

**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 y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin
Feddes Repert. “wawillay” en *Cavia porcellus*
“cobayo“. Ayacucho - 2008.**

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

Presentado por:

BACH. COAQUIRA APAZA, BETZABETH HILDA

**Ayacucho – Perú
2011**

A Dios por su bendición e inmenso amor.

A mis padres Braulio e Hilda, por su apoyo incondicional y la fuerza que me brindan para seguir adelante.

A mis hermanos Milagros y Henry, que me acompañan en todo momento de mi vida y fuente para seguir adelante.

A mis tíos y amigos por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A 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. Marco Rolando ARONÉS JARA, por su apoyo permanente en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A los profesores Dr. José YARLEQUÉ MUJICA, Mg. Johnny Aldo TINCO JAYO y Biga. Laura AUCASIME MEDINA, por su apoyo en la culminación del trabajo de investigación.

A los amigos y familiares que de una u otra manera, colaboraron en la realización y conclusión del presente trabajo de investigación, así también por apoyarme en todo momento de mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN.....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Antecedentes.....	3
2.2. Aspectos botánicos.....	5
2.3. Propiedades y usos medicinales.....	9
2.4. Diurético.....	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1. Ubicación.....	15
3.2. Materiales.....	15
3.3. Diseño metodológico.....	16
3.4. Determinación del bioensayo de la toxicidad.....	18
3.5. Análisis estadístico.....	19
IV. RESULTADOS.....	20
V. DISCUSIÓN.....	29
VI. CONCLUSIONES.....	34
VII. RECOMENDACIONES.....	35
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
IX. ANEXOS.....	39

Actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay" en *Cavia porcellus* "cobayo". Ayacucho-2008.

AUTOR: Bach. COAQUIRA APAZA, Betzabeth Hilda.

ASESOR: Mg. ARONÉS JARA, Marco Rolando.

RESUMEN

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Farmacología, Farmacognosia y Toxicología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, con el objetivo de determinar la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay". Las hojas y flores proceden del distrito de Sancos, provincia de Huancasancos del departamento de Ayacucho.

Los metabolitos presentes fueron: fenoles, taninos, flavonoides, azúcares reductores, triterpenos y/o esteroides, cardenólidos, catequinas, lactonas y/o cumarinas. Para determinar la actividad diurética se usó el método de Naik y col. se usaron 25 cobayos de 400 a 600 g de peso distribuidos aleatoriamente fueron clasificados para cinco tratamientos: solución salina fisiológica (NaCl 0.9%), furosemida (control), extracto hidroalcohólico de las hojas y flores a 150, 250 y 350 mg/kg de peso.

Se concluyó que el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay" a dosis de 350 mg/kg de peso produjo una mejor actividad diurética mostrando una eficacia de 89.5%. Se realizó las pruebas mínimas diferencias significativas de Fischer (ANVA). Así mismo se determinó la toxicidad frente a *Artemia salina* dando una concentración letal CL_{50} de 193.9081 ppm.

Palabras clave: *Calceolaria engleriana*, diurética, furosemida.

I. INTRODUCCIÓN

El Perú, beneficiado con una geografía muy variada y un clima diversificado, posee extraordinariamente potencia de recursos naturales de origen vegetal como plantas medicinales, plantas tintóreas, etc. que no son debidamente aprovechadas por adolecer de tecnologías propias, por falta de incentivos para la investigación y/o por desconocimiento de los mismos.

En la actualidad cientos de plantas medicinales son utilizados en la medicina, la ciencia moderna esta analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas queriendo precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades, 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.

Los diuréticos son un grupo de medicamentos con acción terapéutica que se utiliza para ajustar el volumen de líquidos corporales en situaciones clínicas diversas, entre otras: hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca aguda y crónica, insuficiencia renal aguda y crónica, 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).

La planta en estudio *Calceolaria engleriana* "wawillay", es conocida por su uso tradicional en afecciones digestivas y diuréticas, dando así la oportunidad de contribuir en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad diurética.

Se plantea el presente trabajo de investigación con la finalidad de superar la fase empírica de su uso, con los siguientes objetivos:

- Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay".
- Conocer la concentración óptima de la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay".
- Comparar el efecto diurético de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay" en relación con la furosemida.
- Determinar la toxicidad por el método del bioensayo con *Artemia salina*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

Desde la antigüedad las plantas fueron las medicinas que nuestros ancestros conocían, puesto que sufrían de enfermedades. Iniciando así la práctica curativa con la selección de plantas con propiedades medicinales y de esta manera calmar sus dolencias. A lo largo de este proceso, la experiencia tradicional fue transmitiéndose de generación en generación hasta la actualidad, así el hombre ahora puede seleccionar con gran intuición, las propiedades o virtudes curativas de algunas plantas y otras con acciones tóxicas. El conocimiento y el uso de las plantas medicinales, por las múltiples culturas en el mundo, hoy son ampliamente reconocidos contribuyendo en el estudio de la salud.

La calceolaria (*Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert.) se encuentran en los Andes del centro y Sur del Perú, siendo encontrado en los departamentos de Junín y Ayacucho, tienen sus propiedades terapéuticas y cosméticas, se usa tradicionalmente como digestivo, estimulante, antiulcerosos, diurético, en los resfríos y tos; se usan también en forma de infusión toda la planta.

En la actualidad en Universidades del país y del mundo, se realizan trabajos de investigación con tratamientos terapéuticos; dando así mayor importancia a

aquellas que tienen diferentes actividades farmacológicas como antiinflamatorias, antioxidantes, cicatrizantes, diurética, hipoglucemiante y otras.

En la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, y en especial en la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica; se hicieron estudios sobre actividad diurética, con la utilización de diversas plantas:

Del Castillo (2002), realizó el estudio de la *Calceolaria engleriana* con actividad hipoglucemiante ha demostrado la presencia de metabolitos secundarios como los flavonoides y taninos. Otras especies del género *Calceolaria* tendrían diferentes actividades farmacológicas, dando así una información científica.

Casanova (2004), realizó la actividad antioxidante y antiulcerosa del extracto liofilizado de *Calceolaria cuneiformis*, realizando el estudio fitoquímico y encontrando flavonoides, taninos, quinonas, triterpenos y esteroides.

Oré (2000), realizó el tamizaje fitoquímico y la evaluación del efecto diurético del *Petroselinum sativum* "perejil" en cobayos, obteniendo una eficacia diurética del 33.3% a dosis de 250 mg/kg.

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), el tamizaje fitoquímico y determinación de la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Foeniculum vulgare* "hinojo" planta nativa de Ayacucho, obteniendo un mayor efecto diurético a una concentración de 250 mg/kg y una eficacia de 42.73%.

Manrique (2004), realizó 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* "sillkai" 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%.

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.

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%.

2.2. ASPECTOS BOTÁNICOS

2.2.1. Clasificación taxonómica

Según Engler y Prantl, modificado por Melchior.

División	:	Antophyta (Angiospermae)
Clase	:	Dicotiledonea
Sub clase	:	Metaclamideas
Orden	:	Tubiflorales
Familia	:	Scrophulariaceae
Genero	:	Calceolaria
Especie	:	<i>Calceolaria engleriana</i> Kranzlin Feddes Repert.
Nombre vulgar	:	"wawillay"

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

2.2.2. Características del género *Calceolaria*

El género *Calceolaria*, se caracteriza por ser hierbas anuales o perennes, subarbustos o arbustos. Hojas simples, opuestas y desnudas, raro alternas. Inflorescencia usualmente en cimas, en algunas especies. Flores solitarias, de colores amarillas, púrpura o blancas. Cáliz con cuatro divisiones profundas. Corola bilabiada; dos estambres, laterales e insertos en la base de la corola,

filamentos cortos o largos; anteras biloculares, estilo simple; estigma en cabezuela. Capsula bilocular, cónica, dehiscente por cuatro valvas, incluida en el cáliz. Semillas numerosas, estriadas o reticuladas.

Género con unas 500 especies, la mayoría americana: México, Guatemala, Colombia, Ecuador, Perú, Argentina, Chile y también Nueva Zelanda (Molau, 1988; Mostacero, 1993).

2.2.3. Características botánicas de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert.

Subarbusto erguido de 0.2 a 1.2m de altura, tallos rojizos marrones, poco ramificado, cubierto de pelos glandulares, con inflorescencia en cima 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 amarillo 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 capsula ovoide acuminada y glandular (Molau, 1988).

2.2.4. Distribución geográfica

El género *Calceolaria* se distribuye del sur de la Sierra Madre Occidental en México, hasta los Andes del sur de la Tierra del fuego, la mayoría de las especies están en alturas que oscilan los 2000 a 4200 m.s.n.m.

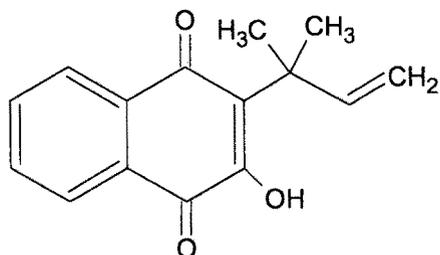
Según el estudio realizado por el botánico Ulf Molau de la *Calceolaria engleriana* es endémica de los Andes centrales del Perú, siendo encontrado en los departamentos de Junín y Ayacucho, en las laderas de la puna, en pendientes rocosas, cerca de escorrentías de agua, canales de regadío, terrenos de cultivo, en suelos franco arenosos y pedregosos. Aproximadamente de 3000 a 3800 m.s.n.m. (Molau, 1988; Aedes, 1998).

2.2.5. Composición química

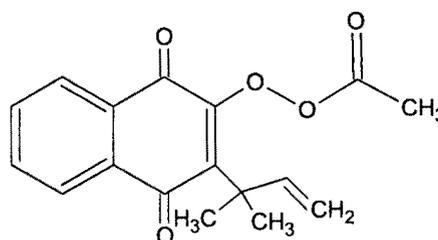
Sobre la composición química del género *Calceolaria*, se han realizado diversos estudios, identificando algunos compuestos químicos.

a.- Diterpenos: comprende un grupo de compuestos de 20 átomos de carbono que puede presentarse en forma de hidrocarburos, alcoholes, cetonas, lactonas y ácidos carboxílicos. En los últimos años han sido reportados muchos nuevos diterpenoides, como resultado de continuos estudios fitoquímicos, siendo interesante el hecho que los tipos de esqueleto encontrados pueden ser diferentes en las distintas partes de la planta (Lock, 1994).

Bhupinder y col. (1999), aislaron dos naftoquinonas identificadas como 2-(1,1-dimetilpro-2enil)-3-hidroxi-1,4-naftoquinona (I) y su correspondiente acetato, el 2-acetoxi-3-(1,1-dimetilpro-2enil)-3-hidroxi-1,4-naftoquinona (II).



(I)

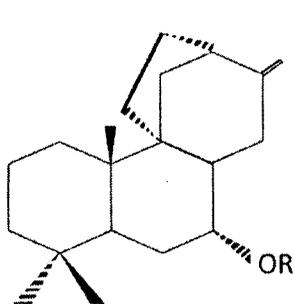


(II)

Figura N° 1: 2-(1,1-dimetilpro-2enil)-3-hidroxi-1,4-naftoquinona
Fuente: Brupinder y col. (1999)

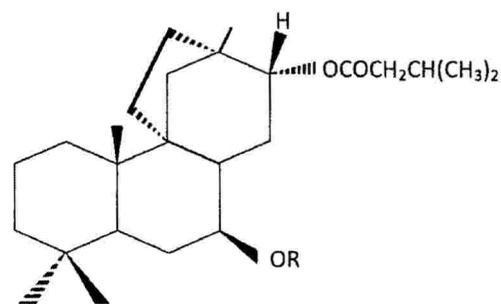
Figura N° 2: 2-acetoxi-3-(1,1-dimetilpro-2enil)-3-hidroxi-1,4-naftoquinona
Fuente: Brupinder y col. (1999)

Chamy y col. (2001) estudiaron las partes aéreas de *Calceolaria glabrata* aislando un nuevo diterpeno, 13-metilen-7-acetoxi-estemarano (III) junto con los diterpenos conocidos 13-isovaleroil-7-acetoxi-tirsiflorano (IV) y el 13-isovaleroil-7-malonil-tirsiflorano (V).



(III) $R = Ac$

Figura N° 3: 13-metilen-7-acetoxy-estemarano
Fuente: Chamy y col. (2001)



(IV) $R = Ac$
(V) $R = COCH_2COOH$

Figura N° 4: 13-isovaleroil-7-acetoxy-tirsiflorano
Figura N° 5: 13-isovaleroil-7-maloniil-tirsiflorano
Fuente: Chamy y col. (2001)

Bravo y col. (2005) reportan el aislamiento de 1,4-benzoxazin-3-ona, 2-benzoxalidona y el ácido gálico (tanino) de las hojas y flores de *Calceolaria thysiflora*.

Chamy y col. (2006) estudiaron las partes aéreas de *Calceolaria paralia* aislaron un nuevo diterpeno, el 19-butiloxi-9 α -hidroxi-13-epi-ent-pimara-15-ene.

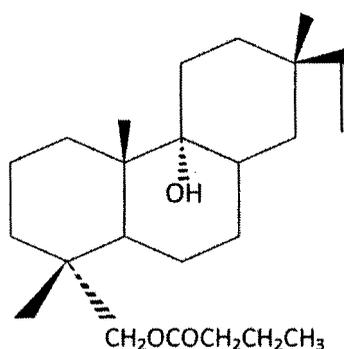


Figura N° 6: 19-butiloxi-9 α -hidroxi-13-epi-ent-pimara-15-ene
Fuente: Chamy y col. (2006)

b.- Flavonoides: Compuestos fenólicos en su mayoría son pigmentos responsables de la coloración de numerosas flores y de algunos frutos; tienen un esqueleto de C_{15} en su núcleo básico, bajo un sistema $C_6-C_3-C_6$, en el cual dos anillos aromáticos A y B están unidos por la unidad de C_3 que pueden formar o no un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C.

Dentro de este grupo de compuestos encontramos los: flavonoles, flavonas, isoflavona y sus respectivos derivados. Cada uno de las clases de flavonoides,

suele encontrarse bajo la forma de glicósidos con una o tres unidades de azúcar, generalmente en los carbonos 3 y/o 7, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa. La acción farmacológica es también extensa y variada, son bien conocidas sus contra la fragilidad capilar, dilatadores de las coronarias, espasmolítica, antihepatotóxica, colerética, estrógeno y diurética (Lock, 1994).

c.- Cumarinas: derivados de la benzo-alfa-pirona, son comunes en las plantas, tanto en estado libre como en el de heterósido. No todos son fenólicos pero se estima conveniente incluirlos entre los derivados fenólicos.

A las cumarinas se les atribuye diversas actividades farmacológicas tales como: acción anticoagulante y antibacterial del dicumarol, acción antibiótica de la novobiocina, la aguda hepatotóxicidad y carcinogenicidad de ciertas aflatoxinas, acción insecticida, cabe destacar también aplicaciones de las cumarinas como saborizantes y en la perfumería (Bruneton, 1991).

d.- Taninos: Los taninos son compuestos químicos complejos no cristalizables que forman con el agua soluciones coloidales de reacción acida y de sabor muy acre, los taninos precipitan a las proteínas en solución y se combinan con ellas; haciéndolas resistentes a las enzimas proteolíticas; aplicado a los tejidos vivos para evitar su putrefacción, esta acción se conoce como acción astringente y así dando la base para la acción terapéutica.

Por su propiedad astringente se emplea en uso externo como cicatrizante y en el tratamiento de las quemaduras, por su capacidad de unirse a las proteínas de la piel provocando así una especie de curtido, también se les da otros usos como antidiarreico, antiséptico y antídoto (Evans, 1991).

2.3. PROPIEDADES Y USOS MEDICINALES

Según los datos etnobotánicas la planta silvestre de *Calceolaria engleriana*. Se le atribuye ciertas propiedades medicinales como: digestivo, estimulante,

antiulceroso, diurético; también se describe su uso para la tos, retraso menstrual, en los resfríos, hígado; se usan también en infusión toda la planta (Peña, 2006). También hay otras especies que tienen propiedades como: *Calceolaria cuneiforme* R&P, es una especie silvestre que se utiliza como diurético e infecciones uterinas en infusión de toda la planta y como cosmético para quitar las manchas de la piel y elimina cicatrices el polvo de la flor; *Calceolaria deflexa* R&P también es una especie silvestre que es utilizada como “llipta” para el “chacchado” de la coca; *Calceolaria herzogiana* Kran, es una especie silvestre utilizado para problemas estomacales; *Calceolaria pinnata* L, es una especie silvestre distribuida entre la costa y la sierra, utilizada como diurético (Brack, 1999).

2.4. 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).

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 natriuréticos-excretorios 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:

- a) En primer lugar una excreción iónica, principalmente sodio, que se extrae del líquido extracelular.
- b) En segundo lugar una eliminación de agua, que también procede del líquido extracelular, que así se contrae, desapareciendo el edema.
- c) 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).

2.4.1. Principales clases de diuréticos

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 (Flores, 1998; Goodman y Gilman, 2007).

2.4.2. Furosemida

Origen y Química

La furosemida es un derivado del ácido antranílico, posee un núcleo bencenosulfamilo halogenado adyacente en forma semejante a las tiazidas.

Deriva de un anillo aromático fundamental correspondiente al ácido antranílico, con una cadena lateral que contiene un anillo furano; su potencia y eficacia diurética depende de todas estas características (Remington, 2003).

Mecanismo de acción

Este diurético actúa directamente sobre el riñón aumentando el volumen urinario y 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 de Henle.

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).

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 plasma 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 4 a 6 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 2 horas (Smith y Cedric, 1999; Remington, 2003).

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 4-6 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 6 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. UBICACIÓN

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 Octubre 2008 a Marzo 2009.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Población

Plantas de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay", que crecen en el distrito de Sancos de la provincia de Huancasancos, departamento de Ayacucho, que se encuentra ubicado a una altitud de 3408 m.s.n.m.

3.2.2. Muestra

Dos kilogramos de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay", fueron colectadas en buen estado en las riveras del río y terrenos aledaños a ella en el distrito de Sancos, durante los meses de mayo y junio.

3.2.3. Material biológico

Veinticinco cobayos machos adquiridos del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) de la Estación Experimental Agraria Canaán – Ayacucho, con un

peso de 400 – 600 gramos de peso, con una edad de tres meses, criados y alimentados en las mismas condiciones.

3.3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.3.1. Procedimiento para la recolección de la muestra

Se procedió a recolectar las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. “wawillay”, del distrito de Sancos en horas de la tarde (5:00 p.m.). Se seleccionó 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 a dos semanas. Después se procedió a la molienda haciendo uso de un mortero hasta obtener un polvo fino que fue guardado en un frasco ámbar hasta su utilización.

3.3.2. Preparación del extracto hidroalcohólico

La muestra seca y molida se maceró en frascos de color ámbar por un período de una semana aproximadamente en alcohol a 70° éste cubrió la muestra unos 10 cm. Durante el proceso se agitó el frasco periódicamente para que el alcohol se distribuya homogéneamente en la muestra. Luego se procedió a filtrar y concentraren una estufa a 40°C, hasta obtener un extracto seco.

3.3.3. Identificación de los metabolitos secundarios *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. “wawillay”

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

3.3.4. Determinación de la actividad diurética

3.3.4.1. Evaluación de la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. “wawillay”

A partir del extracto hidroalcohólico concentrado de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay", se prepararon concentraciones de 150, 250 y 350 mg/kg de peso. Los cuales se diluyeron en agua destilada.

3.3.4.2. Metodología

La metodología empleada para la determinación de la actividad diurética se basa en el método utilizado por Naik y Colaboradores, aplicado en la cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Cotillo, 1990).

Procedimiento experimental

Se utilizaron 25 cobayos del mismo sexo y edad con un peso corporal entre 400 a 600 gramos. Los mismos que fueron mantenidos en ayunas por 12 horas antes de la prueba, sin ser privadas de agua. Se les administró 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 pesó y administró por vía oral el extracto hidroalcohólico y el control (furosemida). Después de 1 hora se recolectó la orina por un periodo de 4 horas en una probeta graduada y registrándose el volumen correspondiente.

3.4.2. Diseño experimental

Se formó 5 grupos de 5 cobayos cada uno distribuido aleatoriamente, los que fueron sometidos a los siguientes tratamientos:

- **Grupo 1:** Tratado con solución de cloruro de sodio al 0.9%, blanco.
- **Grupo 2:** Tratado con furosemida en dosis de 20 mg/kg de peso, control.
- **Grupo 3:** Administrando con el extracto hidroalcohólico a dosis de 150mg/kg de peso.

- **Grupo 4:** Administrando con el extracto hidroalcohólico a dosis de 150mg/kg de peso.
- **Grupo 5:** Administrando con el extracto hidroalcohólico a dosis de 150mg/kg de peso.

Se expreso la excreción volumétrica urinaria (EVU) en porcentaje utilizando la siguiente formula:

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

$$Eficacia = \frac{\text{Vol. de orina del tto} - \text{Vol. de orina del blanco}}{\text{Vol. de orina del blanco}} \times 100$$

3.4. DETERMINACION DEL BIOENSAYO DE TOXICIDAD EN *Artemia salina*

Este ensayo nos permitió determinar la toxicidad en los nauplios de este crustáceo que es altamente sensible a una gran variedad de sustancia química; para este caso la toxicidad se expresa como Concentración Letal 50 (CL₅₀), 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 por 100 de los individuos, se expresa en ppm. Los valores de CL₅₀ menores de 1000 ppm son considerados activos.

3.4.1. Procedimiento

Se preparó en viales cuatro diluciones distintas: 10 ppm, 100 ppm, 500 ppm y 1000 ppm, cada dilución cuenta con sus respectivas concentraciones: 5 µl, 50 µl, 250 µl y 500 µl respectivamente (siendo 3 viales por cada concentración: 12 en total) y cada concentración contó con un blanco para su observación.

A cada vial se le agregó 10 nauplios y la dilución del extracto requerido. Luego se agregó agua de mar hasta completar 5 ml por vial. A cada vial se le agregó además

una gota de suspensión de levadura (3mg de levadura seca se disuelven en 5 ml de agua de mar) como alimento.

Después de 24 horas, se contó y anotó el número de sobrevivientes en cada dilución (Meyer y col., 1982; Cáceres, 1999).

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se presentan en cuadros, gráficos y fueron sometidos al análisis de varianza (ANVA) a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$), el área bajo la curva volumen-tiempo. Para determinar la CL_{50} en la prueba de *Artemia salina* se utilizó el método de PROBITS.

IV. RESULTADOS

CUADRO N° 01: Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Reper. "wawillay". Ayacucho – 2008.

METABOLITOS SECUNDARIOS	ENSAYO	RESULTADOS	OBSERVACIÓN
FENOLES Y/O TANINOS	Cloruro férrico	+++	Verde azulado
AZUCARES REDUCTORES	Benedict	++	Rojo naranja
FLAVONOIDES	Shinoda	+++	Amarillo a rojo
ESTEROIDES Y/O TRITERPENOS	Lieberman	++	Rojo
SAPONINAS	espuma	-	No presenta espuma
CARDENOLIDOS	Kedde	++	Formación de anillo violeta
LACTONAS Y/O CUMARINAS	Bajet	+	Rápido
AMINOÁCIDOS (AMINAS)	Ninhidrina	-	No hay coloración
CATEQUINAS	Na ₂ CO ₃ + Luz UV	++	Verde carmelita en el papel filtro a luz UV
ALCALOIDES	Dragendorff	-	No hay precipitado
	Mayer	-	No hay precipitado
	Hager	-	No hay precipitado

Leyenda:

- (+++) : Abundante
- (++) : Poco
- (+) : Leve
- (-) : Ausente

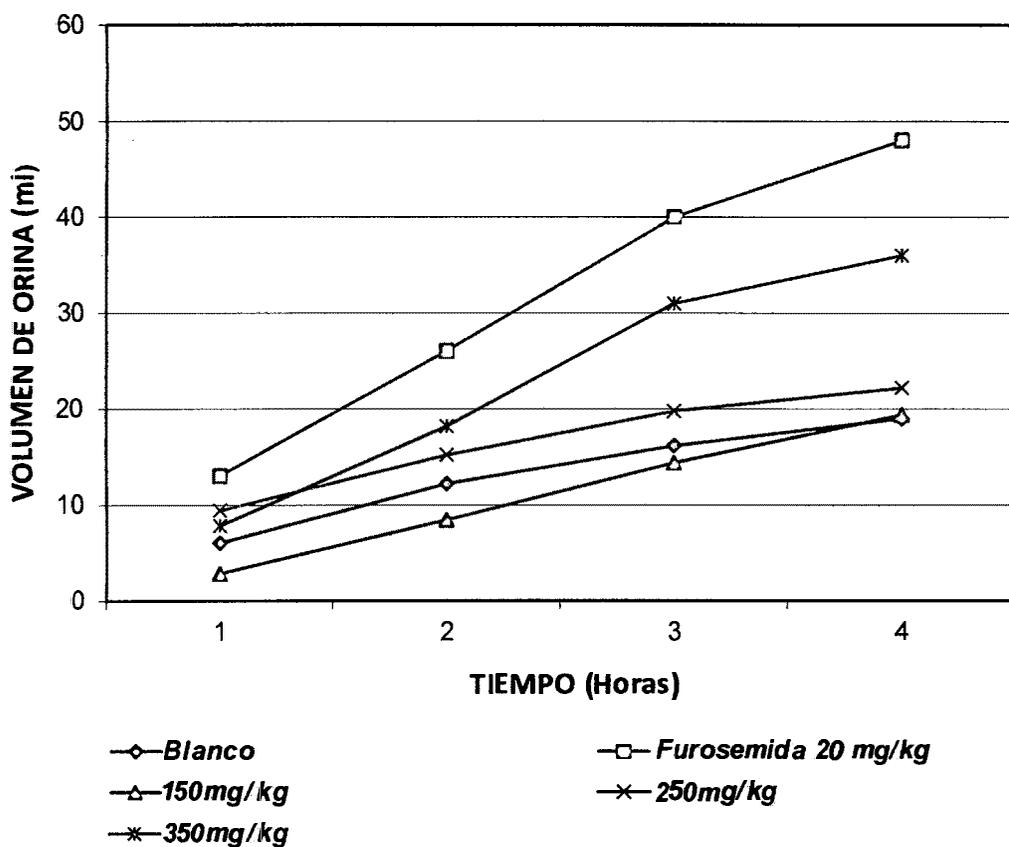


GRÁFICO N° 01: Variación del volumen de orina en función del tiempo por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay". Ayacucho – 2008.

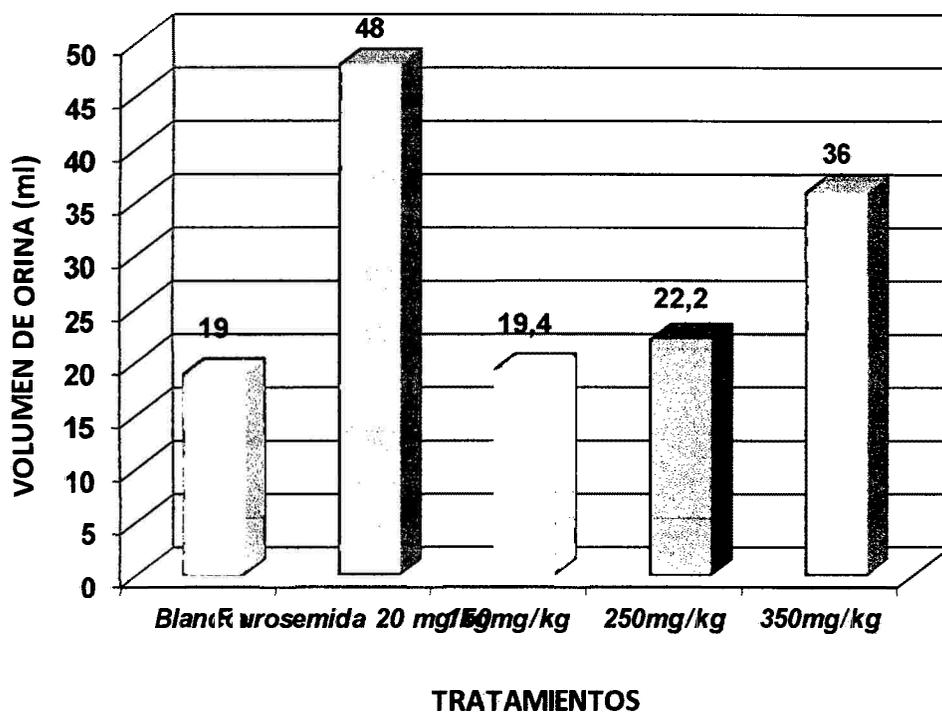


GRÁFICO N° 02: Volumen promedio final de orina por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay". Ayacucho – 2008.

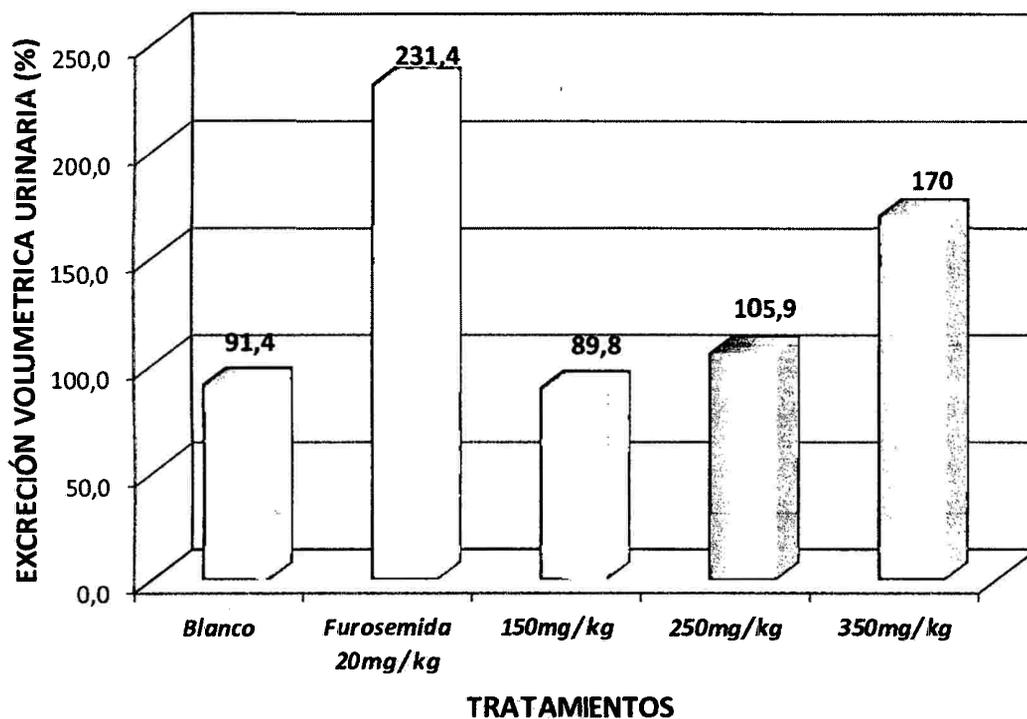
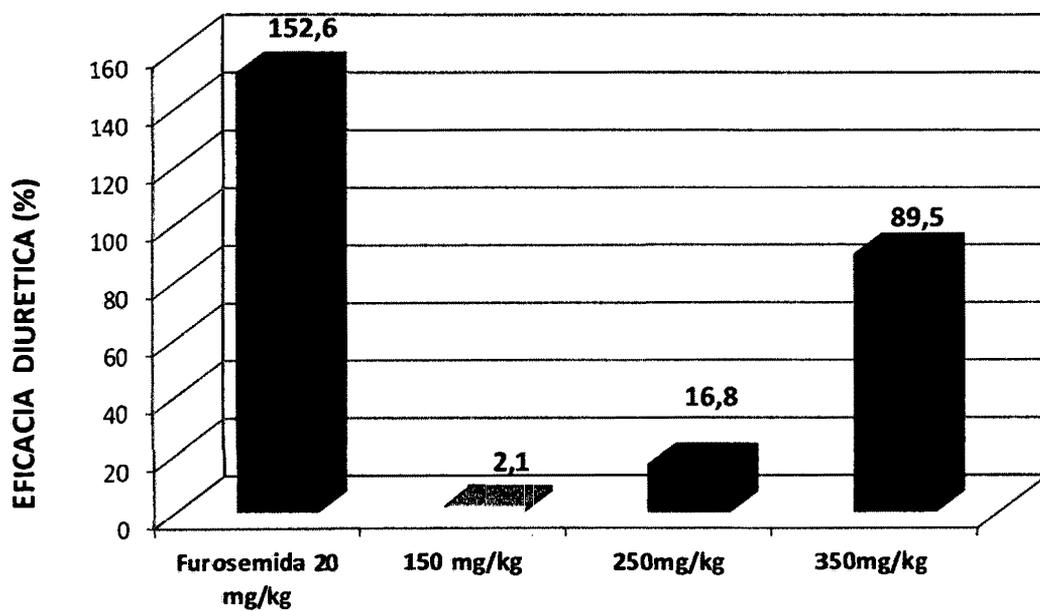
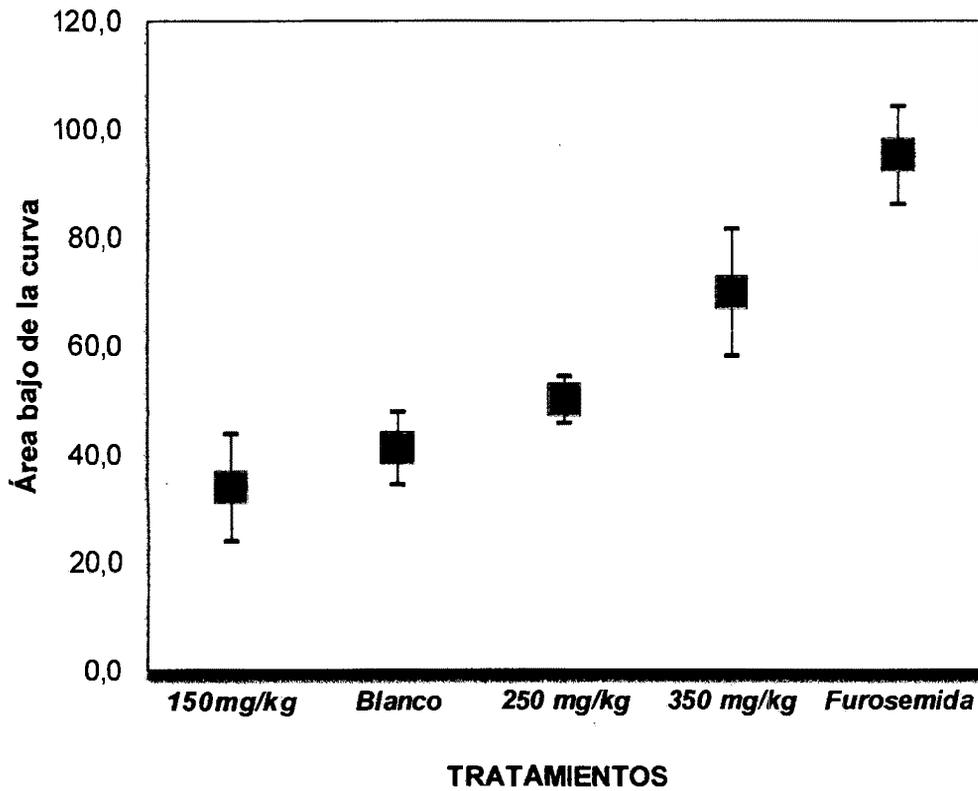


GRÁFICO N° 03: Excreción volumétrica urinaria expresada en porcentaje del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay". Ayacucho – 2008.



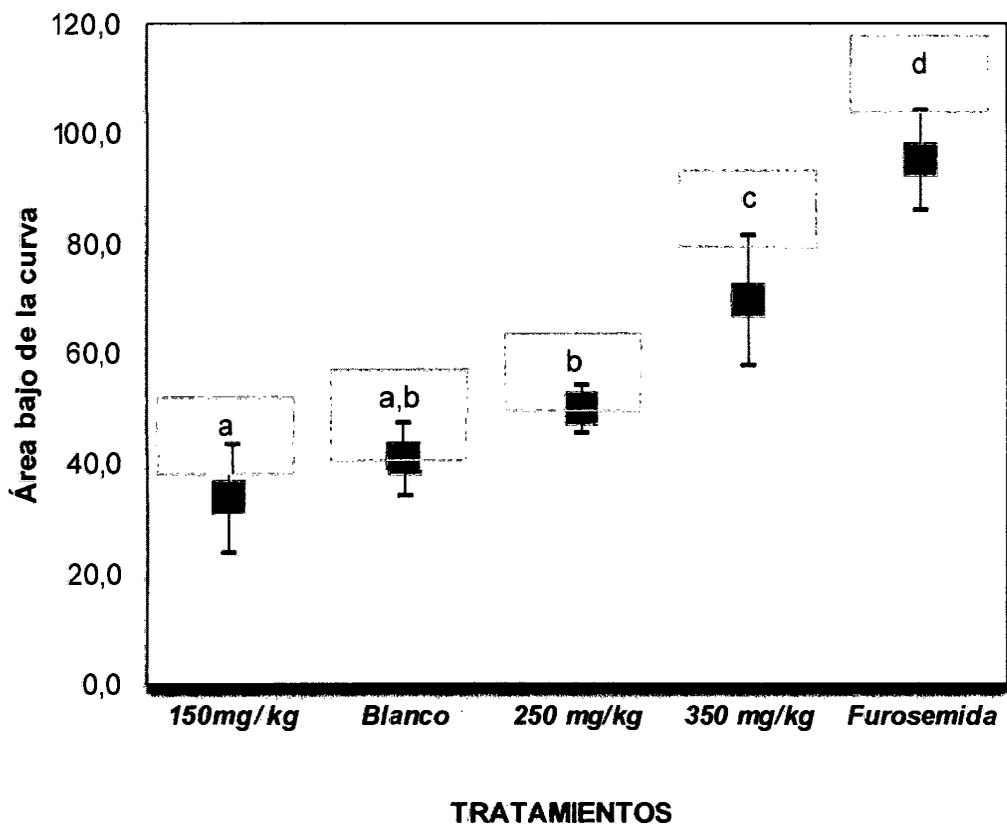
TRATAMIENTOS

GRÁFICO Nº 04: Eficacia diurética expresada en porcentaje del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay". Ayacucho-2008.



ANVA: $p < 0,05$

GRÁFICO Nº 05: Variación del área bajo la curva del volumen de la orina en función del tiempo según tratamientos. Ayacucho – 2008.



ANVA: $p < 0,05$

GRÁFICO Nº 06: 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 – 2008.

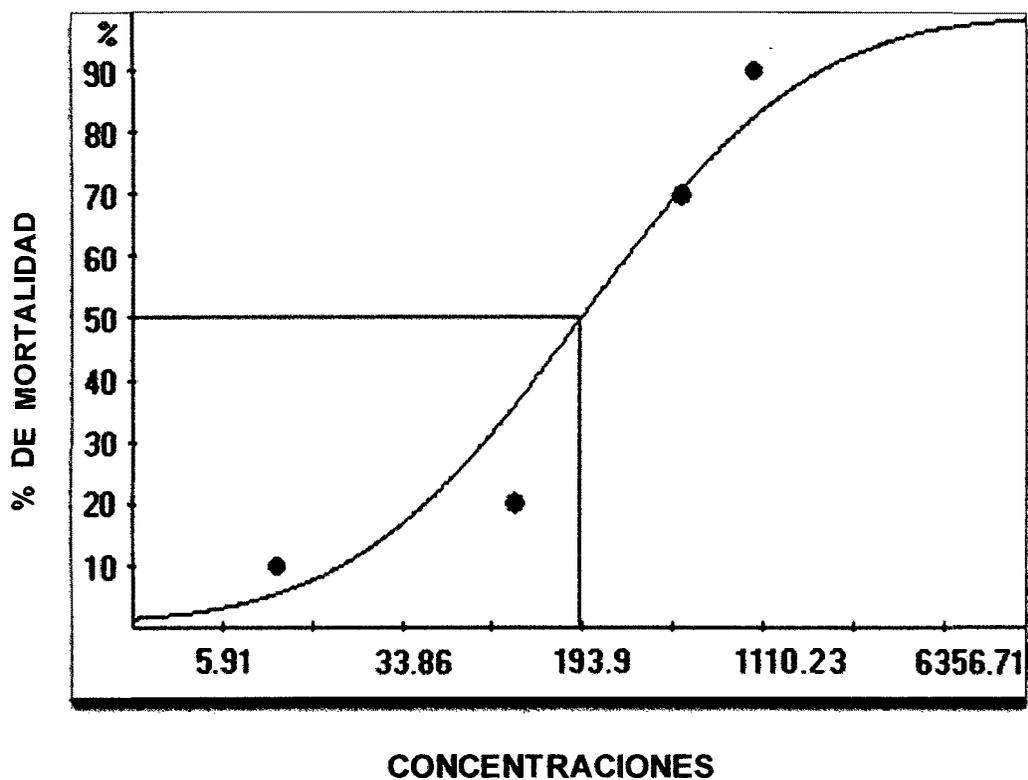


GRÁFICO N° 07: Curva del porcentaje de mortalidad de *Artemia salina* respecto del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay" en un tiempo de 24 horas. Ayacucho – 2008.

V. DISCUSIÓN

En el cuadro N° 01, se hace mención de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico conteniendo fenoles, taninos, flavonoides, azúcares reductores, triterpenos y/o esteroides, cardenólidos, catequinas, lactonas y/o cumarinas. Todos los metabolitos analizados se encuentran en abundante y poca cantidad debido a que el extracto hidroalcohólico, arrastra metabolitos secundarios mediana y fuertemente polares.

En estudios realizados de *Calceolaria engleriana* subsp. ha demostrado la presencia de metabolitos secundarios como los flavonoides, taninos, triterpenos (Del Castillo, 2002); *Calceolaria cuneiformis*, se encontró flavonoides, taninos, quinonas, triterpenos (Casanova, 2004); *Calceolaria engleriana*, *C. cuneiformis*, *C. tripartita*, *C. cordifolia*, *C. rivularis* y *C. ballotifolia*, determinado la presencia de compuestos fenólicos, terpénicos, quinonas y resinas respectivamente (Romero y col; 2008).

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, 1994).

En cuanto a las cumarinas, se hace mención que se encuentra desde la raíz, flores y siendo muy abundantes en los frutos; tienen actividad farmacológica como: antibacteriana, antibiótica y acción anticoagulante (Evans, 1991).

Los taninos 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 (Evans, 1991).

Gráfico N° 01. Para evaluar la actividad diurética de la *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay"; se utilizó la furosemida como referencia ya que es un fármaco diurético de máxima eficacia. Para ello se utilizó el método de Naik y col. modificada por la cátedra de farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Cotillo, 1990), siendo este el más utilizado, adecuado y económico para la realización de este tipo de trabajo de investigación.

En este gráfico se observa a la variación del volumen de orina en función del tiempo por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay", en la cual se observa que a medida que pasa el tiempo va aumentando la eliminación de orina y nos da una gráfica de dosis-respuesta, y la furosemida es mayor a los diferentes tratamientos dando un volumen de orina excretado de 48 ml, debido a que es un diurético control, pero a dosis de 350 mg/kg de peso, del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay", tiene un comportamiento similar, mostrando un volumen de orina excretado de 36 ml.

Gráfico N° 02. Se observa el histograma de frecuencias, referido al volumen promedio final de orina por efecto del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay", resaltando que el volumen de orina eliminado por la furosemida es de 48 ml., seguido de la dosis de 350 mg/kg de peso produce 36 ml de orina eliminado, mostrando así que a esta dosis representa la concentración de mayor eficacia diurética, por ser un volumen de orina eliminado muy próximo presentado por la furosemida. A dosis de 150 mg/kg de peso obtuvo un volumen de 19.4 ml, el cual muestra una semejanza en la actividad diurética con respecto al blanco que tuvo 19 ml de orina eliminado; que podrían deberse a factores propios del animal (raza, peso, estrés del animal y lugar), esto podría ser por diferentes factores ambientales, y a la dosis de 250 mg/kg de peso se obtiene 22.2 ml de orina mostrando así una actividad diurética significativa en comparación con el blanco y el fármaco de referencia.

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 de furosemida es 231.4%, siendo este el mayor en comparación al resto de los tratamientos, pero a la dosis de 350 mg/kg de peso del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay" tiene un porcentaje de 170.0% esto nos indica que tiene actividad diurética, porque tiene un valor cercano presentado por la furosemida.

Gráfico N° 04. En este gráfico se presenta la eficacia diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay" que a dosis de 350 mg/kg de peso presenta una eficacia de 89.5% en comparación al de la furosemida presenta una eficiencia de 152.6%,. Así queda demostrado en el presente trabajo de investigación la actividad

diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay". Muestra una respuesta diurética positiva a la dosis de 350 mg/kg de peso en comparación con la furosemida.

La eficacia diurética obtenida en el presente trabajo de investigación fue de 89.5% que es superior a los a los resultados obtenidos a los diferentes trabajos realizados en la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga como: en *Petroselinum sativum* "perejil" (Oré, 2000), *Foeniculum vulgare* "hinojo" (Oriundo, 2003), *Bidens pilosa* "sillkau" (González, 2003) y *Sambucus peruviana* H.B.K. "sauco" (Prado, 2008), quienes reportaron valores de 33.3%, 42.73%, 54.8% y 70.46% de eficacia diurética respectivamente; todos estos trabajos se realizaron siguiendo el mismo método y así también como del material biológico utilizado en el presente trabajo realizado.

Gráfico N° 05. En el presente gráfico se muestra la comparación de los promedios de la variación del área bajo la curva del volumen de la orina en función del tiempo según los tratamientos, observando que hay variación entre los tratamientos administrados donde a dosis de 150 mg/kg de peso es menor al del blanco, y a dosis de 250 mg/kg de peso es diferente al blanco, seguida por dosis de 350 mg/kg de peso tiene un comportamiento eficaz frente a la furosemida; notándose así que hay un tratamiento diferente a los demás.

Gráfico N° 06. La representación gráfica de la Prueba de Mínimas Diferencias Significativas de Fischer se realiza para hacer comparaciones múltiples; a dosis de 150 mg/kg de peso y el blanco son estadísticamente similares ($p < 0,05$), se observa que el blanco y a dosis de 250 mg/kg de peso también son estadísticamente similares ($p < 0,05$), y a dosis de 350 mg/kg de peso es estadísticamente diferente al blanco, a 150 y 250 mg/kg de peso ($p < 0,05$), la furosemida es también estadísticamente diferente a los demás tratamientos ($p < 0,05$).

Gráfico N° 07. Adicionalmente se realizó la determinación de la bioactividad en nauplios de *Artemia salina*, se determinó la concentración letal, CL_{50} fue de 193.9081 ppm indicando la bioactividad de este extracto ya que valores menores a 1000ppm se le considera como biológicamente activo (CYTED, 1995), es decir el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay" contiene sustancias químicas con actividad biológica.

VI. CONCLUSIONES

1. Los metabolitos secundarios identificados son: fenoles, taninos, flavonoides, azúcares reductores, triterpenos y/o esteroides, cardenólidos, catequinas, lactonas y/o cumarinas.
2. El extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay", presentó mejor actividad diurética siendo a 350 mg/kg.
3. El mayor efecto diurético del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay", fue registrado a una concentración de 350 mg/kg, con una eficacia de 89.5% en relación a la furosemida que es de 152.6%.
4. Tiene compuestos de gran actividad biológica con Concentración Letal, CL_{50} de 193.9081 ppm en nauplios de *Artemia salina*.

VII. RECOMENDACIONES

1. Continuar con el estudio del presente trabajo de investigación, determinando y cuantificando específicamente cual de los principios activos que contiene la *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay" es el principal responsable de la actividad diurética y otros estudios farmacológicos diferentes al investigado.
2. Los ambientes de laboratorio deben ser adecuados e implementados para este tipo de ensayo farmacológico tomándose en cuenta ciertos factores por que influyen en su fisiología y contribuyendo así al estrés de los cobayos y por ende alterar los resultados finales.
3. Difundir con los estudios realizados de la presente investigación a la población para su respectivo uso medicinal de esta planta.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aedes, C.** (1998). Estudio de la biodiversidad vegetal y animal, cuenca de Cotahuasi; flora medicinal. Consejo Provincial de la Unión, Secretaria Técnica La Unión. Arequipa – Perú.
2. **Aldave, A.** (1988). Botánica Farmacéutica. Primera edición. Editorial Libertad E.I.R.L. Trujillo - Perú.
3. **Bhupinder, P., Khambay, Duncan Batty, Matthew Cahill, Denholm. Isolation.** (1999). Characterization, and Biological activity of Naphthoquinones from *Calceolaria andina* L. *J. Agric. Food Chem.*, **47**(2), 770-775.
4. **Brack, A.** (1999). Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las casas. Cuzco-Perú.
5. **Bravo, H., 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.
6. **Bruneton, J.** (1991). Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Primera edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza – España.
7. **Cáceres, A.** (1999). Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Editorial de la Universidad San Carlos. Facultad de ciencias químicas y farmacia. Guatemala.
8. **Casanova, G.** (2004). Actividad antioxidante y antiulcerosa del extracto acuoso liofilizado de *Calceolaria cuneiformes* "ayapa zapatum". Tesis UNSCH. Ayacucho-Perú.
9. **Chamy, M., Piovano, M., Garbarino, J., Espinoza, L.** (2006). Diterpenoides from *Calceolaria paralia*. *Bol.Soc.Chil.Quím.* v.51 n.1 Concepción mar.
10. **Chamy, M., Piovano, M., Garbarino, J., Mendoza, J.** (2001). Diterpenoides from *Calceolaria glabrata*. *Bol.Soc.Chil.Quím.* v.46 n.2 Concepción jun.
11. **Cotillo, P.** (1990). Métodos Farmacológicos en la Investigación de los Productos Naturales. Editorial Jarmad. Lima – Perú.
12. **CYTED** (1995). Manual de Técnicas de Investigación. Programa Iberoamericano de Ciencia y tecnología para el Desarrollo.
13. **Del Castillo, J.** (2002). Tamizaje fitoquímico, actividad hipoglucemiante y toxicidad aguda de *Calceolaria engleriana* Sub sp. *Lutea* Molau "ayazapato". Tesis UNSCH. Ayacucho-Perú.

14. **Evans, W.** (1991). *Farmacognosia*. Editorial Interamericana McGraw-Hill. México.
15. **Flores, J.** (1998). *Farmacología Humana*. Tercera edición. Editorial Masson S.A. Madrid – España.
16. **Franco, V.** (2002). Evaluación de la actividad diurética de *Krameria lappacea* "ratania" en cobayo. Tesis UNSCH. Ayacucho – Perú.
17. **González, V.** (2004). Evaluación de la actividad diurética del extracto atomizado de *Bidens pilosa* "sillkau" en cobayos. Facultad de Ciencias Biológicas UNSCH. Ayacucho-Perú.
18. **Goodman, A. y Gilman, P.** (2007). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Tomo II. Undécima edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Bogotá – Colombia.
19. **Guyton, A.** (2001). *Tratado de Fisiología Médica*. Decima edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana México.
20. **Litter, M.** (1997). *Farmacología*. Editorial El Ateneo. Buenos Aires – Argentina.
21. **Lock, O.** (1994). *Investigación Fitoquímica: Método en el estudio de productos naturales*. Segunda edición. Editorial Fondo. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima – Perú.
22. **Manrique, J.** (2004). Efecto diurético a diferentes concentraciones del extracto acuoso atomizado de *Taraxacum officinale* "diente de león". Facultad de Ciencias Biológicas UNSCH. Ayacucho-Perú.
23. **Mayhua, H.** (2008). Actividad diurética del extracto hidroalcohólico del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* "mashua" en ratas. Tesis UNSCH. Ayacucho - Perú.
24. **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.
25. **Miranda, M.** (2000). *Métodos de Análisis de Drogas y Extractos*, Universidad de la Habana; Instituto de Farmacia y Alimentos. Cuba.
26. **Molau, U.** (1988). *Flora Neotropica*. Monograph N° 47 Scrophulariaceae part 1 Calceolariaceae. The New York Botanical Garden. New York – USA.
27. **Mostacero, J.** (1993). *Taxonomía de Fanerógamas Peruanas*. Primera edición. Editorial Concytec. Trujillo – Perú.

28. **Oré, J.** (2000). Tamizaje fitoquímico y evaluación del efecto diurético del *Petroselinum sativum* "perejil" en cobayos. Tesis UNSCH. Ayacucho – Perú.
29. **Oriundo, S.** (2003). Tamizaje fitoquímico y determinación de la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Foeniculum vulgare* "hinojo". Facultad de Ciencias Biológicas UNSCH. Ayacucho-Perú.
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. **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.
32. **Rémington, G.** (2003). Farmacia. Tomo II. 20ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires – Argentina.
33. **Romero, M., Magallanes, C., Aguilar, E., Alarcón, J.** (2008). Género *Calceolaria* en la provincia de Huamanga: aspectos botánicos, fitoquímico, antibacteriano y producción. Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho - Perú.
34. **Smith, M., Cedric, M.** (1999). Farmacología. Tomo II. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires – Argentina.
35. **Uriarte, V., Trejo, S.** (2003). Farmacología Clínica. Primera edición. Editorial Trillas S.A. de C.V. México.
36. **Velásquez, L.** (1993). Farmacología y su Proyección a la Clínica. Editorial Oteo. Madrid – España.

IX. ANEXOS

ANEXON°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. **Betzabeth Hilda, COAQUIRA APAZA**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido determinada según el Sistema de Clasificación de Engler y Prantl, modificado por Melchior, y es como sigue

DIVISIÓN	:	ANTOPHYTA (ANGIOSPERMAE)
CLASE	:	DICOTILEDONEAE
SUBCLASE	:	METACLAMIDEAS
ORDEN	:	TUBIFLORALES
FAMILIA	:	SCROPHULARIACEAE
GENERO	:	Calceolaria
ESPECIE	:	<i>Calceolaria engleriana</i> Kranzlin Feddes Repert.
N.V.	:	"wawillay"

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

Ayacucho, 18 de MaYo del 2009.

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

Blga. Loury Lucastine Medina
JEFE

ANEXO N°02



Fotografía N°01: *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay"

ANEXO Nº 03



Fotografía Nº 02: Planta de *Calceolaria engleriana* en su habitat y la respectiva recolección.

ANEXO N° 04



Fotografía N° 03: Se observa la coloración de la identificación de los metabolitos secundarios presentes del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de la *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay".

ANEXO N°05



Fotografía N° 04: Concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay".

ANEXO N° 06



Fotografía N° 05: Se observa la administración de los tratamientos a la unidad experimental.

ANEXO N°07



Fotografía N° 06: Se observa el volumen de orina eliminado.

ANEXO Nº 08



Fotografía Nº 07: Incubación de los Nauplios de *Artemia Salina* por 24 horas.

ANEXON°09

CUADRO N° 02: Volumen de orina obtenido de cobayos utilizado en los diferentes tratamientos de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay". Ayacucho – 2008.

Tiempo (horas)	Valores Promedio de volumen orina (ml)				
	Blanco NaCl 0.9%	Furosemida 20mg	Extracto hidroalcohólico de las hojas y flores		
			150mg/kg	250mg/kg	350mg/kg
1	6	13	2.8	9.4	7.8
2	12.2	26	8.4	15.2	18.2
3	16.2	40	14.4	19.8	31
4	19	48	19.4	22.2	36

ANEXON°10

CUADRO N° 03: Datos descriptivos del área bajo la curva de la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Reper. "wawillay", en función del tiempo y según los tratamientos. Ayacucho – 2008.

Tratamientos	N	Área Bajo la Curva	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
		Media			Límite inferior	Límite superior		
Blanco	5	40,1	4,2	1,9	34,9	45,3	35,3	45,8
Furosemida	5	95,3	5,7	2,5	88,2	102,3	88,5	101,3
150 mg/kg	5	33,8	6,2	2,8	26,0	41,5	27,0	42,0
250 mg/kg	5	50,0	2,7	1,2	46,6	53,4	47,3	53,3
350mg/kg	5	69,8	7,4	3,3	60,6	79,0	63,0	81,8
Total	25	57,8	23,4	4,7	48,1	67,4	27,0	101,3

ANEXO N° 11

CUADRO N° 04: Análisis de varianza del área bajo la curva de la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. "wawillay", en función del tiempo y según tratamientos. Ayacucho – 2008.

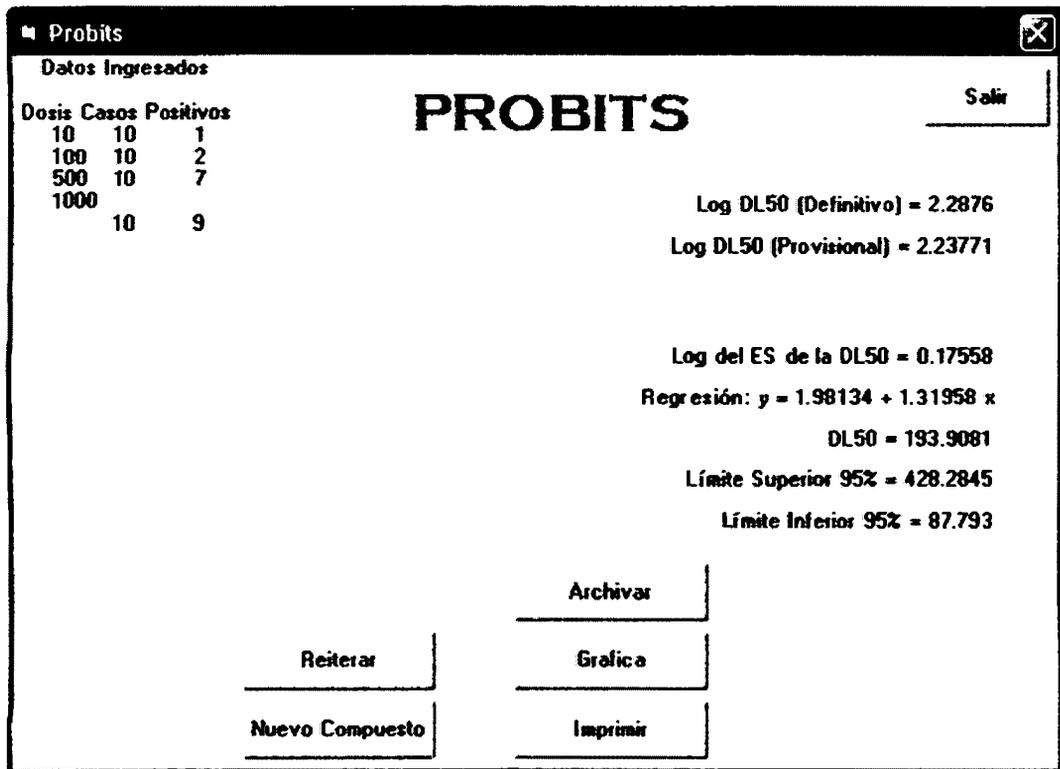
Área Bajo la Curva	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	12495,6	4	3123,9	103,85	3,99E-13
Intra-grupos	601,6	20	30,08		
Total	13097,2	24			

ANEXO N° 12

CUADRO N° 05: Comparaciones múltiples de Fisher del área bajo la curva del volumen de orina en función del tiempo y según tratamientos.

Tratamiento	Comparación	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Blanco	Furosemida	-55,2	3,5	8,16E-13	-62,4	-47,9
	150mg/kg	6,3	3,5	0,082543	-0,9	13,6
	250mg/kg	-9,9	3,5	0,009934	-17,1	-2,6
	350mg/kg	-29,7	3,5	4,06E-08	-36,9	-22,4
Furosemida 20 mg/kg	Blanco	55,2	3,5	8,16E-13	47,9	62,4
	150 mg/kg	61,5	3,5	1,06E-13	54,3	68,7
	250mg/kg	45,3	3,5	3,03E-11	38,0	52,5
	350 mg/kg	25,5	3,5	4,24E-07	18,2	32,7
<i>Calceolaria engleriana</i> 150 mg/kg	Blanco	-6,3	3,5	0,082543	-13,6	0,9
	Furosemida	-61,5	3,5	1,06E-13	-68,7	-54,3
	250 mg/kg	-16,2	3,5	0,000145	-23,5	-9,0
	350 mg/kg	-36,0	3,5	1,67E-09	-43,3	-28,8
<i>Calceolaria engleriana</i> 250mg/kg	Blanco	9,9	3,5	0,009934	2,6	17,1
	Furosemida	-45,3	3,5	3,03E-11	-52,5	-38,0
	150mg/kg	16,2	3,5	0,000145	9,0	23,5
	350mg/kg	-19,8	3,5	1,38E-05	-27,0	-12,6
<i>Calceolaria engleriana</i> 350 mg/kg	Blanco	29,7	3,5	4,06E-08	22,4	36,9
	Furosemida	-25,5	3,5	4,24E-07	-32,7	-18,2
	150 mg/kg	36,0	3,5	1,67E-09	28,8	43,3
	250mg/kg	19,8	3,5	1,38E-05	12,6	27,0

ANEXO N° 13



Fotografía N° 08: Imagen del análisis de datos por el método de Probits.

TÍTULO: ACTIVIDAD DIURÉTICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS Y FLORES DE *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. “wawillay” en *Cavia porcellus* “cobayo”. Ayacucho – 2008.
AUTOR: COAQUIRA APAZA, Betzabeth Hilda.

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
Actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de <i>Calceolaria engleriana</i> Kranzlin Feddes Repert. “wawillay” administrado en <i>Cavia porcellus</i> “cobayo”?	¿Tendrá actividad diurética el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de <i>Calceolaria engleriana</i> Kranzlin Feddes Repert. “wawillay”?	OBJETIVO GENERAL: Determinar la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de <i>Calceolaria engleriana</i> Kranzlin Feddes Repert. “wawillay” OBJETIVOS ESPECÍFICOS: - Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios de la <i>Calceolaria engleriana</i> Kranzlin Feddes Repert. “wawillay”. - Conocer la concentración óptima diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de <i>Calceolaria engleriana</i> Kranzlin Feddes Repert. “wawillay”. - Comparar el efecto diurético de <i>Calceolaria engleriana</i> Kranzlin Feddes Repert. “wawillay” en relación con la furosemida. - Determinar la toxicidad por el método de <i>Artemia salina</i> .	La <i>Calceolaria engleriana</i> Kranzlin Feddes Repert., es un subarbuto de tallos rojizos marrones, pertenece a la familia Scrophulariaceae comúnmente conocida como “wawillay”. La planta es muy usada en la medicina tradicional como digestivo, estimulante, antiulcerosos, diuréticas, resfrío y tos; se usan en forma de infusión toda la planta. Algunos indican su actividad antibiótica así como para el tratamiento de la piel. Los diuréticos son fármacos que tienen una acción farmacológica, la regulación de los líquidos corporales del cuerpo y así también de otras enfermedades como hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca aguda y crónica. Los diuréticos son fármacos que actúan sobre el riñón y así provocan un aumento de volumen de orina excretada.	El extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de <i>Calceolaria engleriana</i> Kranzlin Feddes Repert. “wawillay” presenta actividad diurética en <i>Cavia porcellus</i> “cobayo”.	Variable independiente: Concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de <i>Calceolaria engleriana</i> Kranzlin Feddes Repert. “wawillay”. Indicadores: - 150mg/kg. - 250mg/kg. - 350mg/kg. Variable dependiente: Actividad diurética. Indicadores: - Porcentaje de excreción volumétrica urinaria	Tipo de investigación: Básico – Experimental Población: Hojas y flores de <i>Calceolaria engleriana</i> Kranzlin Feddes Repert. “wawillay” fueron recolectadas en el distrito de Sancos de la provincia de Huancá sancos del departamento de Ayacucho a una altura de 3408 m.s.n.m. Muestra: 2 kg. de las hojas y flores de <i>Calceolaria engleriana</i> Kranzlin Feddes Repert. “wawillay”. Unidad experimental 25 <i>Cavia porcellus</i> “cobayos” de la misma edad de 400 – 600g de peso, obtenidos de INIA, Equipo: Jaula de diuresis Actividad diurética Se dejan en ayunas unas 12 horas antes de la prueba, si ser privadas de agua, se les administró por vía oral mediante una sonda gástrica 50ml/kg de peso una solución de cloruro de sodio 0.9% y se colocó en una jaula de diuresis. Después de 15 minutos de hidratación se les pesó y se les administró la concentración del extracto a dosis de 150, 250 y 350 mg/kg y se les coloca en la jaula de diuresis, recolectando a partir de ese momento la orina cada hora por un periodo de cuatro horas. Determinación de la toxicidad en Artemia salina Análisis estadístico Los datos obtenidos se presentan en cuadros, gráficos y fueron sometidos al análisis de varianza (ANVA) a un nivel de confianza del 95% (p < 0,05), el área bajo la curva volumen-tiempo. Para determinar la CL ₅₀ en la prueba de <i>Artemia salina</i> se utilizó el método de PROBITs.

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R. D. N° 066 – 2011 – FCB – D

Bach. BETZABETH HILDA COAQUIRA APAZA

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del día viernes quince de abril del dos mil once en el auditorio número uno del patio de “La Higuera” de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga reunidos los miembros de sustentación de tesis presidida por el Maestro **Elmer Avalos Pérez**, en calidad de Decano de la Facultad de Ciencia Biológicas y con la asistencia de los docentes miembros Magister **Enrique Javier Aguilar Felices**; Magister **José Manuel Diez Macavilca**; Magister **Marco Rolando Aronés Jara** (Asesor) y Químico Farmacéutico **Hugo Roberto Luna Molero** como Cuarto Jurado Calificador, actuando como Secretaria Docente la Magister **Maricela López Sierralta**, para recepcionar la tesis titulada: **Actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Calceolaria engleriana* Kranzlin Feddes Repert. “wawillay” en *Cavia porcellus* “cobayo”. Ayacucho – 2008**, presentado por la Bachiller **Betzabeth Hilda Coaquira Apaza**, con cuya sustentación pretende optar el Título Profesional de Químico Farmacéutica.

Luego de la revisión de la documentación en mesa el Decano apertura el acto de sustentación recomendando a la sustentante sobre el tiempo de sustentación (Máximo cuarenta y Cinco minutos), recomienda además que proceda la exposición y explicación evitando limitarse a “solo” la lectura de las diapositivas: enseguida solicita a la Secretaria Docente **Maricela López Sierralta** para que dé la lectura a la Resolución Decanal N° 066 – 2011 – FCB – D.

Luego autoriza a la sustentante de inicio a la exposición del trabajo de investigación, quien lo realiza en el tiempo correspondiente. Culminada la exposición el Decano apertura la segunda etapa en la que los miembros de Jurado Calificador, realizarán las observaciones, preguntas y evaluación correspondiente, iniciando su participación el profesor **Hugo Luna Molero**, luego los profesores **Enrique Aguilar** y **José Diez Macavilca**, y finalmente el profesor **Marco Aronés** en calidad de Asesor.

Luego el Decano solicita a la sustentante y publico en general abandonar el auditorio para que el Jurado Calificador pueda deliberar y calificar como sigue:

JURADO CALIFICADOR	EXPOSICIÓN	RPTA	PREGUNTAS	PROMEDIO
Mg. Enrique Javier AGUILAR FELICES	16	16	16	16
Mg. José Manuel DIEZ MACAVILCA	16	16	16	16
Mg. Marco Rolando ARONÉS JARA	17	17	17	17
Q.F. Hugo Roberto LUNA MOLERO	18	17	17	18

De la calificación obtenida, la sustentante obtiene la calificación promedio de **DIECISIETE (17)** de lo cual dan Fe los miembros estampando su firma al pie de la presente.

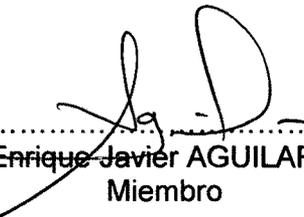
Concluye la sustentación siendo las seis de la noche.



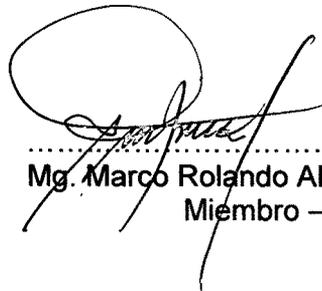
M.S. Elmer AVALOS PÉREZ
Presidente



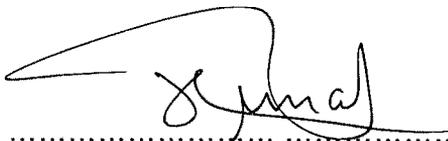
Mg. José Manuel DIEZ MACAVILCA
Miembro



Mg. Enrique Javier AGUILAR FELICES
Miembro



Mg. Marco Rolando ARONÉS JARA
Miembro – Asesor



Q.F. Hugo Roberto LUNA MOLERO
Cuarto Jurado



Mg. Maricela LOPEZ SIERRALTA
Secretaria Docente