

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN  
CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA**

**Y BIOQUÍMICA**



**Actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las  
hojas del *Rosmarinus officinalis* L. "romero" en *Cavia  
porcellus* "cobayo". Ayacucho – 2012**

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

**PRESENTADO POR:**

**Bach. POMA MÉNDEZ, HENRY FORTUNATO**

**AYACUCHO-PERÚ**

**2012**

## **DEDICATORIA**

A Dios.

A mis queridos Padres: Fortunato y Paulina.

A mis hermanas: Liane, Elizabeth y Janet.

A Denisse.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi *alma máter*, la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, y a los excelentes docentes que en ella laboran, los cuales contribuyeron en el aprendizaje y orientación de mi formación universitaria.

A mi asesor Mg. Q.F. Edgar CÁRDENAS LANDEO, por su invaluable apoyo y enseñanza; pilar fundamental en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A mi Co asesor Mg. Carlos, CARRASCÓ BADAJOZ, por su valioso apoyo, y colaboración en la culminación del presente trabajo de investigación.

A los profesores Mg. Q.F. Enrique J. AGUILAR FELICES, Dr. Q.F. Johnny Aldo TINCO JAYO, por sus sabias sugerencias, críticas y observaciones.

A todas las personas que colaboraron en la realización y culminación del presente trabajo de investigación.

## ÍNDICE

	<b>Pag.</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>iii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>v</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>5</b>
2.1. Antecedentes.....	5
2.2. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	8
2.3. Diuréticos.....	18
2.4. Furosemida.....	21
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
3.1. Lugar de ejecución .....	24
3.2. Materiales .....	24
3.3. Diseño metodológico .....	25
3.4. Preparación de la solución estándar.....	26
3.5. Preparación de la solución patrón.....	26
3.6. Determinación de la actividad diurética del extracto hidroalcohólico.....	26
3.7. Determinación del bioensayo de toxicidad .....	28
3.8. Análisis estadístico .....	28
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	<b>38</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	<b>44</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>45</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>46</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>50</b>

**Actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. "romero" en *Cavia porcellus* "cobayo". Ayacucho-2012.**

**AUTOR : Bach. POMA MÉNDEZ, Henry Fortunato.**

**ASESOR : Mg. Q.F. CÁRDENAS LANDEO, Edgar.**

**RESUMEN**

El presente estudio se realizó con el objetivo de determinar el porcentaje de excreción volumétrica urinaria y la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Rosmarinus officinalis* L. "romero" en *Cavia porcellus* "cobayo", en el Laboratorio de Farmacología, Farmacognosia y Toxicología del Área de Farmacia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, con muestras colectadas que proceden de la rivera del río Huatatas (2800 m.s.n.m.) provincia de Huamanga, región de Ayacucho. Para la identificación de los metabolitos secundarios se realizó reacciones de coloración y precipitación propuesta por Miranda y Cuellar (2000). La actividad diurética se realizó utilizando el método de Naik y Col. en 25 cobayos distribuidos en cinco grupos de cinco animales, al primer grupo se administró solución salina fisiológica (NaCl 0.9 %) 50 mL/kg de peso, al segundo furosemida 20 mg/kg (control), al tercero, cuarto y quinto el extracto hidroalcohólico de las hojas a 100, 200 y 400 mg/kg de peso respectivamente y se determinó la toxicidad en *Artemia salina* que se expresa con la concentración letal 50 CL<sub>50</sub>. Los valores del porcentaje de excreción volumétrica urinaria (% EVU) a la dosis de 100 mg/kg fueron 69,88 %, a 200 mg/kg 183,60 %, a 400 mg/kg 101,38 %, blanco 46,94 % y la furosemida 144,76 % de % EVU respectivamente, el análisis de varianza con un nivel de confianza ( $\alpha < 0,05$ ) y la prueba de Tukey halló diferencias estadísticas entre los tratamientos; se determinó la toxicidad frente a *Artemia salina* dando una concentración letal CL<sub>50</sub> de 152,18 ppm. Se concluye que el extracto hidroalcohólico a 200 mg/kg produjo una actividad diurética (101,08 %), superior a la furosemida (100 %), obteniéndose además mayor porcentaje de EVU y que carece de toxicidad a la dosis ensayada.

**Palabras clave:** *Rosmarinus officinalis* L., extracto hidroalcohólico, diurético, furosemida.

## I. INTRODUCCIÓN

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempos inmemoriales. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso del que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen (Pérez, 2001).

En la fitoterapia, como terapia alternativa a los fármacos sintéticos se utilizan varias plantas medicinales cuyos extractos pueden producir diuresis y cuya composición química se ha relacionado con dicho efecto (Pérez y Morón, 2011).

La acción diurética en las plantas medicinales puede ser causada por principios activos de naturaleza química muy variada. Frecuentemente, la presencia de varios de estos principios activos en la misma planta son los responsables de su acción diurética, aunque no está claro el grado de contribución de cada uno de ellos a la actividad diurética total (Pérez, 2001).

Entre las sustancias químicas de origen vegetal con efecto diurético destacan los aceites esenciales, los flavonoides y las saponinas. Hay también sustancias capaces de producir un efecto diurético, como efecto secundario; tal es el caso

de los heterósidos cardiotónicos, que a través de la activación cardíaca aumentan la irrigación del riñón y favorecen la filtración glomerular produciendo diuresis, o las bases xánticas que producen vasodilatación de los vasos de la médula renal, aumentan la irrigación y por lo tanto la filtración glomerular y provocan diuresis (Kuklinski, 2000).

Es obvio que teniendo en cuenta la enorme cantidad de diferentes compuestos presentes en una planta y las numerosas actividades farmacológicas que se pueden analizar, no se puede decir globalmente que una planta ha sido totalmente estudiada. Los diuréticos de origen vegetal, se consideran como acuaréticos, diferenciándose en este sentido de la mayor parte de los quimiosintéticos, que sobretodo afectan la reabsorción de agua y cloruro de sodio a nivel de los túbulos y asa de Henle en la nefrona. Son muchas las plantas con propiedades diuréticas, sin embargo, su mecanismo de acción no está bien definido como el de los diuréticos sintéticos. La evaluación del efecto diurético de drogas aún no se ha extendido (Vilches y Col, 2005).

En cuanto a su mecanismo de acción, parece ser que algunos aceites esenciales, saponósidos y flavonoides podrían actuar a nivel glomerular - más que en el túbulo, provocando un aumento de la circulación renal e incrementando así la tasa de filtración glomerular y la formación de orina primaria. El efecto obtenido sería, por tanto, una acuarenesis. Sin embargo, las sales de potasio podrían producir un efecto diurético gracias a un proceso osmótico. Por otro lado, las bases xánticas o los heterósidos cardiotónicos son otros principios activos que también pueden presentar acción diurética aunque su empleo en fitoterapia se debe a otro tipo de acciones (López, 2001).

Los *diuréticos* son drogas de gran utilidad en la terapéutica actual, se utilizan en varias enfermedades cardiovasculares, principalmente la hipertensión arterial, afecciones renales como en el síndrome nefrótico, en las alteraciones hepáticas

que presentan ascitis y otras que producen alteraciones en los compartimentos líquidos del organismo (Jackson, 1996; Katzung, 1999).

Estos son fármacos que aumentan la tasa de flujo urinario, aún así, los que son útiles en clínica también incrementan la tasa de excreción del sodio (natriuresis) y de un anión acompañante, por lo general cloruro. En el organismo, el cloruro de sodio es el principal determinante del volumen de líquido extracelular, y casi todas las aplicaciones clínicas de los diuréticos se dirigen a reducir dicho volumen al disminuir el contenido corporal total de cloruro de sodio (Jackson, 1996).

Históricamente, la clasificación de los diuréticos ha sido basada en un mosaico de ideas como: el sitio de acción (diuréticos de asa), eficacia (diuréticos de límite alto), estructura química (diuréticos tiazida), similitud de acción con otros diuréticos (diuréticos parecidos a tiazida), efectos sobre la excreción de potasio (diuréticos ahorradores de potasio) y otros (Jackson, 1996; Katzung, 1999).

El ensayo de extractos de plantas se ha realizado en gran escala en la búsqueda de sustancias antitumorales, antimicrobianas, antiinflamatorias, cardiotónicas, diuréticas etc. Existe un gran número de plantas medicinales con reporte popular de acción diurética y solo cuatro de ellas han sido aprobados por el Ministerio de Salud Pública con aval de diferentes farmacopeas y de trabajos investigativos que la hacen acreedoras de un uso confiable en el Sistema Nacional de Salud de Cuba (Rodríguez, 2002).

El presente trabajo tiene por finalidad evaluar de forma preliminar el efecto diurético del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Rosmarinus officinalis* L. "romero" en *Cavia porcellus* "cobayo", para lo cual se tiene en cuenta los siguientes objetivos:



## **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. "romero".

## **OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. "romero".
- Determinar la dosis con mejor actividad diurética de las concentraciones ensayadas del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Rosmarinus officinalis* L. "romero".
- Determinar la toxicidad por el método del bioensayo con *Artemia salina*.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. ANTECEDENTES

A principio de este siglo, el desarrollo de la química y el descubrimiento de complejos procesos de síntesis orgánica desembocaron en la puesta en marcha, por parte de la industria farmacéutica, de una nueva producción de medicamentos. Para la fabricación de muchos de ellos utilizaron los principios activos de determinadas plantas medicinales, creyendo que las acciones imputables a dichas sustancias, se verían incrementadas, al poder realizar terapias donde la cantidad de principio activo es superior al que posee la planta. Nada más lejos de la realidad, ya que se comprobó que las propiedades de dichas sustancias, eran menos eficaces y existía peligro de producir intoxicaciones e intolerancias, cosa que no ocurría con la utilización de la planta entera (Pérez, 2001).

A pesar del gran desarrollo alcanzado por la síntesis química, en la actualidad las plantas medicinales continúan siendo un valioso arsenal de sustancias o de precursores de la misma, ya sea en forma de medicamento vegetal o de materia prima para la industria farmacéutica. Ejemplo de lo esbozado es el *Rosmarinus officinalis* L. planta de la familia *Lamiaceae* (Martínez y Col., 2004).

Estudios etnobotánicos le atribuyen propiedades tónicas, estimulantes, carminativas, antifebriles, colagogas, antiespasmódicas, descongestionante de

las vías respiratorias, antimicrobianas y diuréticas. Además se informa de su amplio uso culinario (condimento) y cosmético (crecimiento del pelo), en países mediterráneos especialmente Italia y Francia. Por su parte estudios farmacológicos reconocen que posee efecto relajante sobre los músculos lisos de la tráquea, el intestino y las vías urinarias; efecto hepatoprotector; útil en el asma bronquial, desórdenes espasmo-génicos, úlcera péptica, enfermedades inflamatorias, aterosclerosis, enfermedades isquémicas del corazón, catarata y favorece la motilidad espermática. Atribuidas estas acciones en lo fundamental a los ácidos caféico y rosmarínico. Este último además antioxidante, estimulante de la producción de prostaglandina E2 e inhibidor de la producción de leucotrienos B4 en los leucocitos polimorfonucleares humanos y del sistema del complemento (Martínez y Col., 2004).

Otros constituyentes mayoritarios informados son: hasta un 2,5 % de aceites esenciales: 1,8-cineol (30 %), alcanfor (15 a 25 %), borneol (16 a 20 %), acetato de bornilo (máx. 7 %),  $\alpha$ -pineno (máx. 25 %) y algunos taninos (Martínez y Col., 2004).

Álvarez (1994), realizó un estudio de modificación del curso de la cirrosis experimental con extractos totales de romero (*Rosmarinus officinalis*) que demuestra los beneficios de usar los extractos de romero, en el tratamiento de la cirrosis hepática, donde el romero revirtió la actividad enzimática de la gamma glutamil-transpeptidasa (GGTP) alterada por la cirrosis. Además los extractos totales de romero, reducen parcialmente la actividad enzimática de la transaminasa glutámico pirúvica (TGP) y la transaminasa glutámico oxalacética (TGO), elevadas en la cirrosis.

Estudios farmacológicos demuestran que el extracto metanólico del *Rosmarinus officinalis* "romero" no es antiinflamatorio en el edema de la oreja del ratón inducido por acetato de tetradecanoilforbol. El extracto acuoso retarda la

aparición de convulsiones inducidas por picrotoxina inoculada intraperitonealmente en ratones, a su vez el extracto etanólico del romero de brotes tiernos demostró actividad colerética significativa en una relación dosis-respuesta; el extracto acuoso demostró efecto hepatoprotector, significativo de acuerdo a los niveles plasmáticos de TGP (Álvarez, 1994).

Estudios realizados en el *Rosmarinus officinalis* L. "romero" mostraron actividad antioxidante por la captación de radicales libres con un porcentaje de inhibición de 67.26 % en el extracto etanólico al 1 % (Quispe, 2003).

Sosa (2004), realizó el efecto antiespasmódico de la infusión de *Rosmarinus officinalis* L. "romero" en ileon aislado de cobayo, demostrando que la infusión de *Rosmarinus officinalis* L. "romero" a dosis del 30 % presenta mejor efecto antiespasmódico.

Dentro de los antecedentes de trabajos de investigación en la determinación de la actividad diurética de diferentes plantas medicinales realizadas en la Escuela de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, podemos señalar lo siguiente.

Franco (2002), realizó la evaluación de la actividad diurética de la *Krameria lappacea* "ratania", encontrando un mayor efecto diurético a una concentración de 400 mg/kg.

Oriundo (2003), realizó el tamizaje fitoquímico y determinación de la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Foeniculum vulgare* "hinojo" en cobayos, encontrando mayor efecto diurético a una concentración de 250 mg/kg y una eficacia de 42,73 %.

Manrique (2004), realizó un trabajo de investigación donde probó el efecto diurético a diferentes concentraciones del extracto acuoso atomizado de *Taraxacum officinale* "diente de león", presentando un mayor efecto diurético a una dosis de 800 mg/kg.

González (2004), realizó la evaluación de la actividad diurética del extracto atomizado de *Bidens pilosa* "silkau" en cobayos, obteniéndose un mayor efecto diurético a una concentración de 350 mg/kg en planta seca y fresca; una eficacia diurética de 54,8 %.

Prado (2008), realizó la evaluación de la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las flores de *Sambucus peruviana* H.B.K. "sauco", mostrando un efecto diurético a una dosis de 600 mg/kg y una eficacia diurética de 70,46 %.

Mayhua (2008), realizó la actividad diurética del extracto hidroalcohólico del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* "mashua", encontrando mayor eficacia diurética a una concentración de 500 mg/kg.

## **2.2. *Rosmarinus officinalis* L.**

### **2.2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA**

La clasificación taxonómica se realizó según el sistema de clasificación de Cronquist. A. (1988) y es como sigue:

División	: MAGNOLIOPHYTA
Clase	: MAGNOLIOPSIDA
Sub clase	: ASTERIDAE
Orden	: LAMIALES
Familia	: LAMIACEAE
Género	: <i>Rosmarinus</i>
Especie	: <i>Rosmarinus officinalis</i> L.
Nombre vulgar	: "romero"

Fuente: Constancia emitida por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (Anexo N° 01).

### 2.2.2. CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA Lamiaceae

Hierbas (anuales o perennes), lianas, arbustos y pequeños árboles generalmente con aceite esencial, aromáticos, los tallos y las ramas cuadrangulares o tetrátgonos, glabros o pubescentes, los pelos a menudo glandulosos.

Hojas opuestas o verticales, simples, pinnati – partidas o raramente compuestas, pecioladas o sésiles sin estípulas, mayormente pinnatinervias. Inflorescencias en cimas formando verticilastros de pocas o muchas flores que se reúnen en pseudoespigas o capítulos. Flores solitarias a menudo sésiles en las axilas. Flores hermafroditas, zigomorfas raramente actinomorfas, con o sin bractéolas, sésiles o pediceladas (Mostacero y Mejía, 1993).



Fig. N° 01. Esquema taxonómico de *Rosmarinus officinalis* L.

Fuente: (Vilches y Col, 2005).

### 2.2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Es un subarbusto o mata vivas, rústico, erguido o ascendente, muy ramificado (1,5 – 1,8 m de anchura), de 50 a 80 cm de altura, y puede llegar hasta los 200 cm; verde todo el año, con los tallos jóvenes cuadrados y ligeramente borrosos que se va perdiendo al crecer y los tallos añosos son de color rojizo y con la corteza resquebrajada. Las hojas son pequeñas y muy abundantes, con forma *linear*, de dos a tres cm de largo y unos tres mm de anchura, opuestas, sésiles, enteras, con los bordes torcidos hacia abajo, verde oscuras, lustrosas por el haz, blanquecinas y cubiertas de pelo por el envés, coriáceas y en la zona de unión de la hoja con el tallo nacen los ramilletes floríferos. Las flores son de cinco mm de largo, con corola bilabiada en una sola pieza, el labio superior tiene una escotadura que lo escinde en dos y el interior tiene tres lóbulos de los cuales el central es más grande y con forma de capuchón, el color azul – violáceo pálido, rosa o blanco, con cáliz verde o algo rojizo bilabiado y acampanado, el labio superior es entero o con tres dienteitos triangulares, lleva pelos muy cortos que suele perder haciéndose lampiño, son flores axilares, muy aromáticas y melíferas, se localizan en la cima de las ramas, tienen dos estambres invocados casi pegados a las anteras que están soldados al tubo de la corola y tiene un pequeño diente. El fruto, encerrado en el fondo del cáliz, está formado por cuatro pequeñas nuececitas trasovadas, en tetraquenio, de color parduzco (Sisa, 2002). Crece mejor en lugares luminosos, en zonas con temperatura entre 9 y 28°C precipitación anual entre 0,3 a 2,7 mm y pH del suelo en el rango de 4,5 a 8,7. La planta es tolerante en sequía, requiere suelos secos, pedregosos o arenosos, siempre que exista drenaje adecuado y una profundidad mínima del suelo de 20 cm; no es muy resistente al frío (Evans, 1991).

#### 2.2.4. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El romero es originario del Mediterráneo, y debido a sus características aromáticas y medicinales se cultiva en lugares secos y rocosos. Ha sido naturalizado en diversas regiones como las zonas templadas del norte de África, Sur Oeste de Asia y la zona Mediterránea de Europa (Muñoz, 1994).

#### 2.2.5. COMPOSICIÓN QUÍMICA

**Aceite esencial (0,5 – 2 %):** Compuesto principalmente por hidrocarburos monoterpénicos tales como el  $\alpha$ -pineno (25 %),  $\beta$ -pineno y canfeno; ésteres terpénicos (1,8-cineol en una concentración variable del 12 – 50 %); alcanfor (10 – 25 %), linalol, verbinol, terpineol, 3- octanona, isobornil-acetato,  $\beta$ -cariofileno, etc. **Terpenoides:** carnosol o picrosalvina (diterpeno amargo), ácido oleánico, ácido 2- $\beta$ -HO-oleanólico, ácido 3-O-acetiloleanólico, ácido ursólico y ácido 3-O-acetilursólico (triterpenos), ácido carnosílico, rosmaridienol, 7-metoxirosmarol,  $\alpha$  y  $\beta$ -amirenona, etc. **Flavonoides:** apigenina, diosmetina, diosmina, genkwanina, 6-metoxi-genkwanina, hispidulina, luteolina (y derivados), 6-metoxi-homoplantagina, circimarina, nepritina, sinensetina, cupafolina, 7-metoxi-fegopolina. **Otros:** ácidos fenólicos (cafeico, clorogénico, labiático, neoclorogénico y rosmarínico), colina, taraxasterol, lupeol, estigmasterol, campesterol, taninos (Montesdeoca, 2010).

#### 2.2.6. APLICACIONES TERAPÉUTICAS

Relacionadas en su mayoría a la actividad del aceite esencial y sus compuestos fenólicos antioxidantes, responsables de la actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, diurética, antiulcerogénica y antimutagénica. Se utilizan sobre todo las hojas y a veces, las flores. Con el aceite esencial que se extrae directamente de las hojas, se prepara alcohol de romero, que se utiliza para prevenir las úlceras. También se emplea para tratar dolores reumáticos y lumbalgias. Se utiliza en fricciones como estimulante del cuero cabelludo



(alopecia). La infusión de hojas de romero alivia la tos y es buena para el hígado y para atacar los espasmos intestinales. Debe tomarse antes o después de las comidas. El humo de romero sirve como tratamiento para el asma. El alcanfor de romero tiene efecto hipertensor (sube la tensión) y tonifica la circulación sanguínea. Por sus propiedades antisépticas, se puede aplicar por decocción sobre llagas y heridas como cicatrizante. También posee una ligera cualidad emenagoga (regular la menstruación). El efecto favorable que ejerce en la digestión se produce al actuar sobre varios niveles. En primer lugar, estimula la producción de los jugos gastrointestinales. Además relaja el músculo liso gastrointestinal, elimina posibles espasmos y favorece las secreciones. Al relajar las cardias, tiene un efecto carminativo y colagogo, gracias a la relajación del esfínter de Oddi. Su actividad colagoga, colerética y protectora hepática, así como su efecto diurético se ha observado en ratas y cobayas (debido a las sustancias amargas y polifenoles). Los estudios sobre la actividad farmacológica de los componentes del romero que se están llevando a cabo en la actualidad se dirigen mayoritariamente hacia los diterpenos (especialmente el rosmanol), por el gran interés que suscitan sus propiedades antioxidantes. De hecho, si se tiene en cuenta que los diterpenos que contiene el romero se biosintetizan en las plantas, como respuesta al estrés oxidativo, para ejercer un efecto protector de las membranas celulares de los vegetales, no es de extrañar que ejerzan un potente efecto antioxidante y captador de radicales libres. De todos modos, se ha comprobado que tanto estos componentes aislados como los extractos de la droga poseen esta actividad. Además, se ha observado que inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y el envejecimiento de la piel causado por fenómenos de oxidación. Algunos trabajos recientes indican que el carnosol promueve la síntesis de un factor de crecimiento neuronal, imprescindible para el crecimiento y mantenimiento del tejido nervioso. También

se ha demostrado en ratas que el extracto hidroalcohólico de la planta tiene una actividad antiulcerosa, efecto que algunos investigadores atribuyen a los componentes antioxidantes que contiene. Indicado en casos de agotamiento nervioso, astenia, convalecencias, alteraciones digestivas y hepáticas, reumatismo, gota, jaquecas, etc. Actividad antiinflamatoria – antioxidante. El ácido rosmarínico presenta actividad antiinflamatoria en modelos de edema plantar inducido por carragenina en ratas. Experimentalmente, dicho ácido demostró actuar sobre la formación de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>), de manera similar a la de los antiinflamatorios no esteroideos, provocando a su vez inhibición del factor C3 del complemento, un mediador del proceso inflamatorio no involucrando la vía de la ciclooxigenasa ni la actividad de la prostaciclina-sintetasa (Aguay, 2012).

#### **2.2.7. USOS TRADICIONALES**

En literatura científica (popular) se ha reportado que las decocciones de esta planta, (sin ser una panacea como se ha pretendido tantas veces), poseen muchas virtudes, y tienen aplicación en el tratamiento de multitud de enfermedades. Se ha descrito que el romero es un estimulante. En apenas unos días, se mejoran agotados, depresivos y neurasténicos. Posee notables propiedades antirreumáticas, actúa contra la gota, combate los cálculos de la vejiga, la nefritis y la retención de orina. Se recomienda en la tos, la tosferina, el asma, palpitaciones, nerviosismo, angustia, insomnio y jaquecas de origen nervioso. Es un buen digestivo, antiespasmódico, colagogo (estimula la secreción de bilis) y ayuda al hígado en sus funciones, es vermífugo y emenagogo (Álvarez, 1994).

Aldave y Col. (1998), mencionan la variación de los usos del romero, aprovechando en algunos casos las propiedades aromáticas y saborizantes, o en otros, la actividad antibacteriana y antioxidante que presenta tanto la planta

como sus extractos y que puede ser usado para ayudar a preservar aceites y carnes. Los usos más comunes son:

- ❖ Hoja fresca o deshidratada usada tradicionalmente como especia, se emplea para condimentar comidas. También se emplea para preparar vinagres.
- ❖ Aceite esencial extraído desde material fresco de brotes florecidos y vástagos, obteniéndose por destilación con vapor. Se utiliza en industria de alimentos perfumes y cosméticos.
- ❖ Oleorresinas saborizantes para la cual se usa hojas deshidratadas, empleando solventes orgánicos como medio de extracción.
- ❖ Extractos antioxidantes, elaborados a partir de hojas deshidratadas, que se obtiene utilizando tecnologías de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico. Estos tipos de productos aprovechando las capacidades antioxidantes de ciertas sustancias químicas presente en las hojas, que tiene la particularidad de no aportar caracteres de aroma o sabor.

#### **2.2.8. CONTRAINDICACIONES**

El romero ha sido señalado como agente abortivo, por lo que se contraindica durante el embarazo. Estudios realizados sobre ratas gestantes indican que la administración de extractos de romero durante el período de pre-implantación interfiere con el normal implante del huevo, a partir de alteraciones en el desarrollo embrionario observados tras la autopsia de los animales. El romero no debe usarse en el transcurso del embarazo, ya que existe la posibilidad de que induzca un aborto espontáneo por su posible efecto estrogénico. Se contraindica la toma de aceite esencial de romero en pacientes epilépticos (por peligro de neurotoxicidad), diabéticos, niños y lactante. Por este motivo, no se recomienda su uso durante períodos de tiempo prolongados o a dosis mayores a las recomendadas y se debe tener especial cuidado cuando se usa en niños. Se considera que el principio activo del romero carece de toxicidad; sin embargo, las

personas especialmente sensibles pueden experimentar reacciones alérgicas, especialmente dermatitis por contacto. Asimismo, no es recomendable que las personas con cálculos biliares recurran a esta droga sin consultar previamente con un médico. Esto es debido a que cuando existe litiasis biliar, un aumento del drenaje de la vesícula biliar puede ir acompañado de una obstrucción de los conductos biliares. Finalmente, aunque la probabilidad de presentar una intoxicación por el consumo de infusiones de romero es muy baja, una sobredosis podría derivar en un cuadro caracterizado por espasmo abdominal, vómitos, gastroenteritis, hemorragia uterina e irritación renal (Aguay, 2012).

## **2.2.9. METABOLITOS SECUNDARIOS**

### **A. SAPONINAS**

Son heterósidos (azúcar más aglicón) denominada sapogenina, que se caracterizan por su capacidad para producir espuma cuando se agita una solución acuosa que las contiene. Se forma espuma debido a que las saponinas disminuyen la tensión superficial del agua. Son por la tanto tensioactivas naturales. Para su extracción se utilizan mezclas hidroalcohólicas de elevada graduación (60 – 70°) con objeto de evitar ciertos problemas que se producen cuando se extraen con agua o mezclas hidroalcohólicas de baja graduación. A nivel renal aumenta la circulación sanguínea, aumentando consecuentemente la filtración glomerular y surtiendo un efecto diurético (Kuklinski, 2000).

### **B. ACEITES ESENCIALES**

Son también desechos del metabolismo de la planta. Comprende las esencias vegetales y la resinas. Se presentan en emulsiones que tienen a formar gotitas, no son solubles en agua, pero disuelven bien en éter, alcohol o aceite. A menudo la planta los vierte al exterior, por medio de los canales excretores. Las esencias vegetales, que son volátiles, se difunden a través de la epidermis de las hojas y de las flores; expanden a menudo un olor muy pronunciado y son los

compuestos que dan perfume a los vegetales. Las esencias son compuestos terpénicos y los terpenos están formados por largas cadenas de un hidrocarburo dietilénico, isopreno. Como los isoprenos pueden unirse entre sí de muchas formas, el número de esencias es muy alto. Las resinas normalmente están disueltas en esencias y aparecen como residuos viscosos o sólidos cuando aquellos se evaporan. Los aceites esenciales químicamente están formados por la mayoría de los monoterpenos y algunos sesquiterpenos, y compuestos aromáticos. Los monoterpenos y los sesquiterpenos son biosintetizados a partir de los pirofosfatos de geranilo y de farnesilo respectivamente; las reacciones de ciclación, oxidación y otras, pueden originar las diferentes estructuras. Los aromáticos se biosintetizan a través de la ruta shikimato. Se obtienen a partir de diferentes plantas mediante destilación, prensado o extracción por agentes. Usados, diferentemente, para fabricar fragancias, también tienen aplicación como sustancia beneficiosa en la aromaterapia y son muy apreciados para perfumar ambientes o como productos de baño. Suelen tener efecto antibiótico, expectorante, antiespasmódico, digestivo y diurético, aunque depende mucho de su concentración (Aguay, 2012).

### **C. ESTEROIDES**

En la naturaleza se encuentran una gran cantidad y diversidad de sustancias con el núcleo esteroide, las cuales incluyen a los esteroides o 3-hidroxiesteroides, los esteroides con grupos carbonilo también denominados oxa o cetoesteroides, los esteroides con grupos amino en el núcleo o la cadena lateral alcaloides esteroidales y los cardenólidos o cardiotónicos entre otros. Estos a su vez se les encuentra en forma libre, esterificados con ácidos grasos o glicosidados. A continuación se describen algunos aspectos generales de los esteroides más distribuidos, haciendo un énfasis especial en su elucidación estructural. Los esteroides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino animal y vegetal; y

se les encuentra en forma libre también llamados agliconas esteroides, como ésteres o como glicósidos. Todos contienen un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno y presentan un grupo hidroxilo en el carbono 3. La mayoría de esteroides naturales o esteroides insaturados poseen una cadena lateral de 8 a 10 átomos de carbono y un enlace doble en el C-5. En los animales superiores incluido el hombre se encuentra, principalmente el colesterol, el cual es un constituyente importante de membranas y precursor de sustancias fisiológicamente importantes como hormonas, ácidos biliares, vitamina D, etc. En las plantas superiores se encuentran, principalmente, los denominados fitosteroides:  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol. Un esteroide menos común es el fucosterol, el cual es el esteroide principal de muchas algas pardas y también se le ha detectado en el coco *Cocos nucifera* L. Los esteroides naturales conocidos presentan las siguientes características estructurales: Los enlaces dobles en el núcleo se presentan, principalmente, en C-5, C-7, C-8 y C-9. Los enlaces dobles en la cadena lateral se presentan, especialmente, en C-22, y con menor frecuencia en C-24 y C-25. Además de los grupos metilos 18, 19, 21, 26 y 27, es frecuente encontrar grupos metilo en C-24, menos frecuente en el C-4. La cadena lateral presenta grupos alquilo, metilo, etilo, isopropilo, propilo, principalmente, en C-24. Algunos organismos poco evolucionados invertebrados marinos, orquídeas presentan esteroides con modificaciones en la cadena lateral anillos ciclopropano, dobles enlaces alénicos, metilaciones en C-26 y C-27, ausencia del C-25, y con núcleos modificados (Aguay, 2012).

#### **D. FLAVONOIDES**

Son compuestos fenólicos, responsables de la coloración de flores y frutos, por lo tanto "guías de néctar". Tiene como núcleo básico al 2-fenil cromano. Farmacológicamente son antioxidantes (por quelación de metales), acción

antiespasmódica, antiinflamatoria, anticoagulante indirecto de la sangre, acción diurética, antiedematoso, hipocolesterolemia (Bruneton, 1991).

Las plantas superiores sintetizan una variedad de compuestos fenólicos durante su crecimiento y desarrollo. Entre los constituyentes mejor conocidos de los flavonoides figuran rutina, quercetina y los bioflavonoides cítricos (hesperidina, hesperetina, diosmina y naringina). A la rutina y a la hesperidina se las denominó vitamina P o factores de permeabilidad. En la antigüedad se utilizaron para el tratamiento de diversos estados que se caracterizan por hemorragia y excesiva fragilidad capilar (Villar del Fresno, 1999).

### **E. TANINOS**

Son conocidos por sus propiedades curtientes y astringentes, usados tradicionalmente en la industria del cuero y en terapéutica como cicatrizantes en uso externo y antidiarreico. El término tanino fue introducido por Seguin en 1796 para designar a ciertas sustancias presentes en extractos vegetales capaces de combinarse con la piel, evitando, su putrefacción y convirtiéndola en cuero. Sus propiedades astringentes está ligada por su capacidad de unirse a proteínas de la piel y de las mucosas, provocando una especie de curtido que hace que las capas superficiales sean menos permeables y protejan las capas subyacentes de ahí su empleo como cicatrizante y en el tratamiento de quemaduras (Villar del Fresno, 1999).

Kuklinski (2000), clasifica a los taninos en dos grandes grupos: los taninos hidrolizables, que al tratar con cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) da una coloración azul; y los taninos condensados que da una coloración verde con el cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ).

### **2.3. DIURÉTICOS**

Los diuréticos constituyen un grupo de medicamentos con acción terapéutica que se utilizan para ajustar el volumen de líquido extracelular, incrementando el volumen de orina excretado por los riñones ajustando la composición, de los

líquidos corporales en situaciones clínicas diversas, entre otras: hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca aguda y crónica, insuficiencia renal aguda y crónica, síndrome nefrótico, cirrosis y la diabetes insípida. Además, a veces los diuréticos se utilizan para preservar un volumen de orina adecuado, como ocurre en el caso de ciertos traumatismos severos, o para reducir la concentración de un agente nocivo en la orina a fin de minimizar el deterioro renal (Uriarte y Trejo, 2003).

Su objetivo fundamental es conseguir un balance negativo de agua, pero los diuréticos no actúan directamente sobre el agua, sino a través del sodio (diuréticos natriuréticos) o de la osmolaridad (diuréticos osmóticos). De acuerdo con ello, la finalidad principal de los diuréticos se dirige al tratamiento de los edemas. Sin embargo, directa o indirectamente pueden modificar otros iones y alterar otras funciones, de ahí que se utilicen también en otras enfermedades, como la hipertensión arterial, las hipercalcemias, la diabetes insípida, el glaucoma, las intoxicaciones, etc (Flores, 1998).

Los diuréticos constituyen drogas que actúan sobre el riñón y son capaces de provocar un aumento del volumen de la orina excretada. Pero el propósito de los diuréticos en el edema no es simplemente aumentar el volumen de la orina sino promover la excreción de sodio, ya que el agua le sigue pasivamente la acción osmótica, al igual que el cloruro con respecto al sodio que también lo hace pasivamente; además, se ha descrito el papel esencial de la retención del catión sodio en todos los tipos de edema. Por lo tanto, los diuréticos, para ser activos y útiles deben ser saluréticos – eliminadores de cloruro de sodio o mejor dicho natriurético – excretadores de sodio. Tan importante es este concepto que actualmente se definen los diuréticos como las drogas que actúan sobre el riñón, provocando inicialmente la excreción de sodio y causando un balance negativo



de dicho catión, y como la excreción de sodio se acompaña del cloruro, los términos diuréticos y saluréticos son sinónimos.

Los diuréticos provocan:

1. En primer lugar una excreción iónica, principalmente sodio, que se extrae del líquido extracelular.
2. En segundo lugar una eliminación de agua, que también procede del líquido extracelular, que así se contrae, desapareciendo el edema.
3. Se produce aumento de la diuresis y pérdida de peso.

Los diuréticos actúan sobre el riñón; ejerciendo sus efectos por aumento de la filtración glomerular o por disminución de la reabsorción tubular (Velásquez, 1993).

### **2.3.1. PRINCIPALES CLASES DE DIURÉTICOS** (Flores, 1998; Goodman y Gilman, 2007).

La clasificación se realiza según la eficacia diurética, con el sitio de acción y con la estructura química:

#### **a. DIURÉTICOS DE MÁXIMA EFICACIA**

Actúan en los segmentos diluyentes; pues su curva dosis-respuesta es más amplia. Ellos ejercen su acción principal en la rama ascendente gruesa del asa de Henle en toda su extensión, y es así que se les denomina también diuréticos “del asa”. Los más importantes son:

- Furosemida.
- Bumetanida.

#### **b. DIURÉTICOS DE MEDIANA EFICACIA**

Diuréticos tiazídicos o derivados de la benzotiadiazina y los que pertenecen a este grupo son:

- Tiazidas de grupo A: benzotiadiazina, clorotiazida.
- Tiazidas de grupo B: hidroclorotiazida.

- Tiazidas de grupo C: bendroflumetiazida.
- Tiazidas de grupo D: ciclotiazida.
- Derivados de la isoindolina: clortalidona.
- Quinazolinas: metolazona.

#### **c. DIURÉTICOS DE LIGERA EFICACIA**

- Inhibidores de la anhidrasa carbónica: acetazolamida, diclorfenamida.
- Diuréticos osmóticos: manitol.

#### **d. DIURÉTICOS AHORRADORES DE POTASIO**

Antagonista de la aldosterona y afines:

- Espironolactona.
- Amilorida y triamtereno.

### **2.4. FUROSEMIDA**

Es un poderoso diurético de acción muy breve derivado de las sulfonamidas, se absorben con rapidez, la furosemida aumenta el flujo sanguíneo renal y causa la redistribución del riego sanguíneo dentro de la corteza del riñón (Katzung, 1999).

#### **2.4.1.MECANISMO DE ACCIÓN**

Este diurético, actúa directamente sobre el riñón, acción renotrópica, aumentando el volumen urinario y la eliminación de sodio. No modifican sensiblemente la filtración glomerular y producen sus efectos por disminución de la reabsorción tubular de agua y electrolitos en la rama ascendente gruesa del asa de Henle (Remington, 2003).

La furosemida aumenta la excreción de cloruro de sodio por disminución de reabsorción tubular, mientras que la eliminación de agua y por consiguiente el aumento de volumen urinario (diuresis) producido es secundario a la excreción de electrolíticos, pues a nivel de los túbulos renales el agua es retenido por acción osmótica y es eliminado concomitantemente con la sal (Litter, 1997).

#### **2.4.2. FARMACODINAMIA**

La furosemida se administra por vía oral e intravenosa, produce una copiosa diuresis en los animales y en el hombre normal o con edema. Por lo tanto el volumen plasmático disminuye con hemoconcentración, aumenta la concentración de las proteínas plasmáticas y, por lo tanto, la presión coloidosmótica, que origina el pasaje de líquido desde el compartimiento intersticial a la sangre y la consiguiente desaparición del edema, si existe, y descenso del peso corporal. Su acción es rápida por vía oral; el efecto comienza de 30 - 60 minutos, alcanzando una máxima intensidad de 90 - 120 minutos de vida media, persistiendo durante cuatro a seis horas; y por vía intravenosa el efecto diurético comienza a los 5 - 10 minutos, alcanzando su máxima intensidad después de 30 a 60 minutos y persistiendo durante unas dos horas (Smith y Cedric, 1999; Remington, 2003).

#### **2.4.3. FARMACOCINÉTICA**

La furosemida se absorbe con rapidez y pasan así a la sangre, con un nivel plasmático máximo a los 90 minutos de la ingestión alrededor de 650 mg/mL, se eliminan por secreción tubular, así como por filtración glomerular. Por lo tanto, es función de la concentración que alcanza en la luz tubular. Tiene una curva de dosis - respuesta empinada y del tiempo necesario para hacer llegar el diurético hasta su sitio de acción rápida. Se absorben bien por vía oral; la biodisponibilidad de la furosemida es del 50 %. Inician su acción, por vía oral, a los 10 - 30 min. y alcanzan el efecto máximo a los 20 - 40 min. con una duración de cuatro a seis horas. Se unen intensamente a las proteínas plasmáticas (> 95 %), por lo que son filtrados en el glomérulo en escasa cantidad; en cambio, son segregados por transporte activo en el túbulo proximal. La eliminación de la furosemida a las seis horas es un 80 %. Lo cual son excretados parcialmente por orina en forma activa y, en parte, son también metabolizados. La furosemida

sufre glucuronidación, con posible acumulación en caso de uremia (Flores, 1998; Smith y Cedric, 1999).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

El presente trabajo se realizó en los Laboratorios de Farmacología, Farmacognosia y Toxicología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de Febrero a Julio 2012.

#### **3.2. MATERIALES**

##### **3.2.1. POBLACIÓN**

Plantas de *Rosmarinus officinalis* L. "romero" del distrito de Ayacucho, de la provincia de Huamanga, Ayacucho.

##### **3.2.2. MUESTRA**

Se utilizó dos Kg de hojas del *Rosmarinus officinalis* L. "romero" recolectadas entre los meses de marzo - abril del 2012, en la rivera del río Huatatas (2800 m.s.n.m.) provincia de Huamanga, región de Ayacucho.

##### **3.2.3. MATERIAL BIOLÓGICO**

Constituidos por 25 cobayos machos adquiridos en el Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) de la Estación Experimental Agraria Canaán – Ayacucho, con un peso de 400 – 500 gramos, con una edad aproximada de dos meses, criados y alimentados en las mismas condiciones.

### **3.3. DISEÑO METODOLÓGICO**

#### **3.3.1. PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA**

Las hojas del *Rosmarinus officinalis* L. "romero" fueron recolectadas entre las 7 a.m - 9 a.m. Se recolectaron las hojas en buen estado de conservación, verdes y que alcanzaron un buen estado biológico.

#### **3.3.2. DESECACIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

Las hojas de la especie vegetal en estudio fueron sometidas a una limpieza y luego fueron desecadas a la sombra en un ambiente con buena ventilación extendiéndolas apropiadamente por un periodo de tres semanas y posteriormente se procedió con la estabilización a la estufa a 40°C por dos horas. Luego las hojas fueron trituradas con ayuda de un molino hasta obtener un polvo fino y se procedió a guardar en un frasco de boca ancha (Lock de Ugaz, 1994).

#### **3.3.3. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO**

Se pesó 300 g de hojas pulverizadas para luego añadir tres litros de una solución hidroalcohólica de 70° en una proporción de 1:10; las muestras fueron maceradas en un frasco de color ámbar por un periodo de dos semanas aproximadamente. Durante el proceso se agitó el frasco periódicamente para que la solución hidroalcohólica se distribuya homogéneamente en la muestra. Luego se procedió al filtrado al vacío en un embudo Büchner. Se evaporó el extracto a presión reducida en el rotavapor Buchi R3000 a una temperatura promedio de 60°C, haciendo girar el balón a 60 rpm hasta lograr un extracto de consistencia blanda. Concentrando en una estufa a 40°C, hasta obtener un extracto seco, que fue almacenado y conservado en refrigeración hasta el momento de su uso en los diferentes ensayos.

### **3.3.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS**

Las reacciones de identificación se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Miranda y Cuellar (2000).

### **3.4. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR**

Se preparó el fármaco patrón (control positivo) de furosemida tabletas de 40 mg (genérico GENFAR) a dosis de 20 mg/kg.

### **3.5. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN**

Se pesó y disolvió cinco gramos de la muestra del extracto concentrado con tween 80 y se vertió en una fiola de 100 mL, se enrasó con agua destilada estéril obteniéndose una concentración al 5 % de la solución patrón.

### **3.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DIURÉTICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO**

#### **3.6.1. MÉTODO**

La metodología empleada para la determinación de la actividad diurética se basó en el método utilizado por Naik y colaboradores, modificado por la cátedra de Farmacología de la Escuela de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (Tinco, 2011).

#### **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

- Se utilizó 25 cobayos del mismo sexo y edad con un peso corporal entre 400 a 500 gramos. Los mismos que fueron mantenidos en ayunas por 12 horas antes de la prueba, sin ser privadas de agua.
- Se conformaron cinco grupos controles de cinco animales cada grupo que fueron pesados e hidratados con cloruro de sodio al 0,9 % por vía oral a través de una sonda gástrica, en una dosis de 50 mL/kg de peso corporal.
- Los cobayos tratados fueron puestos en la jaula de diuresis.
- Después de 20 minutos de la hidratación se les administró por vía oral: cloruro de sodio al 0,9 % como control negativo; el extracto hidroalcohólico a

100 mg/kg, 200 mg/kg y 400 mg/kg y el control positivo: furosemida a 20 mg/kg.

- Después de una hora se recolectó la orina por un periodo de cinco horas en una probeta graduada y se registró el volumen correspondiente.

### 3.6.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se conformaron cinco grupos controles de cinco cobayos cada uno distribuido aleatoriamente, los que fueron sometidos a los siguientes tratamientos:

TRATAMIENTO	LOTE# 01	LOTE #02	LOTE #03	LOTE #04	LOTE #05
Hidratación (NaCl 0,9 %) 50 mL/kg	X	X	X	X	X
<b>después de 20 minutos</b>					
NaCl 0,9 % (control negativo)	2 mL				
Furosemida 20 mg/kg (control positivo)		X			
Extracto de hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. "romero" a 100 mg/kg			X		
Extracto de hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. "romero" a 200 mg/kg				X	
Extracto de hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. "romero" a 400 mg/kg					X

Se expresó la excreción volumétrica urinaria (EVU) en porcentaje utilizando la siguiente fórmula:

$$EVU = \frac{\text{Volumende orina excretado}}{\text{Volumen de liquido administrado}} \times 100$$



Y la actividad diurética expresada en porcentaje, utilizando la siguiente fórmula:

$$AD = \frac{\text{Volumen de orina excretada}}{\text{Vol. orina del diuretico standar}} \times 100$$

### 3.7. DETERMINACIÓN DEL BIOENSAYO DE TOXICIDAD

Este ensayo permitió determinar la toxicidad en los nauplios de la *Artemia salina* que es altamente sensible a una gran variedad de sustancias químicas; para este caso la toxicidad se expresa como Concentración Letal 50 (CL<sub>50</sub>), que no es otra cosa que la concentración que, administrada en el medio ambiente de la población de animales en estudio, causa la muerte al 50 % de los individuos, se expresa en ppm. Los valores de CL<sub>50</sub> menores de 1 000 ppm son considerados activos (Meyer y Col., 1982; Cáceres, 1999).

#### 3.7.1. PROCEDIMIENTO

- Se preparó en viales cuatro diluciones distintas: 10 ppm, 100 ppm, 500 ppm y 1 000 ppm, cada dilución cuenta con sus respectivas concentraciones: 5 µL, 50 µL, 250 µL y 500 µL respectivamente (siendo tres viales por cada concentración: 12 en total)
- Cada concentración contó con un blanco para su observación.
- A cada vial se le agregó 10 nauplios y la dilución del extracto requerido.
- Se agregó agua de mar hasta completar cinco mL por vial. A cada vial se le agregó además una gota de suspensión de levadura (tres mg de levadura seca se disuelven en cinco mL de agua de mar) como alimento.
- Después de 24 horas, se contó y anotó el número de sobrevivientes en cada dilución.

### 3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con los datos obtenidos se procedió a evaluar mediante el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza del 95 % ( $\alpha < 0,05$ ), para determinar las

diferencias significativas entre los grupos tratados con el extracto y el grupo control. Se realizó comparaciones múltiples de Tukey de los valores de diuresis (mL) y la prueba de mínimas diferencias significativas (MDS) de Fischer, para determinar estadísticamente cual de los tratamientos posee el mismo comportamiento farmacológico. Para determinar la CL<sub>50</sub> en la prueba de *Artemia salina* se utilizó el método de PROBITS.

#### **IV. RESULTADOS**

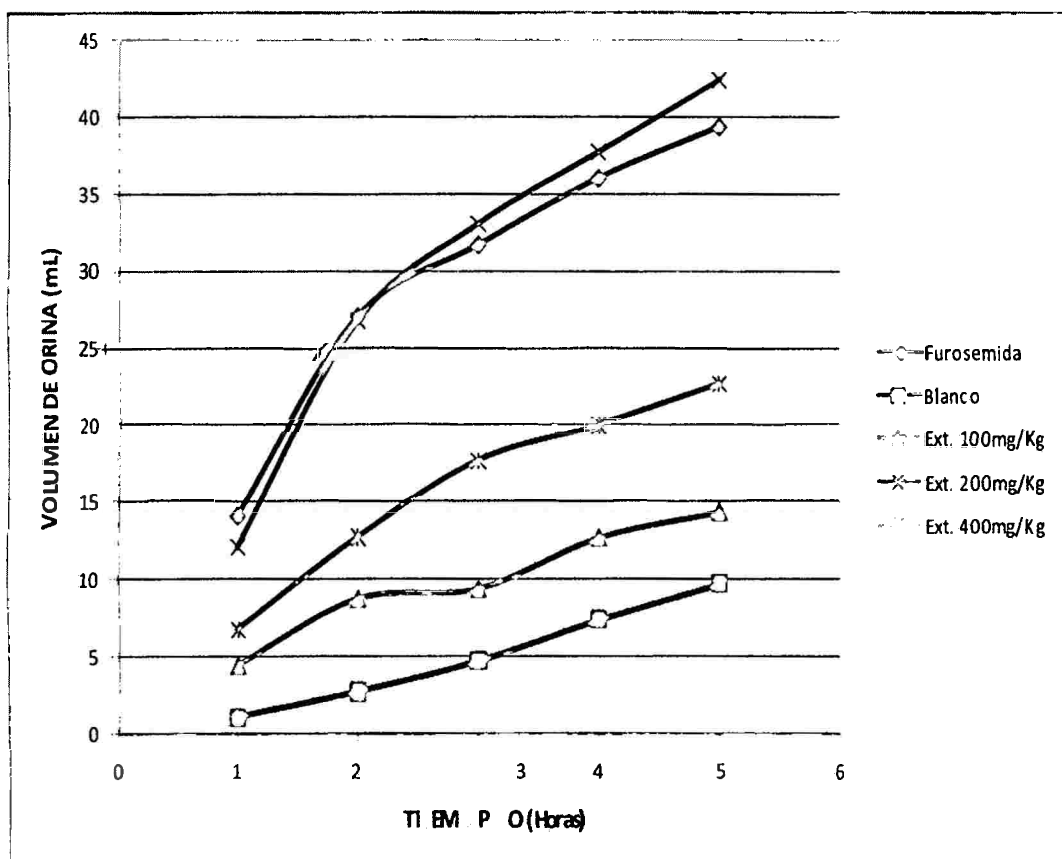
**CUADRO Nº 01:** Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. "romero". Ayacucho – 2012.

METABOLITOS SECUNDARIOS	ENSAYO	RESULTADOS	OBSERVACIÓN
FENOLES Y/O TANINOS	Cloruro férrico	+++	Verde azulado
AZUCARES REDUCTORES	Benedict	++	Precipitado Rojo naranja
FLAVONOIDES	Shinoda	+++	Amarillo a rojo
ESTEROIDES Y/O TRITERPENOS	Lieberman	++	Rojo
SAPONINAS	espuma	+++	Formación de espuma
RESINAS	Resinas	+++	Precipitado verdoso
LACTONAS Y/O CUMARINAS	Baljet	++	Ligera coloración Rojiza
ALCALOIDES	Dragendorff	++	Formación precipitado
	Mayer	++	Formación precipitado
	Hager	++	Formación precipitado
SUSTANCIAS AMARGAS	Gusto	+++	Sabor amargo

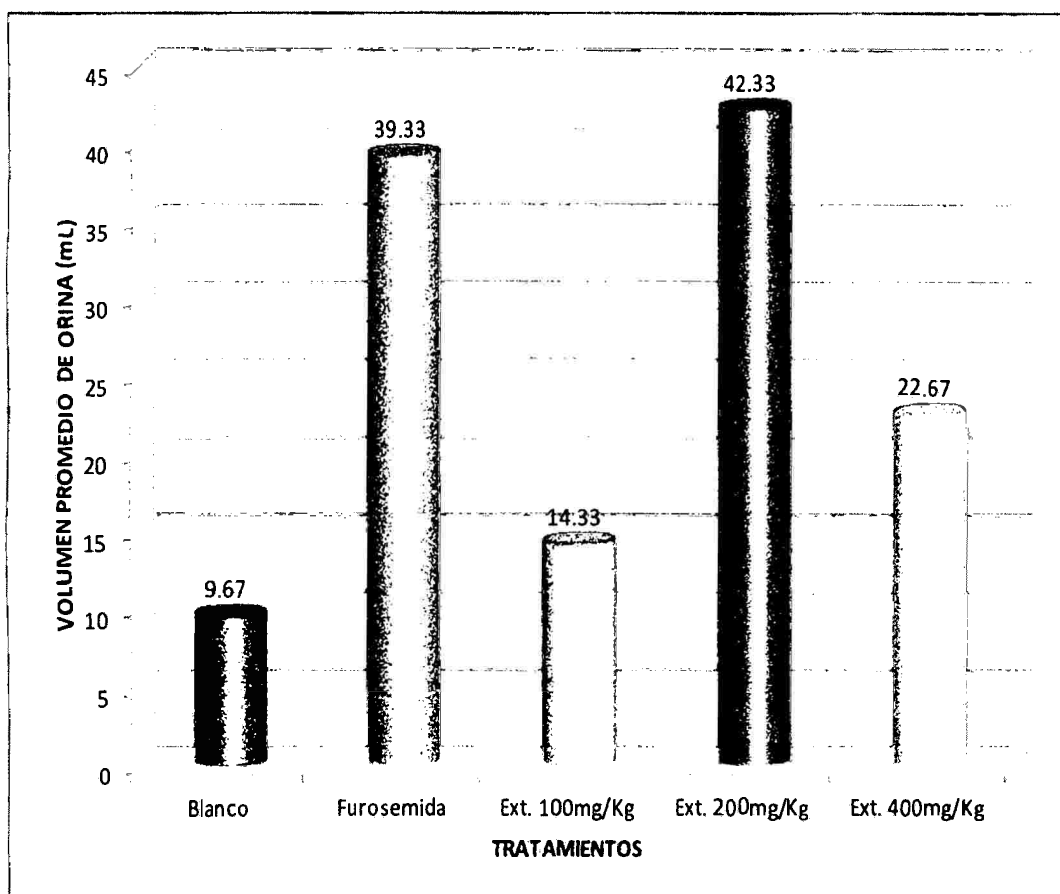
Leyenda:

(+++) : Abundante

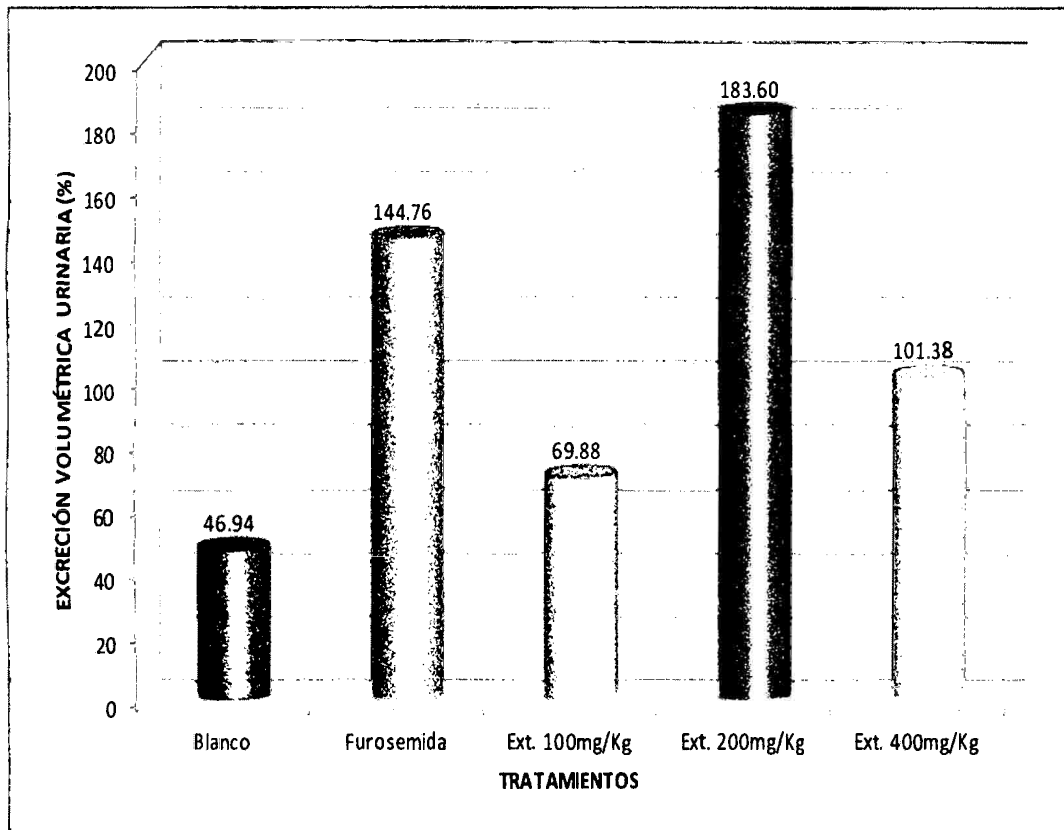
(++) : Moderado



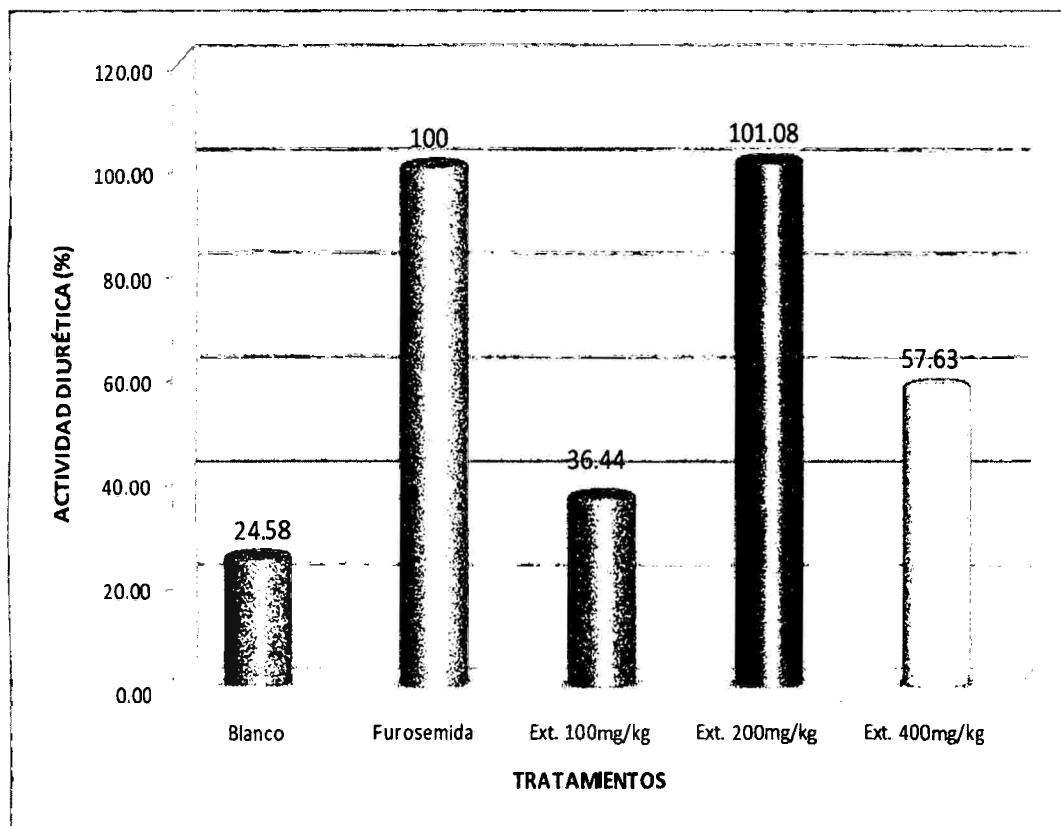
**GRÁFICO Nº 01:** Variación del volumen de orina en función del tiempo por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. "romero". Ayacucho – 2012.



**GRÁFICO Nº 02:** Volumen promedio final de orina por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. "romero". Ayacucho – 2012.

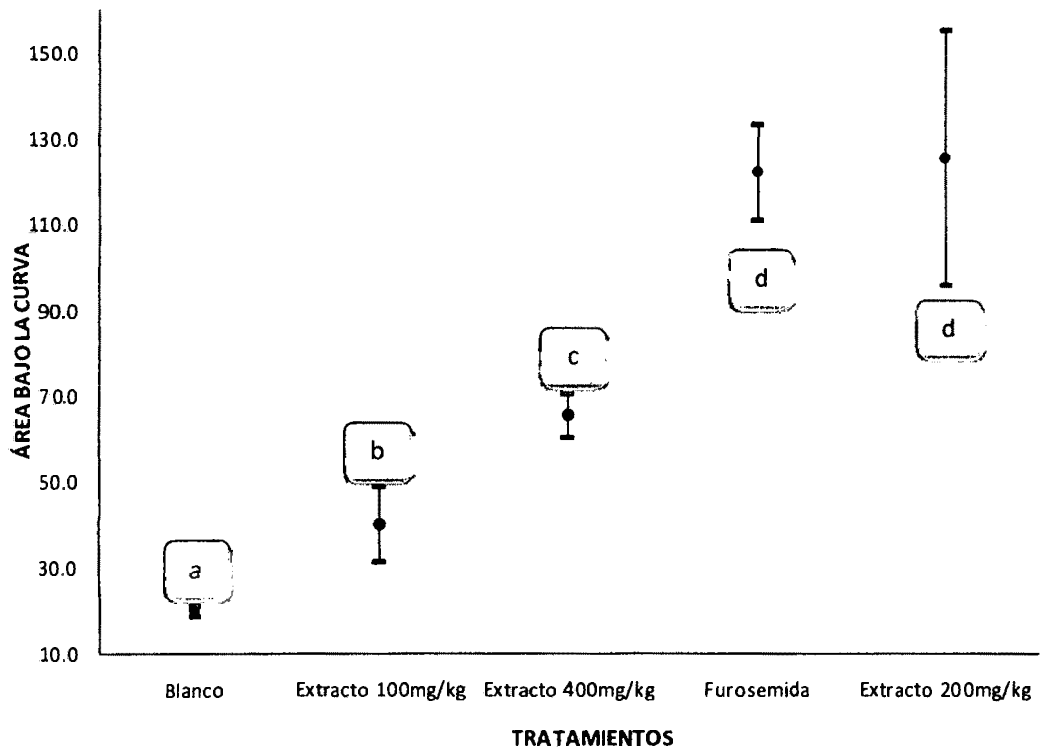


**GRÁFICO N° 03:** Excreción volumétrica urinaria según tratamiento del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. "romero". Ayacucho – 2012.



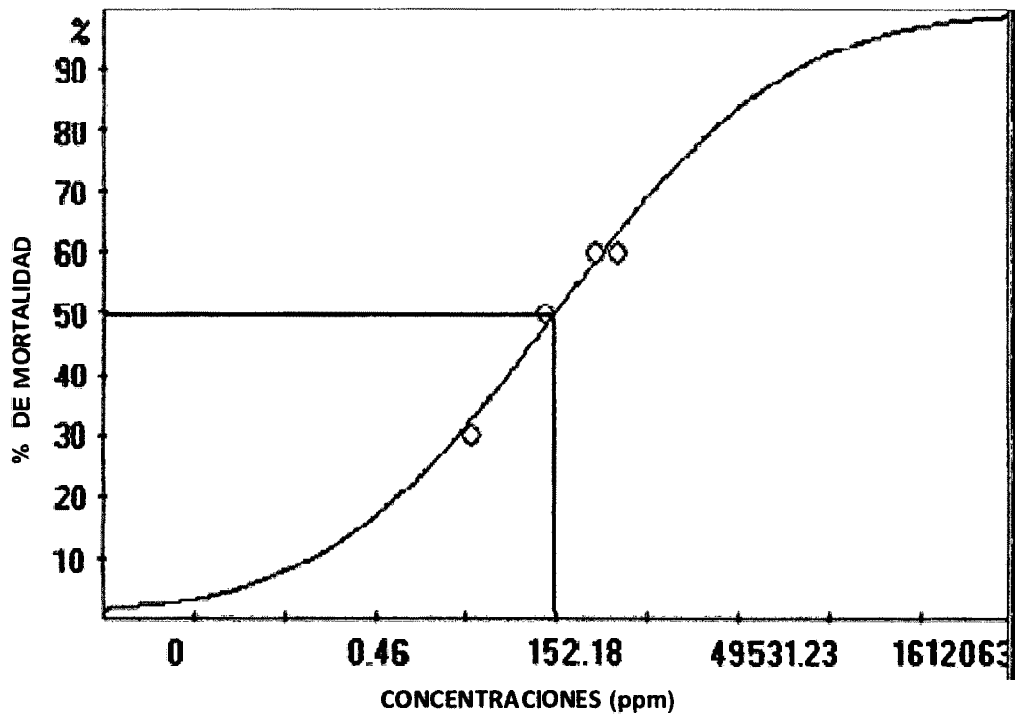
**GRÁFICO Nº 04:** Actividad diurética según tratamiento del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. "romero". Ayacucho – 2012.





ANVA:  $\alpha < 0,05$

**GRÁFICO N° 05:** Prueba de Mínimas Diferencias Significativas de Fischer de la variación del área bajo la curva del volumen de la orina en función del tiempo según tratamiento. Ayacucho – 2012.



**GRÁFICO N° 06:** Curva del porcentaje de mortalidad de *Artemia salina* respecto a las concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. "romero". Ayacucho – 2012.

## V. DISCUSIÓN

Las plantas medicinales han sido utilizadas desde épocas primitivas para el tratamiento de enfermedades. La mayoría de estas presentan efectos fisiológicos múltiples debido a la presencia de más de un principio activo. Estos últimos corresponde a compuestos químicos propios de la planta, que están sometidas a variables físicas, tales como humedad del suelo, condiciones de luz, temperatura y otros (Procter, 1992).

La estandarización de estas condiciones, así como el control de calidad aplicado a todas las fases de elaboración, y los resultados clínicos observados en estudios ha permitido que la Organización Mundial de la Salud publicara monografías sobre algunas de las plantas medicinales con mayor respaldo científico (Procter, 1992).

El *Rosmarinus officinalis* L. "romero", es usada a nivel mundial y en nuestra población por su acción diurética a nivel de las vías urinarias, esto motivó a estudiar a la mencionada especie vegetal.

Para la valoración de la actividad diurética de las hojas del *Rosmarinus officinalis* L. "romero", se utilizó el método descrito por Naik y col. modificada por la cátedra de Farmacología de la Escuela de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (Tinco, 2011), siendo éste un método adecuado y económico para la realización de este tipo de investigaciones.

Se hace uso de la furosemida como referencia en el presente trabajo de investigación teniendo en cuenta su farmacocinética; por su buena absorción por vía oral y/o parenteral, ya que es un fármaco de máxima eficacia produciendo así una buena diuresis.

Miranda y Cuellar (2000), 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, y siendo útil además para el tipo de actividad que se requiere obtener.

En el tamizaje fitoquímico que se realizó en el Cuadro Nº 01, se identificó los siguientes metabolitos secundarios: fenoles y/o taninos, flavonoides, saponinas, resinas, sustancias amargas, azúcares reductores, triterpenos y/o esteroides, lactonas y/o cumarinas. Todos los metabolitos analizados se encuentran en abundante y moderada cantidad debido a que el extracto hidroalcohólico, arrastra metabolitos secundarios mediana y fuertemente polares.

En estudios realizados de *Rosmarinus officinalis* L. "romero" se ha demostrado al realizar el tamizaje fitoquímico la presencia de ácidos esenciales, flavonoides, fenoles y taninos en mayor cantidad, de algún modo contribuye a su efecto diurético.

Resultados similares fueron informados por Jimenez y Col. (1999), Narayanan y Col. (2000), que fueron citados por Martinez y Col. (2004), estos autores mencionan que el romero posee, componentes activos como: saponina, glucósidos, ácidos orgánicos, principios amargos y algunas resinas. Algunos de estos involucrados también en los efectos farmacológicos encontrados al extracto y presentes además en otros donde se han reconocido dichas acciones (antipirética y diurética).

Los aceites esenciales están formados por 1 – 2 % principalmente derivados de tipos terpénicos: hidrocarburos como el pineno, alcoholes como el borneol y sus ésteres, o cetonas como el alcanfor (15 – 25 %). El  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno actúan irritando el riñón con lo aumenta la irrigación de sangre (hiperemia) y la filtración glomerular, obteniéndose un efecto diurético (aumenta la excreción urinaria hasta un 100%) (Kuklinski, 2000).

Los flavonoides son sustancias que representa a uno de los más importantes grupos de compuestos con actividad farmacológica y poseen una alta reactividad química que se manifiesta por sus efectos sobre diferentes sistemas biológicos; muchas de esas propiedades son atribuidas a los flavonoides como: antimicrobiana, antialérgica, diurética, antivírica, cicatrizante, antiagregante plaquetario y hepatotóxico (Lock de Ugaz, 1994).

Los taninos y polifenoles comprenden un grupo de sustancias complejas localizadas en las hojas, tallos, frutos y corteza de la planta. Tienen propiedades farmacológicas: antioxidantes, antidiarreica y cicatrizante las cuales se adhieren con facilidad en la absorción de la piel, además los polifenoles tienen propiedades diuréticas que han sido comprobadas en experimentación con cobayos (Evans, 1991).

En el Gráfico N° 01 se observa la variación del volumen de orina en función del tiempo por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. “romero”, en el cual se observa que a medida que pasa el tiempo va aumentando la eliminación de orina y nos da una gráfica de dosis-respuesta, a diferencia de otras investigaciones la furosemida no mostró tener mayor actividad como se era de esperar; por el contrario, el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” a 200 mg/kg tuvo un comportamiento superior dando un volumen de orina excretado de 42,33 mL,

mientras que el diurético control tiene un comportamiento menor, mostrando un volumen de orina excretado de 39,33 mL.

En el Gráfico N° 02 se observa el histograma de frecuencias, referido al volumen promedio final de orina por efecto del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. "romero", donde se confirma que a la dosis de 200 mg/kg se obtiene un volumen final superior al grupo control, furosemida; resaltando que el volumen promedio de orina eliminado por el extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. "romero" a 200 mg/kg fue de 42,33 mL, seguido por la furosemida con un volumen de excreción de 39,33 mL. A la dosis de 100 mg/kg 14,33 mL, a 400 mg/kg 22,67 mL y con el blanco un volumen de 9,67 mL. El análisis de varianza del volumen final de orina muestra que los tratamientos son diferentes entre sí y la prueba complementaria de Tukey nos señala que existe una similitud entre el diurético de control con la dosis de 200 mg/kg (Anexos N° 16 y N° 17)

En el Gráfico N° 03 se presenta el histograma de frecuencias, observando que la excreción volumétrica urinaria expresada en porcentaje se halla dividiendo el volumen de orina excretado entre el volumen de líquido administrado multiplicado por 100, donde se obtiene como resultado el porcentaje del extracto hidroalcohólico a 200 mg/kg de 183,60 %, siendo este el mayor en comparación al resto de los tratamientos, incluyendo al control positivo la furosemida que tiene como resultado 144.76 %, que es reconocida con muy buena actividad diurética; esto nos indica que el extracto hidroalcohólico del *Rosmarinus officinalis* L. "romero" a 200 mg/kg tiene mayor actividad diurética en comparación a la furosemida y por lo tanto con mejores resultados presentados por otros estudios realizando la misma actividad como es el caso del *Equisetum bogotense* "cola de caballo" (Rejas, 1999) y *Petroselinum sativum* "perejil" que obtuvieron 38,9 % y 33,3 % respectivamente; seguido a 400 mg/kg que tiene un porcentaje de 101,38

%, por último a la concentración de 100 mg/kg que presenta un porcentaje de excreción volumétrica de 69,98 % y el control negativo mostró un porcentaje de excreción volumétrica de orina de 46,94 %. Las pruebas estadísticas de análisis de varianza encuentran diferencias entre los diferentes porcentajes de excreción volumétrica urinaria y la prueba de Tukey encuentra que la furosemida con la dosis de 200 mg/kg del extracto hidroalcohólico tienen la misma respuesta biológica.

En el Gráfico N° 04, se representa la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L., expresada en porcentaje, observando que hay variación entre los tratamientos administrados, donde a dosis de 100 mg/kg es superior al blanco con un porcentaje de 36,44 %, a 200 mg/kg de peso tiene una diferencia significativa frente a la furosemida presentándose así con mayor actividad diurética a lo que se esperaba; notándose así que hay un tratamiento diferente a los demás; asimismo, seguido por la dosis de 400 mg/kg de peso que tiene un mejor comportamiento que la dosis de 100 mg/kg de peso con un porcentaje de 57,63 %, pero menor que la dosis de 200 mg/kg de peso; observándose así que al igual que en los otros gráficos a 200 mg/kg se obtiene mayor actividad diurética. Esta actividad diurética obtenida en el presente trabajo de investigación del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. a 200 mg/kg fue de 101,08 %, que es superior a los resultados obtenidos por otros trabajos de investigación realizados en la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga como: en *Petroselinum sativum* “perejil” (Oré, 2000), *Foeniculum vulgare* “hinojo” (Oriundo, 2004), *Bidens pilosa* “sillkai” y *Sambucus peruviana* H.B.K. “sauco” (Prado, 2008), quienes reportaron valores de 0,151; 0,224; 0,252 y 0,354 de actividad diurética respectivamente, siguiendo el mismo método y así como del material biológico utilizado en el presente trabajo.

La representación gráfica de la Prueba de Mínimas Diferencias Significativas de Fischer se realiza para hacer comparaciones múltiples; es así que en el Gráfico N° 05 se observa que, el control positivo, furosemida a 20 mg/kg, es estadísticamente similar a la dosis de 200 mg/kg de peso del extracto hidroalcohólico del *Rosmarinus officinalis* L. "romero" ( $\alpha < 0,05$ ).

Las diferencias entre los tratamientos fueron confrontados estadísticamente a través del análisis de varianza, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha < 0,05$ ) y la prueba de Tukey que muestra que el extracto a dosis de 100 mg/kg, 400 mg/kg y el blanco, tienen un comportamiento biológicamente diferentes en comparación con la furosemida. Lo que ocurre por el contrario, con la furosemida que tiene un comportamiento similar con el extracto a 200 mg/kg.

En el gráfico N° 06 adicionalmente se realizó la determinación de la bioactividad en nauplios de *Artemia salina*, donde se determinó la concentración letal,  $CL_{50}$  de 152.18 ppm, indicando la bioactividad de este extracto, con valores menores a 1000ppm se le considera como biológicamente activo (CYTED, 1995), es decir, el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. "romero" contiene sustancias químicas con actividad biológica.



## VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. "romero" presentó actividad diurética demostrándose en la excreción volumétrica urinaria de los cobayos.
2. Se identificó en el tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Rosmarinus officinalis* L. "romero" la presencia de los siguientes metabolitos secundarios: taninos, polifenoles, flavonoides, lactonas y/o triterpenos, sustancias amargas.
3. La dosis con mejor actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Rosmarinus officinalis* L. "romero" fue registrado a una concentración de 200 mg/kg con mejor excreción volumétrica urinaria de 183,60 % en relación a la furosemida que fue de 144,76 %.
4. Se determinó la toxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Rosmarinus officinalis* L. "romero" teniendo compuestos que son biológicamente activos con concentración letal CL<sub>50</sub> de 152,18 ppm en nauplios de *Artemia salina*.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Elucidar y aislar los principios activos responsables de la actividad farmacológica encontrados en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. "romero", para su mejor estudio y posible desarrollo de tecnología de una forma farmacéutica.
2. Complementar estudios para determinar otras actividades relacionadas a la actividad diurética, que puedan ser útiles a la población con la planta en estudio.
3. Determinar la toxicidad de esta especie vegetal, a fin de proponer su adecuado uso a nivel posológico y fitoterapéutico.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aguay, M.** 2012. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de la mezcla de extractos fluidos de jengibre (*Zingiber officinale*), tomillo (*Thymus vulgaris L.*), romero (*Rosmarinus officinalis L.*) mediante el test de edema inducido en ratas (*Rattus norvegicus*). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Tesis de Grado. Riobamba – Ecuador.
2. **Aldave, A. Mostacero, L. y León, J.** 1998. Botánica Farmacéutica. CONCYTEC, UNT. Editorial La Libertad. Trujillo – Perú.
3. **Álvarez, C.** 1994. Modificación del curso de la cirrosis experimental con extractos totales del romero (*Rosmarinus officinalis*). Tesis Universidad de Colina. Colina – Colombia.
4. **Bruneton, J.** 1991. Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. Editorial Acribia S.A. España.
5. **Cáceres, A.** 1999. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Edit. Universitaria. Universidad San Carlos de Guatemala.
6. **CYTED** 1995. Manual de Técnicas de Investigación. Programa Iberoamericano de Ciencia y tecnología para el Desarrollo.
7. **Evans, W.** 1991. Farmacognosia. 15ava. Ed. Edit. Interamericana. México.
8. **Flores, J.** 1998. Farmacología Humana. Tercera edición. Editorial Masson S.A. Madrid– España.
9. **Franco, V.** 2002. Evaluación de la actividad diurética de *Krameria lappacea* “ratania” en cobayo. Tesis UNSCH. Ayacucho – Perú.
10. **González, V.** 2004. Evaluación de la actividad diurética del extracto atomizado de *Bidens pilosa* “sillkau” en cobayos. Tesis UNSCH. Ayacucho – Perú.
11. **Goodman, A. y Gilman, P.** 2007. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Tomo II. Undécima edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Bogotá – Colombia.
12. **Jackson, K.** 1996. Diuréticos. En: Goodman G. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9na ed. México: Médica Panamericana, 1996:735-763.
13. **Katzung, B.** 1999. Farmacología básica y clínica. Séptima edición. Editorial El Manual Moderno S.A. México, D.F.

14. **Kuklinski, C.** 2000. *Farmacognosia*. Editorial Omega S.A. Madrid.
15. **Litter, M.** 1997. *Farmacología*. Editorial El Ateneo. Buenos Aires – Argentina.
16. **Lock de Ugaz, O.** 1994. *Investigación fitoquímica. Métodos de Estudio de los Productos Naturales*. Segunda edición. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
17. **López, M.** 2001. *Fitoterapia. Plantas medicinales con acción diurética*. [http://apps.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet?\\_f=10&pident\\_articulo=13761&pident\\_usuario=0&pident\\_revista=4&fichero=04v20n01a01015pdf001.pdf&ty=81&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es](http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13761&pident_usuario=0&pident_revista=4&fichero=04v20n01a01015pdf001.pdf&ty=81&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es)
18. **Manrique, J.** 2004. Efecto diurético a diferentes concentraciones del extracto acuoso atomizado de *Taraxacum officinale* “diente de león”. Tesis UNSCH. Ayacucho – Perú.
19. **Martínez S, La Paz J, Corral A, Martínez C.** 2004. Actividad Diurética y Antipirética del extracto fluido de *Rosmarinus officinalis* L. en ratas. *Rev. Cubana de Plantas Medicinales*. 9(1).
20. **Mayhua, H.** 2008. Actividad diurética del extracto hidroalcohólico del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* “mashua” en ratas. Tesis UNSCH. Ayacucho - Perú.
21. **Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D., McLaughlin, J.** 1982. "Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay For Active Plant Constituents", In: *Journal of Medicinal Plant Research*, Vol. 45, No. 31.
22. **Miranda, M. y Cuellar, A.** 2000. *Manual de Prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales*. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad La Habana, Cuba.
23. **Montesdeoca, V.** 2010. *Elaboración y Control de Calidad de comprimidos fitofarmacéuticos de ajenojo (*Artemisia absinthium* L.), romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) para combatir la menstruación dolorosa*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Tesis de Grado. Riobamba – Ecuador.
24. **Mostacero, J. y Mejía, F.** 1993. *Taxonomía de Fanerógamas Peruanas*. 1ra edición. Editorial Libertad E.I.R.L. Trujillo-Perú.

25. **Muñoz, A.** 1994. Plantas medicinales y su utilización práctica. Santa Fe Bogotá. Colombia.
26. **Oriundo, S.** 2003. Tamizaje fitoquímico y determinación de la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Foeniculum vulgare* "hinojo". Tesis UNSCH. Ayacucho– Perú.
27. **Pérez D.** 2001. Instituto Biológico de la Salud. Fitoterapia. Madrid – España; disponible en:  
<http://www.institutobiologico.com/downloads/Manual%20de%20Fitoterapia.pdf>
28. **Pérez M, Morón F.** 2011. Consideraciones Farmacológicas sobre Principios Activos en Plantas Medicinales con Actividad Diurética. Revista Latinoamericana de Hipertensión. Vol. 6. Núm. 2. Caracas - Venezuela.
29. **Prado, N.** 2008. Evaluación de la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las flores de *Sambucus peruviana* H.B.K. "sauco" en cobayos. Tesis UNSCH. Ayacucho – Perú.
30. **Procter, H.** 1992. Principles of Leather Manufacture. New york. Pp. 10 – 24.
31. **Quispe, C.** 2003. Evaluación de la actividad antioxidante por captación de radicales libres del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* "romero". Ayacucho –2003. Tesis UNSCH. Ayacucho– Perú.
32. **Rémington, G.** 2003. Farmacia. Tomo II. 20ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires – Argentina.
33. **Rodríguez, M.** 2002. Plantas medicinales y medicamentos herbarios. En: Morón – Levy. Farmacología General. 1ra edición. Editorial Ciencias Médicas. Ciudad de la Habana – Cuba.
34. **Sisa, J.** 2002. Romero (*Rosmarinus officinalis*). Madrid - España; disponible en:  
<http://www.ecoaldea.com/index2.htm>
35. **Smith, M., Cedric, M.** 1999. Farmacología. Tomo II. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires – Argentina.
36. **Sosa, K.** 2004. Efecto antiespasmódico de la infusión de *Rosmarinus officinalis* L. "romero". Ayacucho – 2004. Tesis UNSCH. Ayacucho – Perú.
37. **Tinco, A.** 2011. Efecto hipotensor del extracto metanólico de *Jatropha macrantha* Mull. Arg. "huanarpo macho" en ratones hipertensos por L-NAME. Tesis para optar el grado académico de Magister en Farmacología. UNMSM. Lima – Perú.

38. **Uriarte, V., Trejo, S.** 2003. Farmacología Clínica. Primera edición. Editorial Trillas S.A. de C.V. México.
39. **Velázquez, A.** 1993. Farmacología. 16ava. edición. Edit. Mc Graw Hill Interamericana. México.
40. **Vilches T, Martínez C.L, Fernández A.** 2005. Plantas Medicinales con Acción Diurética en Cuba (Revisión bibliográfica). 24 de enero del 2005. <http://pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de/allgemei/koehler/koeh-258.jpg>.
41. **Villar del Fresno, M.**1999. Farmacognosia General. Editorial Síntesis S.A. Madrid, España.

## **ANEXOS**



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

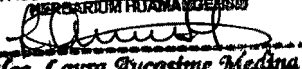
Que, el Bach. en Farmacia y Bioquímica, **Sr. Henry Fortunato, POMA MENDEZ**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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	:	Rosmarinus
ESPECIE	:	<b><i>Rosmarinus officinalis L.</i></b>
N.V.	:	"romero"

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

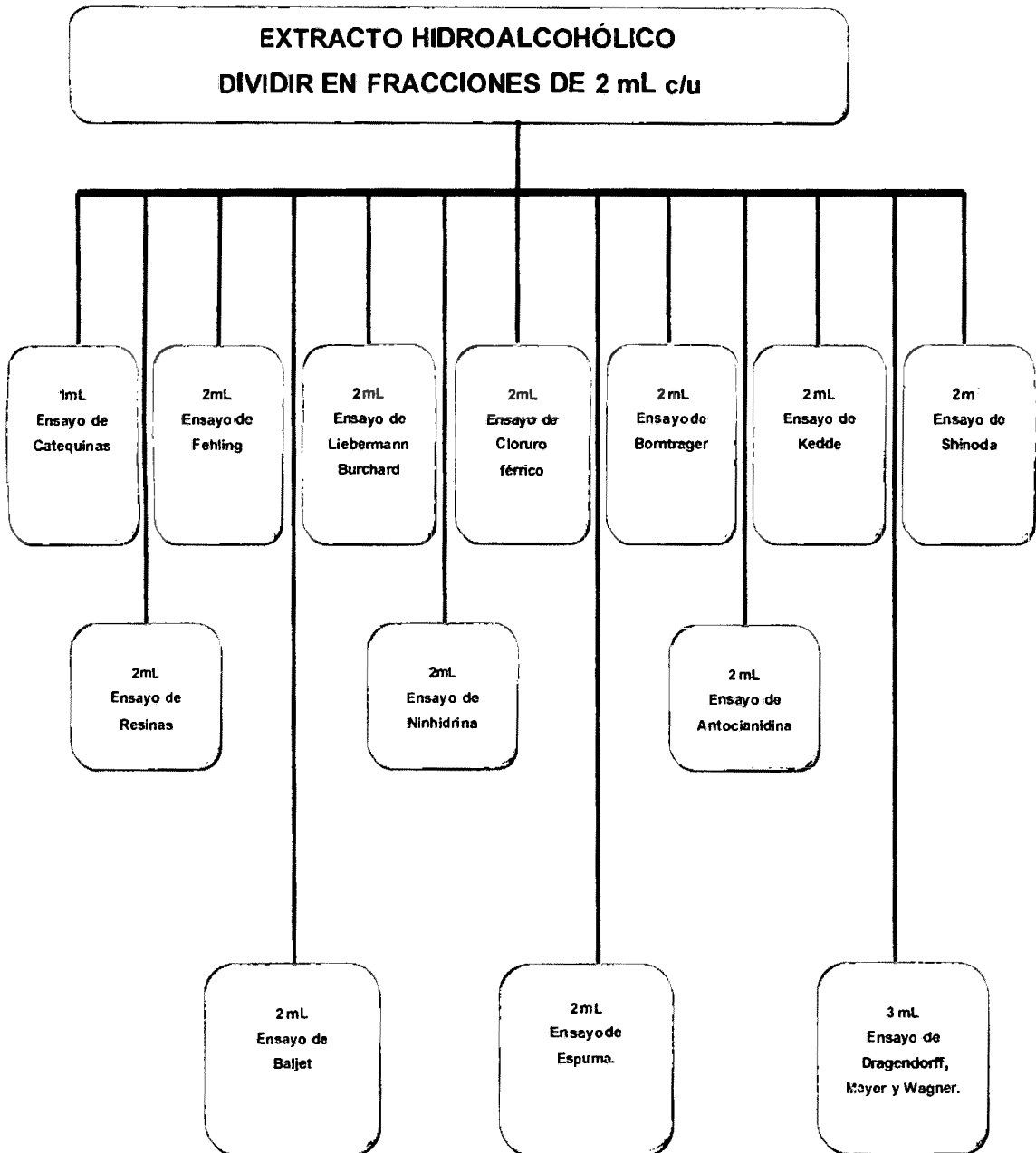
Ayacucho, 27 de Marzo del 2012

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HERBARIUM HUAMANGENSIS  
  
**Bga. Laura Pucosime Medina**  
JEFE



ANEXO N°02

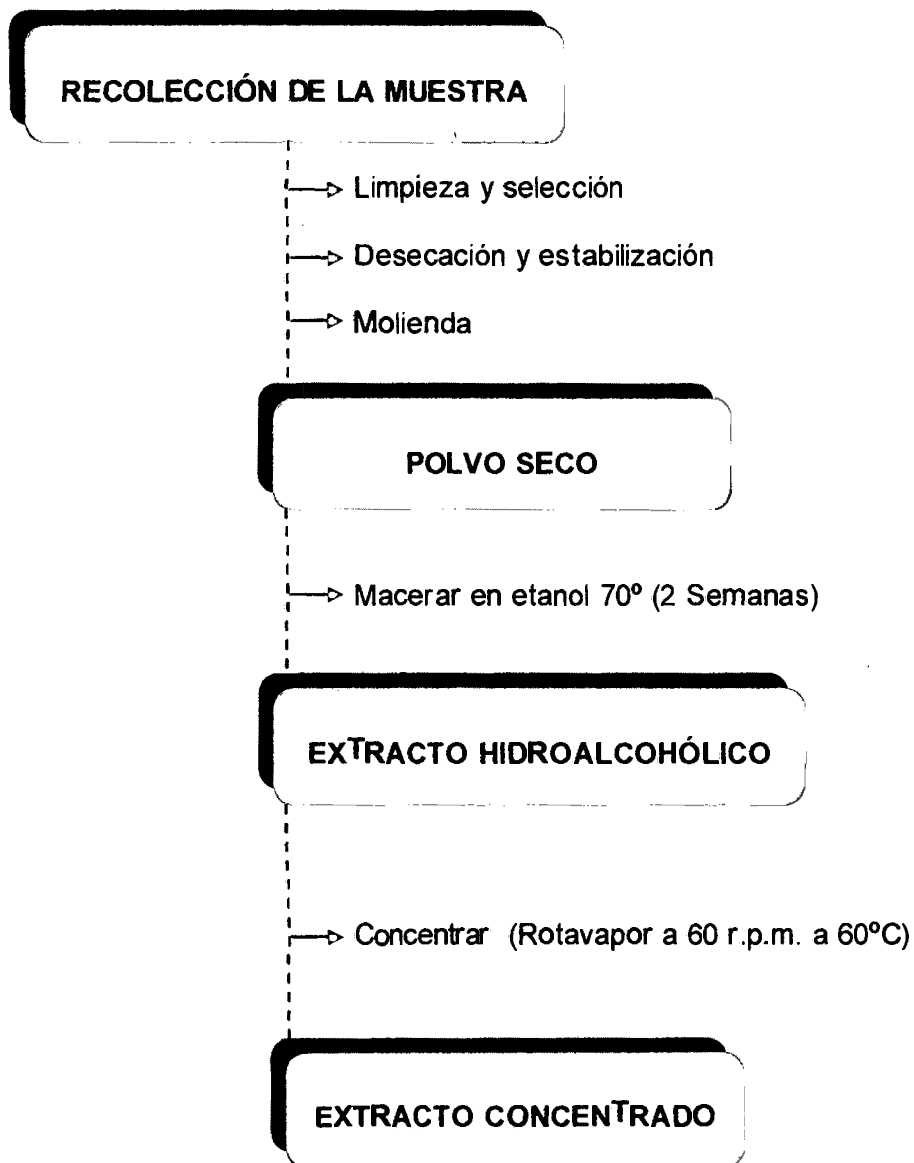
ESQUEMA DEL ANÁLISIS QUÍMICO CUALITATIVO EN EL EXTRACTO  
HIDROALCOHOLICO DE *Rosmarinus officinalis* L. "romero"



Fuente: Miranda y Cuellar, (2000).

### ANEXO N°03

#### OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO



Fuente: Lock de Ugaz, (1994)

**ANEXO N° 04**

Rivera del rio Huatatas, provincia de Huamanga, región de Ayacucho.



ANEXO Nº 05

*Rosmarinus officinalis* L. "romero". Ayacucho – 2012.



## ANEXO N° 06

Concentración del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. "romero".  
Ayacucho – 2012.



## ANEXO N° 07

Identificación de los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. "romero". Ayacucho – 2012.



ANEXO N° 08

Extracto hidroalcohólico concentrado de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L.  
"romero". Ayacucho – 2012.



## ANEXO N° 05

Pesaje de *Cavia porcellus* "cobayo" para calcular la dosis de extracto hidroalcohólico, control y blanco. Ayacucho – 2012.





## ANEXO N°10

Administración por vía oral del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. "romero" a la unidad experimental. Ayacucho – 2012.



## ANEXO N°11

Obtención del volumen de orina eliminado por *Cavia porcellus* "cobayo".  
Ayacucho – 2012.



ANEXO N° 12

Incubación y recolección de nauplios de *Artemia salina*. Ayacucho – 2012.



### ANEXO N° 13

Preparación de nauplios de *Artemia salina* en viales con cuatros diluciones distintas a diferentes concentraciones con su respectivo blanco. Ayacucho – 2012.



## ANEXO N°14

Volumen promedio de orina obtenido de cobayos utilizado en los diferentes tratamientos de *Rosmarinus officinalis* L. "romero". Ayacucho – 2012.

<b>Valores Promedio de volumen de orina (mL)</b>					
Tiempo (horas)	Furosemida 20 mg/kg	Blanco NaCl 0.9 % (mL)	Extracto hidroalcohólico de las hojas		
			100mg/kg	200mg/kg	400mg/kg
1 Hr.	14,00	1,00	4,33	12,00	6,67
2 Hr.	27,00	2,67	8,67	26,67	12,67
3 Hr.	31,67	4,67	9,33	33,00	17,67
4 Hr.	36,00	7,33	12,67	37,67	20,00
5 Hr.	39,33	9,67	14,33	42,33	22,67

## ANEXO N° 15

Datos descriptivos del volumen de orina del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. "romero", en función del tiempo y según los tratamientos. Ayacucho – 2012.

### Área Bajo la Curva

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Blanco	5	19.7600	.48497	.28000	18.5553	20.9647	19.20	20.04
Furosemida	5	122.1667	4.50592	2.60150	110.9733	133.3600	117.80	126.80
Extracto 100mg/kg	5	39.9733	3.51230	2.02783	31.2483	48.6984	36.84	43.77
Extracto 200mg/kg	5	125.4667	11.93412	6.89017	95.8207	155.1127	112.80	136.50
Extracto 400mg/kg	5	65.5133	2.04052	1.17810	60.4444	70.5823	63.66	67.70
Total	25	74.5760	44.54206	11.50071	49.9094	99.2426	19.20	136.50

## ANEXO N° 16

Comparación de medias mediante la prueba de Tukey del volumen total de las tres concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. "romero", furosemida, y un blanco (cloruro de sodio 0.9 %); en cobayos. Ayacucho – 2012.

HSD de Tukeya

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa= 0.05			
		1	2	3	4
Blanco	5	19,7600			
Extracto 100mg/kg	5		39,9733		
Extracto 400mg/kg	5			65,5133	
Furosemida	5				122,1667
Extracto 200mg/kg	5				125,4667
Sig.		1.000	1.000	1.000	.958

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

## ANEXO N° 17

Análisis de varianza del área bajo la curva de la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. "romero", en función del tiempo y según tratamientos. Ayacucho – 2012.

### Área Bajo la Curva

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	27417.005	4	6854.251	190.967	.000
Intra-grupos	358.924	20	35.892		
Total	27775.929	24			



## ANEXO N° 18

Imagen del análisis de datos por el método de Probits. Ayacucho – 2012.

The screenshot shows a software window titled "Probits" with a standard Windows-style title bar. The main content area is titled "Datos Ingresados" and features a table of input data, a "Salir" button, and a list of statistical results. The data table is as follows:

Datos Ingresados		
Dosis	Casos	Positivos
10	10	3
100	10	5
500	10	6
1000	10	6

Below the table, there are buttons for "Ingreso de datos" and "Extracto hidro". The statistical results are displayed on the right side of the window:

- Log DL50 (Definitivo) = 2.18238
- Log DL50 (Provisional) = 2.18082
- Log del ES de la DL50 = 0.5072
- Regresión:  $y = 4.13139 + 0.39801x$
- DL50 = 152.1865
- Límite Superior 95% = 1501.3512
- Límite Inferior 95% = 15.4266

At the bottom of the window, there are five buttons: "Reiterar", "Nuevo Compuesto", "Archivar", "Grafica", and "Imprimir".

**ANEXO N° 19  
MATRIZ DE CONSISTENCIA**

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
Actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. "romero" en <i>Cavia porcellus</i> "cobayo". Ayacucho – 2012.	¿Tendrá efecto el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. "romero" probadas en <i>Cavia porcellus</i> "cobayo"?	<p><b>Objetivos:</b></p> <p><b>Objetivo principal</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Evaluar la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. "romero".</li> </ul> <p><b>Objetivos específicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. "romero"</li> <li>➤ Determinar la dosis con mejor actividad diurética de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. "romero".</li> <li>➤ Determinar la toxicidad por el método del bioensayo con <i>Artemia salina</i>.</li> </ul>	<p><b><i>Rosmarinus officinalis</i> L. "romero"</b></p> <p>Es un subarbuto o mata vivas, rústico, erguido o ascendente, muy ramificado (1,5 – 1,8 m de anchura), de 50 a 80 cm de altura, y puede llegar hasta los 200 cm: verde todo el año, con los tallos jóvenes cuadrados y ligeramente borrosos que se va perdiendo al crecer y los tallos añosos son de color rojizo y con la corteza resquebrajada. Las hojas son pequeñas y muy abundantes, con forma lineal, de dos a tres cm de largo y unos tres mm de anchura, opuestas, sésiles, enteras, con los bordes torcidos hacia abajo, verde oscuras, lustrosas por el haz, blanquecinas y cubiertas de pelo por el envés, coriáceas y en la zona de unión de la hoja con el tallo nacen los ramilletes floríferos.</p> <p><b>La Furosemida</b></p> <p>Es un poderoso diurético de acción muy breve derivado de las sulfonamidas, se absorben con rapidez, la furosemida aumenta el flujo sanguíneo renal y causa la redistribución del riego sanguíneo dentro de la corteza del riñón (Kaizung, 1999).</p> <p><b>Actividad diurética</b></p> <p>Los diuréticos constituyen un grupo de medicamentos con acción terapéutica que se utilizan para ajustar el volumen de líquido extracelular, incrementando el volumen de orina excretado por los riñones ajustando la composición, de los líquidos corporales en situaciones clínicas diversas, entre otras: hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca aguda y crónica, insuficiencia renal aguda y crónica, síndrome nefrótico, cirrosis y la diabetes insípida. Además, a veces los diuréticos se utilizan para preservar un volumen de orina adecuado, como ocurre en el caso de ciertos traumatismos severos, o para reducir la concentración de un agente nocivo en la orina a fin de minimizar el deterioro renal (Uriarte y Trejo, 2003).</p>	El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. "romero" presenta actividad diurética.	<p><b>Variable independiente:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. "romero".</li> </ul> <p><b>Indicador:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentraciones de 100, 200 y 400 mg/kg.</li> </ul> <p><b>Variable dependiente:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Actividad diurética.</li> </ul> <p><b>Indicador:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Porcentaje de la excreción volumétrica urinaria.</li> </ul>	<p><b>1. Tipo de investigación:</b> Básico – experimental.</p> <p><b>2. Diseño:</b> Estímulo creciente.</p> <p><b>4. Muestreo:</b> <b>Población</b> Plantas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. "romero" del distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, Ayacucho.</p> <p><b>Muestra</b> Dos Kg de hojas del <i>Rosmarinus officinalis</i> L. "romero" recolectadas entre los meses de marzo - abril del 2012, en la rivera del río Huatatas (2800 m.s.n.m.) provincia de Huamanga, región de Ayacucho.</p> <p><b>5. Control:</b> 20 mg de furosemidá.</p> <p><b>7. Análisis de datos:</b> Con los datos obtenidos se procedió a evaluar mediante el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza del 95 % (<math>\alpha &lt; 0,05</math>), para determinar las diferencias significativas entre los grupos tratados con el extracto y el grupo control. Se realizó comparaciones múltiples de Tukey de los valores de diuresis (mL) y la prueba de mínimas diferencias significativas (MDS) de Fischer, para determinar estadísticamente cual de los tratamientos posee el mismo comportamiento farmacológico. Para determinar la CL50 en la prueba de <i>Artemia salina</i> se utilizó el método de PROBITS.</p>

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**  
**R.D. N° 490– 2012– FCB - D**  
**Bach. HENRY FORTUNATO POMA MÉNDEZ**


En la ciudad de Ayacucho siendo las cuatro de la tarde del día viernes veintiocho de Diciembre del año dos mil doce en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, bajo la presidencia del Doctor Tomás Castro Carranza en su condición de decano de la Facultad de Ciencias Biológicas y con la asistencia de los docentes: Magister Enrique Aguilar Felices; Doctor Johnny Aldo Tinco Jayo; Magister Edgar Cárdenas landeo (Asesor) y Magister Maricela López Sierralta quien además actuará como secretaria Docente para recepcionar la sustentación de tesis: "Actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Rosmarinus officinalis* L. "romero" en *Cavia porcellus* "cobayo". Ayacucho – 2012 presentado por el Bachiller HENRY FORTUNATO POMA MÉNDEZ, quien pretende optar el título Profesional de Químico Farmacéutico.

El decano inicia el acto de sustentación indicando que la exposición debe ser un tiempo no mayor a cuarenta y cinco minutos, luego del cual los miembros del jurado evaluarán al sustentante.

Luego el decano solicita al sustentante y público en general para que abandonen el auditorio dejando al jurado para que deliberen y emitan la calificación como sigue:

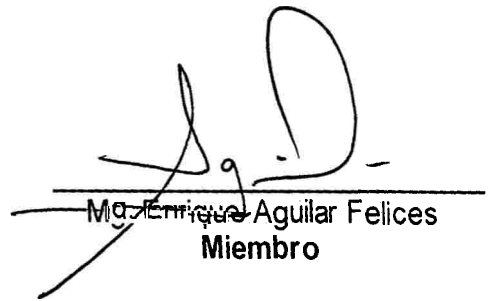
JURADO CALIFICADOR	EXPOSICION	RESPUESTAS	PROMEDIO
Mg. Enrique Aguilar Felices	16	16	16
Dr. Aldo Tinco Jayo	16	16	16
Mg. Edgar Cárdenas Landeo	18	18	18
Mg. Maricela López Sierralta	16	16	16
<b>PROMEDIO TOTAL</b>			<b>17</b>

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



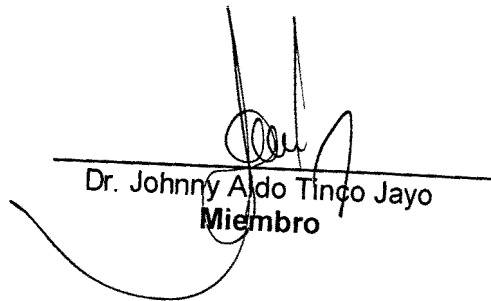
---

Dr. Tomás Castro Carranza  
**Presidente**



---

Mg. Enrique Aguilar Felices  
**Miembro**



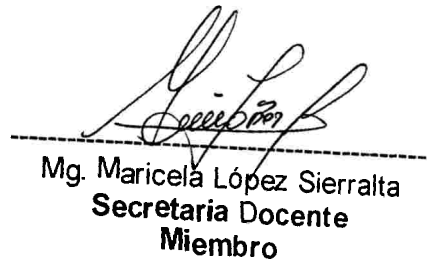
---

Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo  
**Miembro**



---

Mg. Edgar Cárdenas Landeo  
**Miembro - Asesor**



---

Mg. Maricela López Sierralta  
**Secretaria Docente**  
**Miembro**