussive and toxicological activity of *Ballota limbata* in mice. Pharmaceutical biology, [revista en internet]. 2011 [acceso 19 de abril de 2014]; 49(6):627-632. Disponible en: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/13880209.2011.563317>
11. Seema G, Vikas G, Bansal P, Ranjit S, Mukesh M. Herbal Antitussives and Expectorants – a Revive. Review Article [revista en internet] 2010 [acceso 17 de noviembre] 3(6): 1668-1674. Disponible en: <http://globalresearchonline.net/journalcontents/volume5issue2/Article-002.pdf>
12. Prakash U, Bhuvanewari S, Balamurugan A, Vaishnavi S, Sunisha S, Sindhu M, et al, Sekar B. Studies on antibacterial, antioxidante, larvicidal, pesticidal activities and photochemistry of *Leonotis nepetifolia* (Linn) R.Br. [revista en internet]. 2013 [acceso 12 de setiembre de 2014]; 4(2), 303-309. Disponible en: <http://pharmascope.org/ijrps/downloads/Volume%204/Issue%202/31-10282.pdf>
13. Syed I., Suradka S. and Koche D. phytochemical analysis of *leonotis nepetifolia* (L.) r. br., a wild medicinal plant of lamiaceae. Bioscience Discovery [revista en internet]. 2012 [acceso 14 de setiembre de 2014]; 3(2): 197-196, Disponible en: <http://biosciencediscovery.com/Vol.%203%20No.%202/Imran%2052-54.pdf>
14. Usharani V, Anuradha V, Aroumougame S, Mathivanan N, Dhanalakshmi, Sagadevan E et al. Evaluation of antioxidant potential of leaves of *Leonotis nepetifolia* and its inhibitory effect on MCF7 and Hep2 cancer cell lines. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, [revista en internet]. 2013 [acceso 19 de setiembre de 2014]; 2013; 3(2): 103-110. Disponible en: <http://www.apjtc.com/zz/20132/3.pdf>
15. Parra H, García G, Nieto A, Martínez M. Anti-inflammatory Activity of Some Extracts and Isolates from *Leonotis nepetaefolia* on TPA-induced Edema Model. Rev. Soc. Quím. Méx [revista en internet] 2004 [acceso 17 de noviembre], 48, 293-295. Disponible en: <http://www.jmcs.org.mx/PDFS/V48/Vol4/16-Anti-inflammatory.pdf>



16. Dhawan NG, Khan AS, & Srivastava P. A general appraisal of *Leonotis nepetifolia* (L) R. Br: an essential medicinal plant. Bull. Env. Pharmacol. Life Sci [revista en internet]. 2013 [acceso, 14 de noviembre de 2013]; 2(8):118-121. Disponible en: [http://www.beppls.com/july\\_2013/19.pdf](http://www.beppls.com/july_2013/19.pdf)
17. Carvalho CA, Molinari RF, Silva SR, Pinto R, Fani MO. Medicinal plants used by the population of Viçosa, mg, brasil-preliminary study. Revista Eletrônica de Farmácia [revista en internet]. 2011 [acceso, 14 de noviembre de 2013]; 8(4):14. Disponible en: <https://www.revistas.ufg.br/index.php/REF/article/view/16648>
18. Pingale R, Pokharkar D, Phadtare S. A Review on ethnopharmacology, phytochemistry and bioactivity of *Leonitis nepetifolia*. International Journal of PharmTech Research [revista en internet]. 2013 [acceso, 14 de noviembre de 2013]; 5(3). Disponible en: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&authType=crawler&jrnl=09744304&AN=90515929&h=MEELkwshk1ytGWbwTRR KJFazuxXrsHevoR3d2txUfdEAaqC7dTd5rOGBByi8auulKLDmEZkpl71xMu%2BiAVClg%3D%3D&crl=c>
19. Kumar, S., Madaan, R., Bansal, G., Jamwal, A., & Sharma, A. Plants and plant products with potential anticonvulsant activity a review. Pharmacognosy Communications [revista en internet]. 2012 [acceso, 14 de noviembre de 2013]; 2(1):3-99. Disponible en: <http://phcogcommn.org/sites/default/files/Plant%20Drugs.pdf>
20. Ayanwuyi LO, Yaro AH, Adamu HYS. Studies on anticonvulsant activity of methanol capitulum extract of *Leonotis nepetifolia* Linn. Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences [revista en internet]. 2009 [acceso, 14 de noviembre de 2013]; 8(1):73-79. Disponible en: <http://www.njps.net/pdf/62.pdf>
21. Cruz J, Licea M, Hernández P, Enrique A, Yanes M. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. Rev. Mex Patol Clin [revista en internet]. 2011 [acceso, 05 de noviembre de 2013]; 58(1):4-15. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2011/pt111b.pdf>
22. Cotran R, Kumar V, Robbins T. Patología estructural y funcional. 6ª ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2000.
23. Echavarría B, Franco A, Martínez A. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuesto fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe de Colombia. VITAE, Rev. de la Facultad de Química Farmacéutica [revista en internet] 2009. [acceso enero2014]; 16(1): 126-131. Disponible en: <https://www.senam.mx/simposio2009/sm/compuestofenolicos/M2/SM2009-M220-1108.pdf>
24. Rodríguez J, Menéndez J, Trujillo Y. Radicales libres en la biomédica y estrés oxidativo. Rev. Med. Milit. "Dr. Luis Díaz Soto" Cuba [revista en internet]. 2001. [acceso noviembre 2013]; Vol. 30(1): 36-44. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol30\\_1\\_01/mil07100.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol30_1_01/mil07100.pdf)
25. Maldonado S, Jiménez V, Guapillo V, Ceballos R, Méndez B. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónicas-degenerativas. Rev Med UV, [revista en internet] 2010. [acceso diciembre 2013]; Vol. 1(1): 1-8 Disponible en: [http://www.uv.mx/rm/num\\_anteriores/revmedica\\_vol10\\_num2/articulos/radicales.pdf](http://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol10_num2/articulos/radicales.pdf)
26. Venero J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidante. Rev. Cubana Med. Milit. [revista en internet]. 2002. [acceso noviembre 2013]; 30(1): 15-20. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol31\\_2\\_02/MIL09202.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol31_2_02/MIL09202.pdf)
27. Halliwell B. antioxidants in human health and disease. Annu. Rev. Nutri. [revista en internet]. 1996 [acceso, 28 de noviembre de 2013]; 16:33-50. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.Un.16.070196.000341>
28. Kumar V, Kumar S. Plants as natural antioxidants. Revista Natural Product Radiance [revista en internet]. 2006 [acceso, 05 de Diciembre de 2013]; 5(4):326-334. Disponible en: <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456>

- 789/ 7962/1/NPR%205(4)%20326-334.pdf
29. Urgantondo, V. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente al estrés oxidativo en modelos celulares. Universidad de Barcelona, facultad de Farmacia. España.
  30. Criado C, Moya M. Vitaminas y antioxidantes. Servicio de Medicina Interna y Urgencias. Ed. Sanidad y Ediciones, S.L. Barcelona. actuaciones el médico.
  31. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. 2da Edición. Fondo editorial; 1994.
  32. Muñoz, A.; ramos, E.; Evaluación de la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos en recursos en recursos vegetales promisorios. Centro de investigación y bioquímica y nutrición. Facultad de Medicina humana. Lima. USMP: Perú.
  33. Gimeno E. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. OFFARM, ámbito farmacéutico nutrición, [revista en internet] 2004. [acceso diciembre 2014]; 23(6). Disponible en [http://apps.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet\\_f=10&pident\\_articulo=13063508&pident\\_usuario=0&pident\\_revista=4&fichero=4v23n06a13063508pdf001.pdf](http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet_f=10&pident_articulo=13063508&pident_usuario=0&pident_revista=4&fichero=4v23n06a13063508pdf001.pdf)
  34. Villar del freso, A. farmacognosia general. Editorial Síntesis. España. 1999.
  35. Zapata K, Cortes F, Rojano B. polifenoles y actividad antioxidante del fruto de guayaba agria (*psidium araca*) alimentos y biotecnología [revista en internet] 2013 [acceso octubre 2014]; 24(5): 1-14 disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?S071807642013000500012&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?S071807642013000500012&script=sci_arttext)
  36. Bruneton J. Plantas medicinales. Fitoquímica y farmacognosia. Editorial Acribia. S.A. Zaragoza-España. 2001
  37. Edna A. Determinación de perfil de compuestos fenólicos en arazá (*Eugenia stipitata*). [tesis de maestría]. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogota D.C., Colombia. 2012.
  38. Cartaya O, Reynaldo I. Flavonoides Características químicas y aplicaciones revistas científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal [revista en internet] 2001. [acceso julio 2015]; vol. 22, Núm. 2,2001, Pp 5-14. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215009001>
  39. Martínez S, Gonzalez J, Culebras J, Tuñón M. los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Rev. Nutr. Hosp [revista en internet] 2002. [acceso en agosto 2015]; 17(6): 271-278. Disponible en:[http://www.recursosdeenologia.com/docs/2002\\_los\\_flavonoides\\_propiedades-y\\_acciones\\_antioxidantes.pdf](http://www.recursosdeenologia.com/docs/2002_los_flavonoides_propiedades-y_acciones_antioxidantes.pdf)
  40. Inocente C. Actividad antioxidante y antimicrobiana de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de la corteza de *Tripalris americana* L. (tangerana colorada). [tesis pregrado]. Universidad Mayor de San Marcos. Facultad de farmacia y bioquímica Lima-Perú 2009
  41. Gonzales J. Caracterización de Compuestos Fenólicos Presentes en la Semilla y Aceite de Chía (*Salvia hispánica* L), mediante electroforesis capilar. [Tesis maestría]. México, D.F. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Instituto Politécnico Nacional. 2010.
  42. Molyneux p. The use of the stable free radical diphenyl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Sangklanakaran J.sci. technol. [revista en internet] 2003.[acceso setiembre 2014]; 26(2): 211-219. Disponible en: <http://rdo.psu.ac.th/sjstweb-old/journal/26-2/07-DPPH.dpf>
  43. Harrison J. Manual de Medicina Interna. 17ª ed. México DF: Mc. Graw. Hill; 2010.
  44. Guyton A, Hall J. Tratado de fisiología médica. 10ª ed. España: McGraw-Hill interamericana; 2001
  45. Flórez J. Fármacos antitusígenos y mucolíticos. En: Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A. Farmacología humana. 5ª ed. Barcelona: Editorial Elsevier Masson. 2008. p. 827-837

46. Morcillo EJ, Cortijo J. Fármacos expectorantes, antitusígenos y mucolíticos En: Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza JC, Moro MA, Portolés A, Velázquez, Farmacología Básica y Clínica. 18ª ed. Madrid: Editorial Panamericana; 2009. p.717-728
47. Taylor M, Reide P. Farmacología. Barcelona: Harcourt Brace; 1999.
48. Flores R. Farmacología Humana. 2ª ed. Barcelona: Ediciones científicas y técnicas S.A.; 2003
49. Ministerio de Salud Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas. Formulario Nacional de Medicamentos Esenciales. Lima-Perú; 2008
50. Goodman L Gilman A. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica; Mexico: McGraw-Hill Interamericana; 1996
51. Lorenzo P, Moreno A, Leza J, Lizasoain L, Moro M, Velázquez, Farmacología Básica y clínica. 18ª ed. Madrid. España: Medica Panamericana; 2008
52. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales. Universidad La Habana: Universidad de La Habana; 2000.
53. Aguilar J. Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante e inmunomoduladora. [Tesis de Maestría]. Lima. Servicio de publicaciones e intercambio científico; UNMSM; 2007.
54. Arroyo JL, Cisneros CB, Modelos experimentales de investigación farmacológica. Lima: Asdimor; 2012.
55. Castañeda, C.; Ramos E.; Ibáñez, V. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Revista Horizonte Medico – Vol. 8 N° 1.
56. Miranda M. Métodos de Análisis de Drogas y Extractos. Universidad de la Habana – Cuba; 1996.
57. Schonffeldt P, Céspedes J, Supulveda R, Salamanca M. Aumento del umbral tusígeno en sujetos sanos con el uso de la levodropropizina. Revista Chilena de enfermedades respiratorias [revista en internet] 2005. [acceso 5 de setiembre de 2015]; 21(3): 165-70 Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rcher/v21n3/art03.pdf>.
58. Gola G. Tratado de Botánica 2ª ed. Barcelona-España: Labor S.A; 1965
59. Pietta PG. Flavonoides as antioxidants. J. Nat. Prod [revista en internet]. 2000 [acceso 09 de julio 2015]; 63(7):1035-1042. Disponible en: [http://www.ff.ul.pt/FCT/PTDC/QUI-QUI/101535/2008/\(Pietta%20P-G2000\).pdf](http://www.ff.ul.pt/FCT/PTDC/QUI-QUI/101535/2008/(Pietta%20P-G2000).pdf)
60. Litter M. farmacología experimental y clínica. 6ª ed. Buenos Aires: Talleres Gráficos; 1980
61. Kuklinski C. farmacognosia: Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural. Barcelona: Omega; 2003
62. Del pilar V, De la Caridad M, Rosales R, De la Caridad R, Leon J; Vdiadl M. Evaluacion farmacológica de *Pluchea carolinensis* jacq (salvia de la playa) en animales de experimentación. Revista Cubana Plantas Medicinales [revista en internet] 1999 enero. [acceso 20 de setiembre de 2015]; 6(3). Disponible en: [http://pvs.sid.cu/revistas/pla/vol4\\_2\\_99/pla04299.htm](http://pvs.sid.cu/revistas/pla/vol4_2_99/pla04299.htm)
63. Bravo L. Farmacognosia. Madrid España: Elsevier España S.A.; 2003.
64. Empey D, Laitinen L Young G, Bye C, Hugles D. Comparison of the goods antitussivos of 20 mg of phosphate of codeine, dextrometorfano 30 mg and 30 mg noscapina using the cough induced by citric acid in normal fellows. Revista europea de farmacología clínica [revista en internet] 1979 [acceso 5 noviembre]. Disponible en: <http://springer.com/article/10.1007/BF00568199>
65. Villa R, Cañigüeral S. La Hoja de Hiedra en el tratamiento de las Afecciones de Vías Respiratorias: Evidencias Preclínicas Y Clínicas. Revista de Fitoterapia. [revista en internet]; 2011 [acceso 17 de noviembre]; 11(1): 5-20. Disponible en: <http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RD F%2011.1-Hiedra.pdf>