

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA**



**Actividad antitusiva del extracto hidroalcohólico de las
hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kraenzl.
"wawillay" en cobayos. Ayacucho-2012.**

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

PRESENTADO POR:

Bach. PÉREZ OCHOA, Roxana Noemí.

AYACUCHO-PERÚ

2012

A Dios por su bendición e inmeso amor.

A mis padres, Teodocio y Rebeca por su apoyo, comprensión, amor incondicional y la fuerza que me brindan para seguir adelante.

AGRADECIMIENTO

Especial agradecimiento a mi Alma Mater la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y a los docentes que en ella laboran, por su invaluable apoyo académico y moral, quienes son forjadores de excelentes profesionales al servicio de la sociedad.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica y a sus docentes por sus enseñanzas y orientaciones durante mi formación profesional.

A mis asesores Dr. Jhonny Aldo TINCO JAYO y Mg. Enrique Javier AGUILAR FELICES; por el apoyo en la conducción del presente trabajo de investigación, cuyos esfuerzos se materializan en este informe.

A mis hermanos Javier y Juan que me apoyaron en todo momento durante mis años de formación.

ÍNDICE

RESUMEN.....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Antecedentes.....	3
2.2. Aspectos botánicos.....	6
2.2.1. Clasificación sistémica.....	6
2.2.2. Descripción botánica del género <i>Calceolaria</i>	6
2.2.3. Característica botánica de <i>Calceolaria engleriana kraenzl.</i>	7
2.2.4. Hábitat.....	7
2.2.5. Usos.....	7
2.2.6. Composición química.....	8
2.3. Importancia y propiedades farmacológicas de metabolitos secundarios.....	9
2.4. Farmacología de la tos.....	11
2.4.1. Tos.....	11
2.4.2. Mecanismo de la tos.....	12
2.4.3. Clases de tos.....	13
2.4.4. Agentes antitusivos.....	13
2.4.5. Codeína.....	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. Lugar de ejecución.....	16
3.2. Materiales.....	16
3.3. Diseño metodológico.....	17
3.4. Diseño experimental.....	19
3.5. Análisis de datos.....	19
IV. RESULTADOS.....	20
V. DISCUSIÓN.....	25
VI. CONCLUSIONES.....	29
VII. RECOMENDACIONES.....	30
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

Actividad antitusiva del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana Kraenzl* "wawillay" en cobayos. Ayacucho - 2012.

AUTOR : Bach. Roxana Noemí, PÉREZ OCHOA.

Asesores : Dr. Johnny Aldo, TINCO JAYO.

Mg. Enrique Javier, AGUILAR FELICES.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con el objetivo de determinar la actividad antitusiva del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de la *Calceolaria engleriana Kraenzl* "wawillay", en los laboratorios de Farmacología y Farmacognosia de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

Las hojas y flores de la *Calceolaria engleriana Kraenzl* "wawillay", fueron recolectadas en el anexo de Chacarí, ubicada a 3700 m.s.n.m., distrito de Concepción, provincia de Vilcashuamán, departamento de Ayacucho.

El screening fitoquímico (Miranda, 2000) del extracto hidroalcohólico, reporta la presencia de triterpenos y/o esteroides, lactonas y/o cumarinas quinonas, flavonoides, azúcares reductores, cardenólidos.

La actividad antitusiva se determinó por el método de tos inducida (según Arroyo y col, 2004) por ácido cítrico al 20% en cobayos, con un peso promedio de 500 a 700 g., teniendo cinco tratamientos: blanco; agua destilada (5ml/kg), estándar; fosfato de codeína (10mg/kg) y los extractos hidroalcohólicos de 100, 200 y 400 mg/kg; obteniéndose un porcentaje de inhibición de 77.64%, 31.43%, 66.66% y 77.03% con fosfato de codeína y con el extracto hidroalcohólico de 100, 200 y 400 mg/kg respectivamente. A la dosis de 400 mg/kg del se obtuvo una mejor actividad antitusiva estadísticamente similar a la codeína ($p < 0,05$).

Palabras clave: Actividad antitusiva, *Calceolaria engleriana kraenzl*, metabolitos secundarios.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad cientos de plantas medicinales son utilizados en la medicina, la ciencia moderna está analizando y estudiando los efectos terapéuticos, no con el fin de disminuir esta confianza en la naturaleza, si no para agrupar a las plantas de efectos similares y conocer los principios activos responsables de aliviar o curar enfermedades, para finalmente dar a conocer a la humanidad los resultados de los estudios.

El empleo de plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempos inmemoriales, durante mucho tiempo los remedios naturales, sobre todo las plantas medicinales, fueron la principal e incluso el único recurso del cual disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies naturales y ampliar sus experiencias en el empleo de los productos que de ellas se extraen (Tyler, 1980).

Hoy en día, la ciencia moderna estudia, los efectos terapéuticos de las plantas medicinales, y van precisando, comparando y clasificando las diversas propiedades, para el tratamiento de las enfermedades que afectan a la población (Ríos, 1990).

La tos suele ser un valioso mecanismo reflejo de defensa para expulsar de las vías respiratorias cuerpos y sustancias extrañas, además de las secreciones. Sin embargo, en ciertas situaciones, como puede ser la presencia de una infección o

de una neoplasia, el reflejo de la tos puede llegar a ser estimulado de manera excesiva, y cabe en tal caso, emplear, agentes antitusígenos (Taylor y Reide, 2003).

El Género *Calceolaria* comprende cerca de 181 especies, la mayoría de los cuales crecen en las zonas altoandinas y alcanzan su más alta diversidad en el norte del Perú. La Región de Ayacucho se caracteriza por presentar una biodiversidad de especies vegetales que se encuentran diseminados por su diversidad ecológica y por presentar varias zonas de vida (Romero y col., 2008). Tradicionalmente se utiliza la especie *Calceolaria engleriana* conocida popularmente como el "wawillay", utilizada en forma de infusión para problemas gastrointestinales y como aromatizante (Romero y col., 2008).

Así el presente trabajo de investigación tiene por finalidad comprobar y validar científicamente su actividad antitusiva de comprobarse así, esta planta puede ser usado con mayor seguridad como un fitomedicamento.

OBJETIVO GENERAL:

- Determinar la actividad antitusiva del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kraenzl. "wawillay" en cobayos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Realizar el screening fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kraenzl. "wawillay".
- Comparar las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico frente a un antitusivo estándar.
- Determinar la concentración óptima del extracto hidroalcohólico que muestre la mejor actividad antitusiva.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

Desde la antigüedad la gente ha ido adquiriendo conocimientos sobre el uso adecuado de las propiedades de las plantas medicinales, el cual ha permitido dejar un legado que se ha ido difundiendo de generación en generación (Tovar, 2001).

Las plantas medicinales son algo más que una nota al pie de la historia médica, el hombre desde tiempos remotos, empleó productos tomados de la naturaleza con el objetivo de curar los males que le aquejaban (Navarro, 1994).

Actualmente gracias al desarrollo de la química se dio un gran paso en la síntesis de múltiples sustancias, como productos naturales que ayudan a restablecer la salud y permitir la preservación de la vida (Cotillo y Rojas, 1990).

Hoy en día la ciencia moderna, estudiando los efectos terapéuticos de las plantas medicinales, están precisando, comparando y clasificando las diversas propiedades, para el tratamiento de las enfermedades que afectan a la población (Arango, 2006).

En Perú el género *Calceolaria* posee más de 120 especies sin contar las subespecies e híbridos (Soukup, 1975, Molau, 1988, Brako y Zarucchi, 1993). Se considera el norte del Perú como el centro del endemismo de *Calceolaria* específicamente los departamentos de Amazonas y Cajamarca.

Brack (1999), reporta la presencia de las siguientes especies: *Calceolaria cuneiformes* R&P, *Calceolaria deflexa* R&P, *Calceolaria herbeo-hybrida*, *Calceolaria herzogiana* Kran, *Calceolaria pinnata* L. y una *Calceolaria spp.*, estas especies crecen desde los 1500 hasta los 4000 msnm.

Calceolaria L. junto con *Jovellana* Ruiz & Pav. y *Stemotria* Wettst. & Harms, antes parte de la tribu Calceolarieae de las Scrophulariaceae, desde hace unos años se considera como familia Calceolariaceae. Esta determinación se realizó utilizando medios moleculares por secuenciamiento de fracciones de ADN (Olmstead y col., 2001).

Ruiz (2006), realizó una investigación de la evaluación del efecto antitusígeno de los extractos acuosos e hidroalcohólico de las hojas y flores de la *Malva sylvestris* "malva" en cobayos, determinando que ambos extractos acuoso e hidroalcohólico a 150 mg/kg presenta mayor eficacia antitusígena en comparación con el estándar.

Solier (2006), determinó el efecto antitusígeno del extracto hidroalcohólico del talo de *Tamnia vermicularis* "papelillo" en cobayos, presentando mayor eficacia antitusígena a la concentración de 150 mg/kg en comparación con la codeína.

Casanova (2002), evaluó la actividad antioxidante y antiulcerosa del extracto acuoso liofilizado de *Calceolaria cuneiformes* "Ayapa zapatum". En el screening fitoquímico reporta la presencia de flavonoides, taninos, quinonas, triterpenos y/o esteroides, lactonas y/o cumarinas.

Bravo y col. (2005), determinaron la actividad antibacteriana de los compuestos hallados en *Calceolaria thyrsoflora* en forma de infusión de hojas y flores.

Woldemichael y col. (2003), evaluaron la actividad antibacteriana de 10 diterpenos aislados de un extracto CH₂Cl₂: MeOH (1:1), preparado a partir de las partes aéreas de *Calceolaria pinnifolia*. Las bacterias ensayadas fueron *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, *Bacillus*

subtilis y *Escherichia coli*. Los diterpenos 4-epi-dehidroabietinol y el ent-isopimara-9(11),15-dieno-19-ol, fueron activos contra el *Staphylococcus aureus* metilino resistente con valores de CMI de 8 y 2 µg/mL, respectivamente, además evaluarón los diterpenos 19-maloniloxidehidroabietol y el 19-metilmaloniloxi-ent-isopimara-8(9),15-dieno aislados de *Calceolaria pinnifolia*, siendo ambos los más activos cada uno con una CMI de 4 µg/mL sobre *Mycobacterium tuberculosis*.

Chong (2008), realizó una investigación sobre la formulación y evaluación de la actividad antitusígena del jarabe elaborado a base del extracto hidroalcohólico del propóleo de *Apis mellifera* "abeja" en donde la concentración al 2.0% presentó mayor actividad antitusígena y demostró similar efecto al jarabe fosfato de codeína.

Condorhuamán (2009), evaluó el efecto hipotensor, diurético y tóxico del extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz "zapatilla". El efecto hipotensor a dosis de 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg y enalapril a dosis de 25 mg/kg, el efecto diurético en grupos a dosis de 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg y la toxicidad a dosis de 100 mg/kg, 200 mg/kg, Se demostró que el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz presenta efecto hipotensor, diurético y antioxidante sin efectos tóxicos.

Paucarhuanca (2010), determinó el efecto antitusivo del extracto hidroalcohólico de las flores de *Sambucus peruviana* H.B.K "sauco" en cobayos, presentando mayor eficacia antitusígena a una concentración de 500 mg/kg en comparación con la codeína.

Quispe (2010), evaluó la actividad antitusiva del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal", presentando mayor eficacia antitusiva a una concentración de 500 mg/kg en comparación con la codeína.

2.2 ASPECTOS BOTÁNICOS

2.2.1. Clasificación sistémica:

División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Asteridae
Orden	: Scrophulariales
Familia	: Scrophulariaceae
Género	: Calceolaria
Especie	: <i>Calceolaria engleriana kraenzl.</i>
Nombre vulgar	: "wawillay"

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

2.2.2. Descripción botánica del género *Calceolaria*

El Género *Calceolaria*, se caracteriza por ser hierbas anuales o perennes, sub arbustos o arbustos, hojas simples, opuestas y decusadas o ternadas, raro alternas. Inflorescencia usualmente en cimas, en algunas especies, flores solitarias. Caliz 4-partido. Corola bilabiada, usualmente amarilla, labio superior formado por las dos piezas coralinas adaxiales; labio inferior formado por las 3 piezas coralinas adaxiales, sacciforme y de mayor tamaño que el labio superior, normalmente con una zona de tricomas glandulares secretores de aceites conocido como elaióforo; estambres, anteras con dehiscencia longitudinal. Ovario bilocular, bicarpelar, súpero o semiinfero; estilo simple, capitado o inconspicuo. Fruto cápsula pluriseminada, dehiscente distalmente en 4 valvas. Semillas pequeñas, casi lineares, elipsoides y algo recurvadas, testa ornamentada, con costillas longitudinales (Puppo, 2006).

2.2.3. Características botánicas de *Calceolaria engleriana kraenzl.*

Subarbusto erguido de 0.2 a 1.2 m de altura, tallos rojizos marrones, poco ramificado, cubierto de pelos glandulares, con inflorescencia en cimas terminales multifloras. Hojas simples opuestas lanceoladas, con bordes un poco aserrados de color verde olivo, el envés es de color blanco con pelos glandulares. Flor en forma de zapato, con corola amarilla con puntos amarillos en el interior de la garganta. Sépalo ovalado con pocos pelos glandulares en la cara externa, internamente con pelos cortos de color amarillo. Antera de color amarillo con tecas opuestas, con filamento estaminal corto. Fruto cápsula ovoide acuminada y glandular (Molau, 1988).

2.2.4. Hábitat

Crece en zonas alto andinas y alcanzan su más alta diversidad en el norte del Perú, como en Cajamarca. También este género se encuentra en los andes del centro y del sur del Perú entre los 2000 a 4100 m.s.n.m, especialmente en los departamentos de Ayacucho y Junín. (Molau, 1988).

El género *Calceolaria* va del sur de México hasta los Andes del sur, desarrollándose en las laderas de la "puna" en pendientes rocosas y matorrales de montañas secas (Molau, 1988).

Su floración y recolección se da en los meses de primavera andina: abril, mayo, junio, julio, pero particularmente en el departamento de Ayacucho crece en los meses de enero a abril, siendo escaso en agosto a diciembre (Aedes, 1998).

2.2.5. Usos

Según los datos etnobotánicos la planta silvestre *Calceolaria engleriana Kraenzl.* se le atribuye ciertas propiedades medicinales como: digestivo, estimulante, antiulceroso, febrífugo, hipoglucemiante, usados en tos, resfrío, como diurético, astringente y retraso menstrual; se usa toda la planta en forma de infusión (Peña, 2006).

es la segunda causa mas frecuente de consulta, lo cual explica que el gasto en antitusivos y expectorantes sea el mas alto (Chaparro y col, 1993).

La tos se produce por estimulación inflamatoria que se inicia por el edema hiperemia de las mucosas respiratorias, como la bronquitis bacteriana, viral resfriado común y el consumo excesivo de cigarrros, también puede ser causado por procesos exudativos como goteo nasal y el reflujo gástrico con aspiración, dicho proceso ocurre por laringitis, bronquitis o el caso de abscesos pulmonares (Harrison, 1998).

Este reflejo tusígeno nace por irritación de los receptores nerviosos en el que actúa estímulos mecánicos y químicos que se encuentra al nivel de la mucosa en las vías aéreas faríngea, laringotraqueal, bronquial, la pleura y produce el acto de la tos, estudios efectuados por estimulación eléctrica y secreción nerviosas han revelado que el centro de la tos esta situado en el bulbo, en la zona dorso medial, en las inmediaciones del centro respiratorio y el centro del vago, la estimulación de dicha zona provoca tos en los animales (Litter, 1998).

2.4.2. Mecanismo de la tos (Romero, 1980)

Se inicia de manera voluntaria o refleja, tiene ramas aferentes como eferentes, la rama aferente comprende los receptores situados en el territorio de distribución sensitiva de los nervios trigéminos, glossofaríngeo, laringe superior y vago. La rama eferente comprende al nervio laríngeo recurrente y los nervios espinales, suelen iniciarse con:

- a) Estimulo que pone en marcha la tos, sensación de irritación o molestias de algún trayecto del árbol respiratorio.
- b) Fase de inspiración, con profundidad e intensidad.
- c) Fase de comprensión, una vez colocada el tórax en inspiración honda, se produce una fijación de los músculos de respiración con el diafragma, la contracción intensa de los músculos de las paredes torácicas que hacen

aumentar violentamente la presión intratorácica que llega a alcanzar cifras de 80 a 140 mmHg.

d) Fase de expulsión, es aquella espiración fuerte en la cual la glotis se abre de repente y sale el aire con una velocidad de 50 a 120 m/seg y de esta forma con un sonido muy especial se eliminan mucosidades bronquiales.

2.4.3. Clases de tos

Tos húmeda o productiva:

El acto de toser elimina mucus de los pulmones y del tracto respiratorio que de otra manera podría actuar distorsionando el intercambio gaseoso y como lugar de infección (Foster, 1991).

La tos húmeda productiva puede deberse al colapso de las vías aéreas como sucede a la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Giménez y Montero, 2004).

Tos seca o improductiva:

Se produce cuando el volumen de las secreciones es muy escaso o casi nulo (menos de 10-70 ml/kg/d) (Alvarado, 2008).

El asma puede manifestarse inicialmente como una tos seca irritativa persistente o recurrente durante la noche o temprano en la mañana con falta de aire opresión en el pecho. La tos crónica productiva puede tener una causa fácilmente discernible por la historia o por el examen físico (Chaparro y Col, 1993).

2.4.4. Agentes antitusivos: (Litter, 1998).

Se denominan agentes antitusivos, a las drogas que calman o alivian la tos; pueden llamarse también supresores o depresores de la tos. Para calmar la tos puede actuarse sobre el reflejo tusígeno por acción periférica sobre las mucosas o el centro de la tos.

2.4.4.1. Antitusivos de acción periférica

Los calmantes de acción periférica actúan sobre las aéreas reflexógenas de la tos como son las siguientes:

- Sustancias demulcentes.
- Drogas expectorantes, que al aumentar las secreciones el mucus actúa como demulcente y protege las superficies inflamadas.

2.4.4.2. Antitusivos de acción central

Los depresores de acción central son los agentes antitusivos o antitusígenos propiamente dicho que actúan deprimiendo el centro de la tos en el bulbo. Tales como:

- Los alcaloides del opio, los fenantrénicos naturales y semisintéticos (codeína, etilmorfina y bencilisoquinolinicos).
- Los agentes antitusivos sintéticos como el dextrometorfano.

2.4.5. CODEÍNA:

La codeína (metil-morfina), pertenece junto con la morfina y la tebaína al grupo de los alcaloides naturales del opio del grupo fenantreno (Velasco y col., 1993).

La codeína es útil para aliviar dolores moderados y tiene mucho menor riesgo que la morfina de provocar dependencia o efectos tóxicos (Flores, 2003).

Es el prototipo de los antitusivos y ejerce su acción sobre los centros bulbares, su efectividad sirve como referencia a nuevos fármacos (Alvarado, 2008).

Por vía oral es muy eficaz (60% de la eficacia por vía parenteral) ya que apenas sufre el fenómeno de primer paso hepático, posteriormente se metaboliza en el hígado en su mayor parte en formas inactivas, y una pequeña parte (10%) sufre desmetilación convirtiéndose en morfina, a la que se debe su escaso poder analgésico (análogo al de los analgésicos menores con los que se puede asociar). Tiene muy poca afinidad por los receptores opioides, aunque su eficacia

como antitusígeno sugiere la activación de receptores selectivos con alta afinidad en el centro de la tos (Velasco y col, 1993).

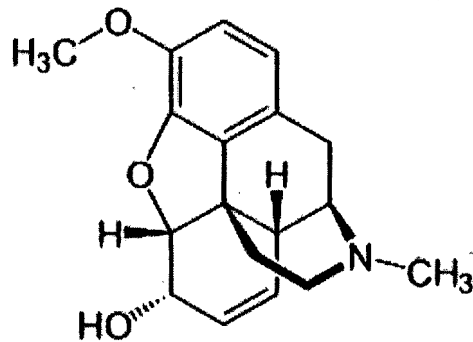


Figura Nº 06: Estructura química de la codeína
Fuente: (Velasco y col, 1993)

Mecanismo de acción: Depresión del centro de la tos.

Acciones farmacológicas: Antitusígeno, analgésico y antidiarreico.

Indicaciones: Las indicaciones aprobadas para la codeína son:

- Tos, es eficaz a bajas dosis.
- Dolor leve a severo.
- Síndrome de colon irritable.

Reacciones adversas: Hipersensibilidad, náuseas, constipación, depresión respiratoria (por dosis elevadas o mayor sensibilidad en ancianos, asmáticos, EPOC, insuficiencia respiratoria, sedación), prolonga el trabajo de parto y provoca abstinencia y depresión neonatal (Alvarado, 2008).

Dosis: La dosis antitusígena usual es de 10-30 mg cada 4-6 horas con dosis máxima de 120 mg/día (Velasco y col, 1993) y como codeína fosfato 15 mg/5 ml=1 cucharadita, cada 4-6 horas (Flores, 2003).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios de Farmacognosia y Farmacología de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de Enero a Junio del 2012.

3.2. Materiales

3.2.1. Población:

Calceolaria engleriana Kraenzl "wawillay", que crece en el anexo de Chacarí, distrito de Concepción, provincia de Vilcashuamán, departamento de Ayacucho, a 3700 m.s.n.m.

3.2.2. Muestra:

2500 g de hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", fueron escogidas aleatoriamente en buen estado; en terrenos de zonas áridas del anexo de chacarí, a partir de la cual se obtuvo el extracto hidroalcohólico.

3.2.3. Material biológico:

25 cobayos (*Cavia porcellus*) de un solo sexo (macho) de 500 a 700 g., en buen estado de salud, con alimentación y agua ad libitum, proporcionados por el Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) Ayacucho.

3.2.4. Fármaco de referencia:

Jarabe codeína fosfato (15mg/5ml) con lote 1050051 del Laboratorio "S.J. Roxfarma S.A".

3.3. Diseño metodológico

3.3.1. Procedimiento para la recolección de la muestra:

Se procedió a recolectar *Calceolaria engleriana Kraenzl* "wawillay" en el anexo de chacarí en horas de la mañana (8:00 a.m.), se seleccionaron las plantas que no estaban dañadas ni maltratadas, se procedió a separar las hojas y flores, se distribuyó en una habitación ventilada sobre papel periódico para su secado, aproximadamente por una semanas. Después fueron trituradas con un molino manual, obteniéndose finalmente la reducción del tamaño de la muestra.

3.3.2. Preparación del extracto hidroalcohólico:

Se tomó 200 g. de la muestra seca y molida, preparando la maceración en un frasco de color ámbar, por ello se utilizó 2L de alcohol etílico al 80%, este cubrió la muestra unos 3 cm, el cual se mantuvo en un lugar fresco y oscuro por un periodo de siete días. Durante el proceso se agitó el frasco periódicamente para que el alcohol se distribuya homogéneamente en la muestra. Posteriormente se filtró y concentró para finalmente obtener el extracto hidroalcohólico seco.

3.3.3. Screening fitoquímico:

Se identificaron los diferentes metabolitos secundarios por medio de reacciones de coloración y precipitación, empleándose el método descrito por Miranda (2000). (Anexo N° 04).

3.3.4. Determinación de la actividad antitusiva:

Modelo: Tos inducida por ácido cítrico en cobayos (Ucelay y col., 1991).

El método experimental de tos inducida por ácido cítrico en cobayos, fue descrita por primera vez por Ucelay y col. y utilizado sin modificación por Arroyo y col. (2004). Consistió en la inducción de la tos por exposición al aerosol de una

solución de ácido cítrico diluidos en agua al 20 % p/v en una campana de vidrio, a los cobayos, para lo cual se registró el número de toses, desde la primera tos, durante 10 minutos. (Arroyo y col., 2004).

Procedimiento:

- Se suspendió la alimentación a los cobayos 8 horas antes del experimento, manteniéndoles solamente con agua a voluntad.
- Los cobayos fueron distribuidos al azar en cinco grupos de cinco animales cada uno.
- Se pesaron cada uno de ellos, para determinar la dosis correspondiente.
- Se administró al primer grupo 5 ml de agua destilada, que constituyó el Blanco; luego fueron colocados en una campana de vidrio (dimensiones 20x14x12 cm). y se expuso a un aerosol de ácido cítrico diluido en agua al 20% p/v. por un periodo de 5 minutos, utilizando un nebulizador (Thomas) (Fotografía N° 04) y después se contó el número de toses producido en un periodo de 10 minutos, a partir de la primera tos. Solamente fueron considerados para el estudio los animales que produjeron entre 10 a 25 toses en los primeros cinco minutos.
- Al segundo grupo de animales se administró codeína 10 mg/kg, que constituyó el estándar y se siguió el procedimiento arriba descrito.
- Al tercer, cuarto y quinto grupo se administró el extracto hidroalcohólico a 100, 200 y 400 mg/kg respectivamente, siguiendo el mismo procedimiento arriba descrito.

Con el número de toses se calculó el Porcentaje de Inhibición de la Tos (% IH) utilizando la siguiente fórmula:

$$\%IH = \frac{(TC - TP)}{TC} \times 100$$

Donde: TC = Número de toses totales promedio de control.

TP = Número de toses totales promedio del problema.

3.4. Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente randomizado (aleatorizado) con cinco tratamientos en diferentes mediciones por repetición (en cada repetición cinco mediciones, descartándose algunas mediciones por errores).

- Grupo N°1: Agua destilada (blanco) 5ml/kg por vía oral.
- Grupo N° 2: Fosfato de codeína (estándar) 10 mg/kg por vía oral.
- Grupo N° 3: Extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana Kraenzl "wawillay"*, a 100 mg/kg por vía oral.
- Grupo N° 4: Extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana Kraenzl "wawillay"*, a 200 mg/kg por vía oral.
- Grupo N° 5: Extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana Kraenzl "wawillay"*, a 400 mg/kg por vía oral.

3.5. Análisis de datos

Los datos obtenidos son presentados en cuadros y gráficos, la diferencia significativa que existe entre los tratamientos empleados fue evaluada a través del análisis de varianza (ANOVA), considerando un nivel de significación estadística de 0.05. Las comparaciones entre cada tratamiento a través de la prueba de Tukey, para realizar estos análisis se utilizó el programa SPSS versión 15.0.

IV.RESULTADOS

CUADRO N° 01: Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kraenzl. "wawillay". Ayacucho - 2012.

METABOLITOS SECUNDARIOS	REACCIÓN	INTENSIDAD	COLORACIÓN
FLAVONOIDES	Shinoda	+++	Amarillo - rojo
	Antocianidina	+++	Rojo - marrón
TANINOS Y FENOLES	Cloruro férrico	+++	Verde azulado
TRITERPENOS Y/O ESTEROIDES	Liebermann - Burchard	+++	Rojo
CARDENÓLIDOS	Kedde	++	Formación de anillo violáceo
LACTONAS Y/O CUMARINAS	Baljet	++	Rojo
CATEQUINAS	Na ₂ CO ₃ + luz UV	++	Verde carmelita en el papel filtro a luz UV
AZÚCARES REDUCTORES	Benedict	++	Rojo - naranja
QUINONAS	Börntrager	++	Fase acuosa color rosado

Leyenda:

(+++) : Abundante

(++) : Regular

(+) : Leve

(-) : Ausente

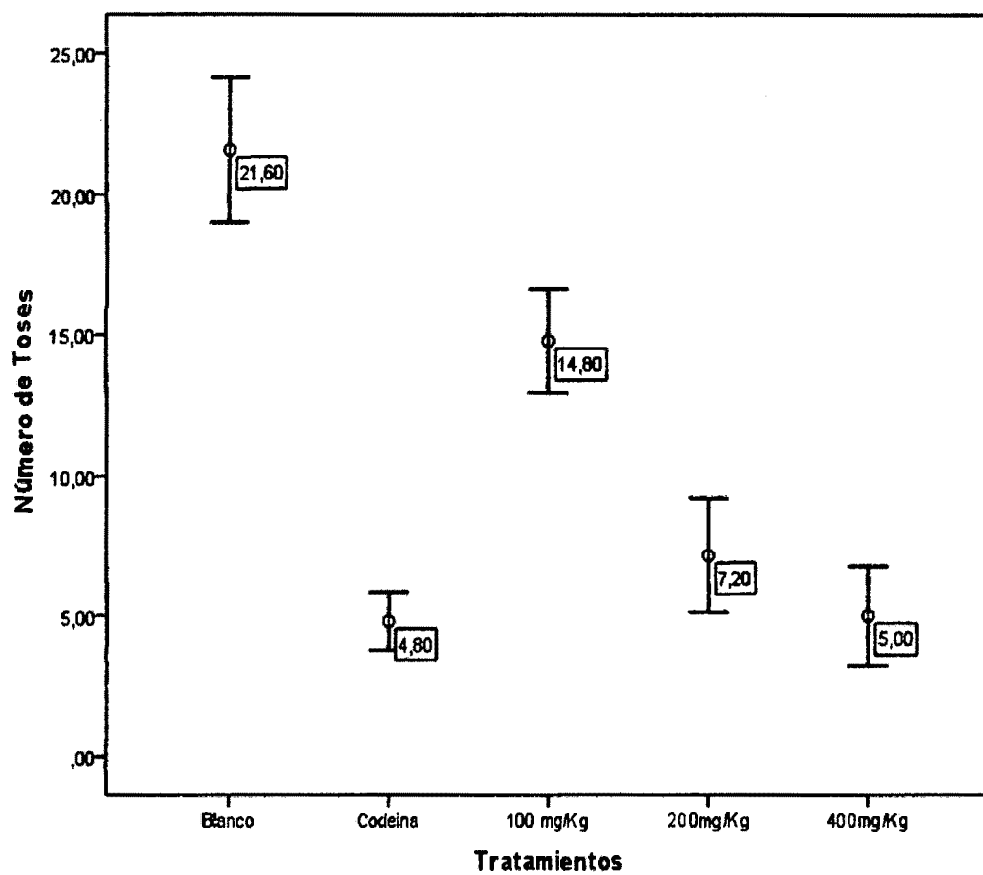


GRAFICO N° 01: Variación del número de toses en 10 minutos en cobayos; a diferentes tratamientos con el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kraenzl. "wawillay". Ayacucho -2012.

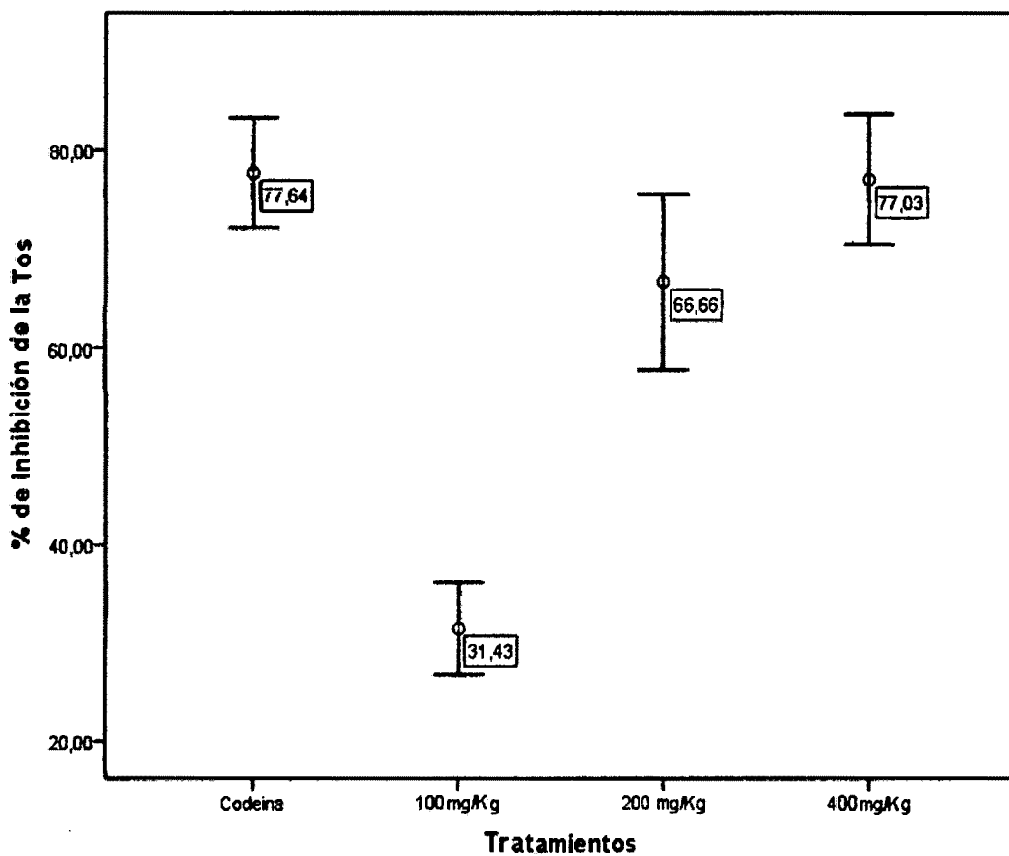


GRAFICO N° 02: Variación del porcentaje de inhibición del número de toses con los diferentes tratamientos del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kraenzl. "wawillay". Ayacucho -2012.

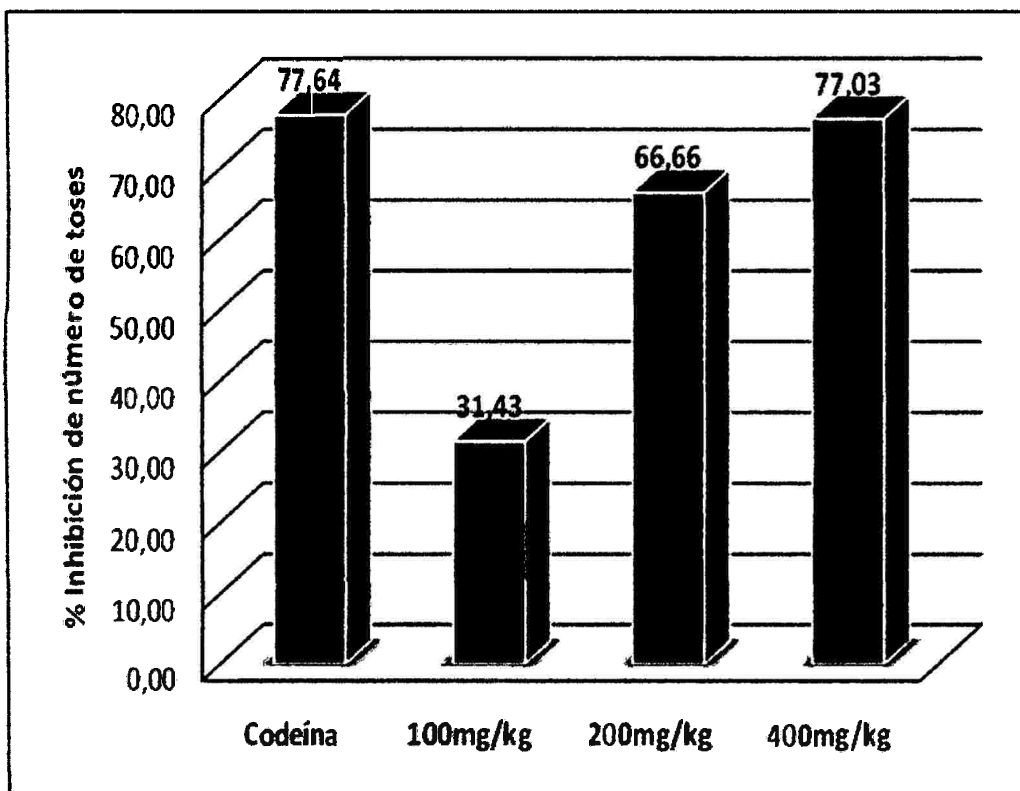


GRAFICO N° 03: Porcentaje de inhibición del número de toses con los tratamientos del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kraenzl. "wawillay". Ayacucho -2012.

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 y flores de *Calceolaria engleriana Kraenzl* "wawillay" como agente antitusivo; las cuales fueron recolectadas en el anexo de Chacarí, distrito de Concepción, provincia de Vilcashuamán, departamento de Ayacucho.

En el cuadro N° 01 se muestra los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana Kraenzl* "wawillay", identificándose principalmente: flavonoides, fenoles y/o taninos, triterpenos y/o esteroides, también se observa la presencia de catequinas, lactonas y/o cumarinas, azúcares reductores, quinonas, cardenólidos. Estos resultados se comparan con los estudios realizados por Coaquira (2008), quien realizó un estudio sobre la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana kranzlin*, donde reportó la presencia de los mismos metabolitos secundarios. Del Castillo (2002) menciona que *Calceolaria engleriana subsp.* presenta metabolitos secundarios como flavonoides, taninos, triterpenos y Casanova (2002) señala que en *Calceolaria cuneiformes*, se encontró flavonoides, taninos, quinonas, triterpenos. En *Calceolaria engleriana*, *C.cuneiformis*, *C. tripartita*, *C. cordifolia*, *C. rivularis* y *C.*

ballotifolia se determinó la presencia de compuestos fenólicos, terpénicos, quinonas y resinas respectivamente (Romero y col, 2008).

Los taninos tienen propiedades farmacológicas como: antioxidantes, antidiarreica y cicatrizante las cuales se adhieren con facilidad en la absorción de la piel (Evans, 1991).

Las cumarinas tienen actividades farmacológicas como: antibacterial, antibiótica y acción anticoagulante (Evans, 1991).

Los flavonoides son sustancias que representan a uno de los mas importantes grupos con actividad farmacológica y posee una alta reactividad química que se manifiesta por sus efectos sobre diferentes sistemas biológicos; además tienen propiedades: antimicrobianas, antialérgicas, diuréticas, antiviricas, cicatrizantes, antiagregantes plaquetarios y es también hepatotóxico (Lock, 1994).

La presencia de flavonoides, taninos y fenoles posiblemente le confieren la propiedad antitusiva a la especie; en el sistema respiratorio, los flavonoides muestran una actividad espasmolítica, antiinflamatorio, antitusivo y antialérgico que se ve aumentada por la administración concomitante de quercetina de vitamina c. Pinoembrin posee efecto bacteriostático significativo a las bacterias gram-positivas como gram-negativas. Ramnezin, Fizetin y Antocyanos relacionados inhiben el crecimiento y la replicación de bacilos tuberculosos la mayoría de los flavonoides marca por anti significativa acción oxidante. todos mencionados flavonoides propiedades junto con actividad antitusivo expectorante probablemente participarán en positivo y beneficioso efecto de drogas como *hedera helix*, *plantago lanceolata*, *malva sylvestris*, *polygonium aviculare*, *primula veris*, *verbascum densiflorum* y otros en la terapia de enfermedades respiratorias (Khan y Arjumand ather, 2006)

En el grafico N° 01, se presentan las variaciones del número de toses en 10 minutos, producidos por la exposición a un aerosol de acido cítrico al 20 % p/v

diluido en agua, donde se observa que los cobayos tratados con suero fisiológico 5 ml/kg presentaron un aumento en el número de toses de 21 a 25 lo que confirma que el método utilizado es confiable con una media de 21.60; al utilizar el fosfato de codeína 10 mg/kg se observa una disminución del número de toses de 6 a 4 con una media de 4.80 lo que confirma su efecto antitusivo; utilizando el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana Kraenzl* "wawillay" a 100 mg/kg el número de toses fue de 17 a 13 con una media de 14.8, con el extracto a 200 mg/kg el número de toses fue de 9 a 5 con una media de 7.2 y con el extracto a 400 mg/kg se obtuvo una disminución en el número de toses de 7 a 4 con una media de 5 similar al estándar de codeína.

Por lo tanto, se observó un efecto dosis-respuesta donde a mayor extracto administrado, en este caso 400 mg/kg, menor es el número de toses.

En el Anexo N° 09 (cuadro N° 04), se observa el análisis de varianza realizado al número de toses por tratamiento de los extractos hidroalcohólico demostrando que a un nivel de confianza del 95%, existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos ensayados.

En el grafico N° 02, se muestra la variación del porcentaje de inhibición del número de toses con los diferentes tratamientos, donde la codeína varía de 80,00% a 70,00% con una media de 77,64%, y el extracto hidroalcohólico de 100 mg/kg varía de 35,00% a 32,00% con una media de 31,43%; a 200 mg/kg varía de 76,19% a 59,09% con una media de 66,66% y a 400 mg/kg de 80,95% a 68,18% con una media de 77,03%.

Podemos señalar que el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana Kraenzl*. "wawillay" a dosis de 400 mg/kg presentó mayor porcentaje de inhibición de 77.03% frente a los demás tratamientos y frente al estándar de fosfato de codeína por vía oral con un porcentaje de inhibición de

77.64%, de igual manera frente a los resultados obtenidos de los diferentes trabajos realizados en la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga como en la *Malva sylvestris* "malva" (Ruiz, 2006), *Thamnia vermicularis* "papelillo" (Solier, 2006), *Apis mellifera* "abeja" (Chong, 2008), *Sambucus peruviana* H.B.K. "sauco" (Paucarhuanca, 2010), *Juglans neotropica* Diels "nogal" (Quispe, 2010) quienes reportaron el porcentaje de inhibición de 67.27%, 74.31%, 70.9%, 70.32%, 79.12% respectivamente; todos estos trabajos se realizaron siguiendo el mismo método así también el material biológico utilizado en el presente trabajo realizado.

En el Anexo Nº 11 (cuadro Nº 06), se observa resultado del Análisis de Varianza realizado al porcentaje de inhibición del número de toses por tratamiento de los extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kraenzl. "wawillay" en cobayos, demostrando que son significativos a un nivel de confianza del 95%, indicando que si existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos ensayados.

Al realizar las comparaciones de las medias de los tratamientos del extracto hidroalcohólico con la prueba de Tukey en la grafica Nº 02 y 03, muestran tratamientos basados en el grado de parecido existente entre sus medias; por lo tanto el fosfato de codeína no difiere con el extracto hidroalcohólico a dosis de 400 mg/kg por que presenta el mismo comportamiento antitusivo, pero difiere con los demás tratamientos la dosis de 100 mg/kg y 200 mg/kg.

Finalmente, se concluye que el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" demostraron tener actividad antitusiva a las dosis ensayadas.

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kraenzl. "wawillay" demostró tener actividad antitusiva
2. El extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kraenzl. "wawillay", presentó: flavonoides, fenoles y/o taninos, triterpenos y/o esteroides, lactonas y/o cumarinas, catequinas, quinonas, azúcares reductores, cardenólidos.
3. El extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kraenzl. "wawillay" administradas a dosis de 100, 200 y 400 mg/kg presentaron una eficacia antitusiva de 31.43%, 66.66% y 77.03% respectivamente en comparación con el antitusivo estándar fosfato de codeína 77.64%.
4. El extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kraenzl. "wawillay" tiene una concentración óptima a dosis de 400 mg/kg por presentar mayor porcentaje de inhibición similar al estándar de fosfato de codeína.

VII. RECOMENDACIONES

1. Proseguir con el estudio de la *Calceolaria engleriana* Kraenzl. "wawillay" aislando el metabolito responsable de la actividad antitumorigénica.
2. Realizar estudios comparativos de la planta fraccionando el extracto con otros solventes como: éter de petróleo, cloroformo y acetato de etilo.
3. Continuar con los ensayos biológicos de toxicidad aguda y crónica en más de una especie, como proyecto de investigación.
4. Realizar el control de calidad de los productos naturales comercializados en nuestra región, lo cual implica la DL₅₀, cortes histológicos, cuantificación de principios activos, análisis microbiológicos y otros.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aedes C.** 1998. Estudio de la biodiversidad vegetal y animal, cuenca cotahuasi; flora medicinal. Consejo Provincial de la Unión, Secretaria Técnica de la Unión. Arequipa-Perú.
2. **Arango M.** 2006. Plantas Medicinales. Botánica de Interés Médico. Medicina indígena Colombiana.
3. **Arroyo J., Rojas J., Chenguayen J.** 2004. Manual de Modelos Experimentales de Farmacología. 1^{ra} edición. Editorial Publicaciones Andinas. Lima-Perú.
4. **Alvarado J.** 2008. Apuntes de Farmacología. Tercera edición. Ediciones Apuntes Médicos del Perú. 2^{do} Tomo. Lima-Perú.
5. **Brack A.** 1999. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Centro de Estudios Regionales Andinos "Bartolomé de las Casas". Cuzco.
6. **Brako L. y J Zarucchi.** 1993. Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Perú. Monogr. Syst. Bot. Missauri. Bot. Gard. 45;1- 1286.
7. **Bravo L., Copaja S., Figueroa-Duarte S., Lamborot M., San Martín J.** 2005. 1,4-Benzoxazin-3-ona, 2-Benzoxazolinona and Gallic Acid from *Calceolaria thyrsoiflora* and their Antibacterial Activity. Z. Naturforsch. 60c, 389-393.
8. **Bruneton J.** 1991. Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.
9. **Bhupinder P., Khambay, Duncan B., Matthew C., Denholm I.** 1999. Characterization, and Biological activity of Naphthoquinones from *Calceolaria andina* L. J. Agric. Food Chem., 47(2), 770-775.
10. **Casanova G.** 2002. Actividad antioxidante y antiulcerosa del extracto acuoso liofilizado de *Calceolaria cuneiformes* "ayapa zapatum". Tesis en Farmacia y Bioquímica. Facultad de Ciencias Biológicas. U.N.S.C.H.
11. **Coaquira B.** 2008. Actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert "wawillay" en *Cavia porcellus* "cobayos". Tesis en Farmacia y Bioquímica. Facultad de Ciencias Biológicas. U.N.S.C.H.
12. **Condorhuaman Y.** 2009. Evaluó el efecto hipotensor, diurético y tóxico del extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz (zapatilla) en ratas albinas de raza Holtzmann. Lima, Tesis, Facultad de Farmacia y Bioquímica. U.N.M.S.M.

13. **Cotillo P. y Rojas L.** 1990. Métodos Farmacológicos en la Investigación de productos vegetales. 1ª edición CONCYTEC. Lima-Perú.
14. **Chong K.** 2008. Formulación y evaluación de la actividad antitusígena del jarabe elaborado a base del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja". Ayacucho, Tesis, Facultad de Ciencias Biológicas. U.N.S.C.H.
15. **Chaparro C., García A., Torres, C.** 1993. Neumología 4ª edición. Editorial Corporación de Investigaciones Biológicas. Medellín. Colombia.
16. **Del Castillo J.** 2002. Tamizaje fitoquímico, actividad hipoglucemiante y toxicidad aguda de *Calceolaria engleriana* Sub sp. *Lutea* Molau "ayazapato". Tesis en Farmacia y Bioquímica. Facultad de Ciencias Biológicas. U.N.S.C.H.
17. **Evans W.** 1991. Farmacognosia. Editorial Mc. Graw-Hill Interamericana. México.
18. **Foster R.** 1991. Farmacología Básica. Segunda Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza-España.
19. **Flores J.** 2003. Farmacología Humana. 4ª edición. Editorial Masson S.A. España.
20. **Harrison J.** 1998. Principios de medicina interna. 12^{ava} Edición. Editorial Mc. Graw. Hill. México.
21. **Gimenez L. y Montero F.** 2004. Medicina de urgencias y emergencias. Guía diagnóstica y protocolos de actuación. 3ª edición. Editorial Elsevier. Madrid-España.
22. **Khan y Arjumand ather.** 2006. Advances in Phytomedicine. Lead Molecules From Natural Products. Discovery and New Trends.1ª edición. Volumen II Editorial Elsevier. Amsterdam The Netherlands.
23. **Lock de Ugaz O.** 1994. Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de los productos naturales. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima.
24. **Litter M.** 1998. Compendio de Farmacología. 4ª edición. Editorial el Ateneo. Buenos aires. Argentina.
25. **Miranda M. y Cuellar A.** 2000. Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. Cuba.

26. **Molau U.** 1988. Flora Neotropica: Scrophulariaceae Part I. Calceolarieae. Organization for Flora Neotropica. The New York Botanical Garden.
27. **Navarro C.** 1994. el mundo vegetal. Nuestro aliado. *ArsPharm* 35; 419-430.
28. **Olmstead R., De Phamphilis C., Wolfe A., Young N., Elisons W., Reeves P.** 2001. Desintegración of the Scrophulariaceae. *American Journal of Botany*. 88(2):348-361.
29. **Paucarhuanca L.** 2010. Efecto antitusivo del extracto hidroalcohólico de las flores de *Sambucus peruviana* H.B.K "sauco" en cobayos. Tesis en Farmacia y Bioquímica. Facultad de Ciencias Biológicas. U.N.S.C.H.
30. **Peña R.** 2006. Boletín Lawen: Boletín Oficial de la Corporación para la Investigación. Multidisciplinaria y el Desarrollo. Sustentable de la Flora Nacional Santiago de Chile. Volumen 03 Nº 1. Consejo editorial. Chile.
31. **Puppo P.** 2006. Género de *Calceolaria* en el departamento de Lima. *Rev. Perú. Biol* 13(1): 085-093. Octubre 2006. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú.
32. **Quispe R.** 2010. Actividad antitusiva del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal" Tesis en Farmacia y Bioquímica. Facultad de Ciencias Biológicas. U.N.S.C.H.
33. **Romero M., Aguilar E., Magallanes C., Alarcón J.** 2008. Género *Calceolaria* en la Provincia de Huamanga: Aspectos Botánicos, Fitoquímicos, Antibacteriana y Producción. Ayacucho-2008. *Revista de Divulgación Científica. Instituto de Investigación. Volumen 01 Nº 1.* Facultad de Ciencias Biológicas. U.N.S.C.H.
34. **Romero E.** 1980. *Patología General y Fisiopatología.* Tomo I. 5ª edición. Editorial Alambra. Madrid-España.
35. **Ruiz M.** 2006. Evaluación del efecto antitusígeno de los extractos acuosos e hidroalcohólico de las hojas y flores de *Malva sylvestris* L. "malva" en cobayos. Ayacucho, Tesis, Facultad de Ciencias Biológicas. U.N.S.C.H.
36. **Ríos L.** 1990. *Métodos Farmacológicos en la Investigación de Productos Vegetales.* 1ª Edición. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de San Marcos. Lima-Perú.
37. **Silva P., Chamy M., Piovano M., Garbarino G.** 1993. Diterpenoids from *Calceolaria petiolaris*. *Phytochemistry*. Vol. 34. Nº 2. pp. 449-451.

38. Solier S. 2006. Efecto antitusígeno del extracto hidroalcohólico del talo de *Thamnia vermicularis* "papelillo" en cobayos. Ayacucho, Tesis, Facultad de Ciencias Biológicas. U.N.S.C.H.
39. Soukup J. 1975. Las escrofulariáceas del Perú: sus géneros y listas de especies. *Biota* 82:301-335.
40. Taylor M. y Reide P. 2003. Lo Esencial en Farmacología. Curso Crash de Mosby. 1ª edición. Editorial Elsevier. Barcelona-España.
41. Tovar O. 2001. Plantas medicinales del valle del Mantaro. Museo de Historia Natural. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. CONCYTEC. Lima.
42. Tyler V. 1980. Farmacognosia. Editorial El Ateneo. Buenos Aires. Argentina.
43. Ucelay M., Lebeaga L., Orjales A., Zubiaur L., Quintana A. 1991. Evaluation of bronchospasmplytic, antiallergy, anti-inflammatory, mucolytic and antitusive activities of decasilate in experimental models. *ArzneimForsh.*
44. Velasco A., Lorenzo P., Serrano J. y Andrés F. 1993. Farmacología. 6ª edición. Editorial Mc Graw Hill. España.
45. Woldemichael M., Franzblau G., Zhang F., Wang Y., Timmermann N. 2003. Inhibitory effect of sterols from *Ruprechtia triflora* and diterpenes from *Calceolaria pinnifolia* on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Nat Prod.* Feb;66(2):242-6.

ANEXOS

ANEXO N° 01



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

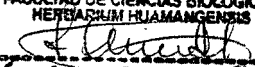
C E R T I F I C A

Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, **Srta. Roxana Noemí, PÉREZ OCHOA**, 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	:	SCROPHULARIALES
FAMILIA	:	SCROPHULARIACEAE
GENERO	:	Calceolaria
ESPECIE	:	<i>Calceolaria engleriana. Kraenzl.</i>
N.V.	:	"wawillay"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 20 de Febrero del 2012

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM HUAMANGENSIS


Bla. Loura Arcastme Medina
JEFE

ANEXO N°02

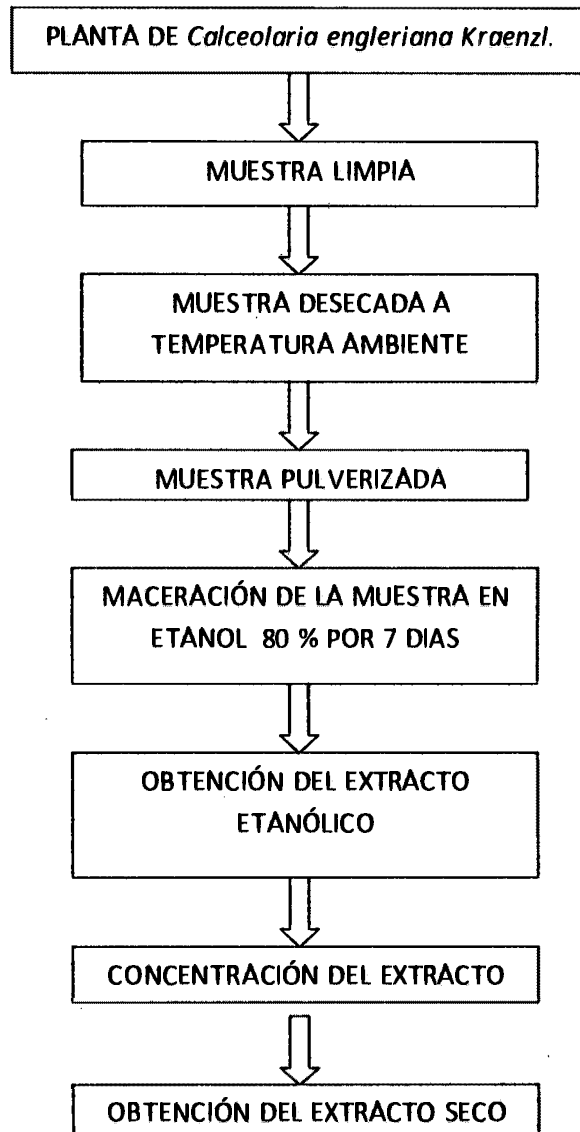


FIGURA N° 07: Flujograma del proceso de preparación del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawilay". Ayacucho-2012.

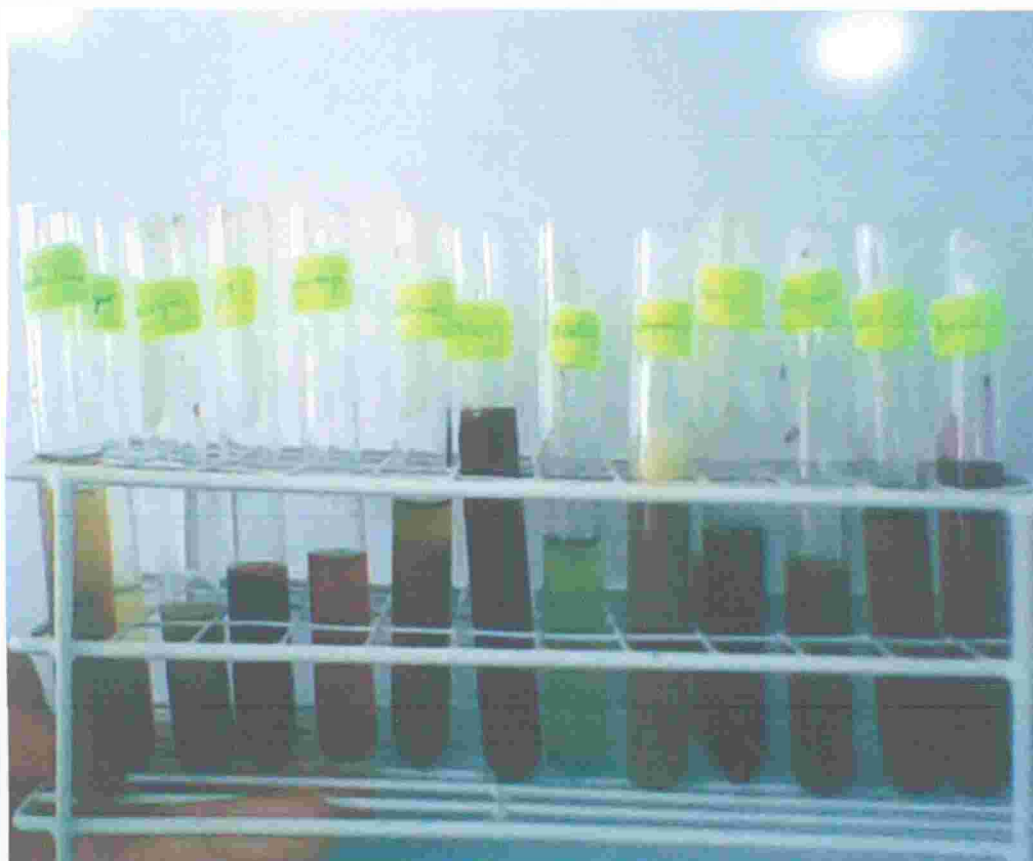
ANEXO Nº 03



FOTOGRAFÍA Nº 01: Protocolo de obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana Kraenzl* "wawillay". Ayacucho – 2012.

1. Hojas y flores de *Calceolaria engleriana Kraenzl* "wawillay"
2. Secado de las hojas y flores
3. Trituración de las hojas y flores con un molino manual.
4. Maceración con alcohol al 80%.
5. Concentración de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana Kraenzl* "wawillay"
6. Obtención del extracto hidroalcohólico seco.

ANEXO N° 05



FOTOGRAFÍA N° 02: Tubos conteniendo los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana kraenzl* "wawillay". Ayacucho - 2012.

ANEXO N°06



FOTOGRAFÍA N° 03: Administración del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana kraenzl* "wawillay" por vía oral.

ANEXO N°09

CUADRO N° 04: Resultado del Análisis de Varianza al determinar el número de toses producidos en diez minutos del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kraenzl. "wawillay" en cobayos. Ayacucho - 2012.

ANOVA

Número de Toses

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1075,840	4	268,960	113,008	0,000
Intra-grupos	47,600	20	2,380		
Total	1123,440	24			

ANEXO N° 10

CUADRO N° 05: Resultado de la Prueba de Tukey al determinar el número de toses producidos en diez minutos del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana Kraenzl.* "wawillay" en cobayos. Ayacucho - 2012.

Número de Toses

HSD de Tukey^a

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa= 0.05		
		a	b	c
Codeína	5	4,8000		
400mg/Kg	5	5,0000		
200 mg/Kg	5	7,2000		
100mg/Kg	5		14,8000	
Blanco	5			21,6000
Sig.		,140	1,000	1,000

ANEXO N° 11

CUADRO N° 06: Resultado del Análisis de Varianza al determinar el porcentaje de inhibición del número de toses producidos por el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana Kraenzl.* "wawillay" en cobayos. Ayacucho - 2012.

ANOVA

Porcentaje de Inhibición

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	7105,319	3	2368,440	82,993	0,000
Intra-grupos	456,603	16	28,538		
Total	7561,921	19			

ANEXO Nº 12

CUADRO Nº 07: Resultado de la Prueba de Tukey al determinar el porcentaje de inhibición del número de toses producidos por el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana Kraenzl.* "wawillay" en cobayos. Ayacucho - 2012.

Porcentaje de Inhibición

HSD de Tukey^a

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa= 0.05		
		a	b	c
100mg/Kg	5	31,4300		
200 mg/Kg	5		66,6560	
400 mg/Kg	5			77,0260
Codeína	5			77,6440
Sig.		1,000	1,000	,998

MATRIZ DE CONSISTENCIA

Actividad antitusiva del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kraenzl. "wawillay" en cobayos. Ayacucho-2012

TITULO	Problema de investigación	Objetivos de investigación	Marco teórico	Hipótesis	Variables e indicadores	Metodología
Actividad antitusiva del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl. "wawillay" en cobayos. Ayacucho-2012	¿Tendrá actividad antitusiva el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl. "wawillay" en cobayos?	<p>Objetivo General</p> <p>Determinar la actividad antitusiva del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl. "wawillay" en cobayos.</p> <p>Objetivo Específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> Realizar el screening fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl. "wawillay" Comparar las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico frente a un antitusivo estándar. Determinar la concentración óptima del extracto hidroalcohólico que muestre la mejor actividad antitusiva. 	<p><i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay" va del sur de México hasta los andes del sur de la tierra, desarrollándose en las laderas de la "puna" en pendientes rocosas en el Perú se encuentra en los andes del centro y del sur especialmente en los departamentos de Ayacucho y Junín.</p> <p>Este género posee propiedades medicinales como: diurético, digestivo, astringente, febrífugo, anti ulceroso e hipoglucemiante, también se le describe usos para la tos, resfrío, y retraso menstrual, etc.</p> <p>La tos es un mecanismo defensivo reflejo esencial para la vida, por el cual se elimina partículas extrañas y secreciones con el fin de mantener premiable el tracto respiratorio para la entrada y salida del aire.</p> <p>La codeína es un antitusivo de acción central que actúa sobre el centro bulbar de la tos.</p>	El extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl. "wawillay" posee actividad antitusiva significativa en cobayos.	<p>Variable independiente:</p> <p>Extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl. "wawillay"</p> <p>Indicadores:</p> <p>Concentraciones de 100, 200, 400 mg/kg respectivamente.</p> <p>Variable dependiente:</p> <p>Actividad antitusiva</p> <p>Indicador:</p> <p>Número de toses por minuto.</p>	<p>Tipo de Investigación:</p> <p>Básico – Experimental</p> <p>Nivel de estudio: Libre</p> <p>Población:</p> <p>Hojas y flores de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl. "wawillay"</p> <p>Muestra:</p> <p>2500 g de hojas y flores secas de la <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl. "wawillay"</p> <p>Muestra biológica:</p> <p>25 cobayos machos con peso de 500-700 kg.</p> <p>Metodología:</p> <ul style="list-style-type: none"> Preparación del extracto en diferentes concentraciones. La actividad antitusiva se realizará según Arroyo, Rojas y Chenguayen (2004). <p>Análisis Estadístico:</p> <p>Se presentaran en cuadros y gráficos que serán sometidos al análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey, considerando significativamente un valor de $p < 0,05$ para lo cual se usará el software SPSS, versión 15,0.</p>

ACTA DE SUSTENTACIÓN
R.D Nº 240– 2012– FCB – D
Bach. Roxana Noemí PÉREZ OCHOA

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del día jueves dieciséis (16) de Agosto del año dos mil doce en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, presididos por el Magister José Manuel DIEZ MACAVILCA quien además es miembro calificador y con la asistencia de los docentes: Doctor Aldo TINCO JAYO (asesor); Magister Marco ARONES JARA (cuarto jurado) y Magister Maricela LÓPEZ SIERRALTA quien además actuará como secretaria docente.

El presidente encargado inicia el acto de la sustentación solicitando a la secretaria docente la revisión de la documentación y la lectura de la R. Decanal Nº 240-2012-FCB-D de la sustentación de Tesis Titulada: Actividad antitusiva del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana Kraenzl* "wawillay" en cobayos. Ayacucho - 2012, presentado por la Bachiller Roxana Noemí PÉREZ OCHOA quien pretende optar el Título Profesional de Químico Farmacéutica.


La sustentante es instruida respecto al tiempo de sustentación que debe ser no mayor a cuarenta y cinco minutos e inicia la disertación de la investigación haciendo uso de diapositivas proyectadas por equipo multimedia y en el tiempo correspondiente.

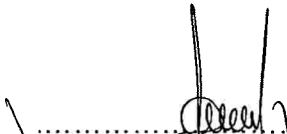
Luego se inicia la segunda etapa de la sustentación en la cual los miembros del Jurado calificador realizan las observaciones, aclaraciones y preguntas que crean convenientes para la evaluación.


Luego el presidente solicita a la sustentante y público en general, para que abandone y salgan del auditorio dejando a los miembros del jurado calificador; quienes deliberan y emiten su calificación como sigue:


JURADO CALIFICADOR	EXPOSICIÓN	RESPUESTA	PROMEDIO
Mg. José Manuel DIEZ MACAVILCA	18	17	18
Dr. Aldo TINCO JAYO	17	17	17
Mg. Maricela LOPEZ SIERRALTA	17	16	17
Mg. Marco ARONES JARA	17	15	16
		PROMEDIO	17

De la evaluación realizada la sustentante obtiene la nota promedio de DIECISIETE (17) de lo cual dan fe los miembros del Jurado calificador estampando su firma al pie de la presente. Culmina el acto de sustentación siendo las seis y treinta de la noche.


.....
Mg. José M. DIEZ MACAVILCA
Presidente-Miembro


.....
Dr. Aldo TINCO JAYO
Miembro-Asesor


.....
Mg. Marco ARONES JARA
Miembro
Cuarto Jurado


.....
Mg. Maricela LOPEZ SIERRALTA
Miembro
Secretaria Docente