



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional

Esta licencia permite a otras combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial, siempre y cuando den crédito y licencia a nuevas creaciones bajo los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" DE ICA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“Efecto broncodilatador y evaluación de la toxicidad aguda
del extracto etanólico de las flores de *Clerodendron fragrans*
Brocamelia”**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

PRESENTADO POR:

BACH. MATTA MAVILA, Jackeline Lisset

BACH. RAMOS ANGULO, Karen Tatiana

ASESORES:

Dra. Chávez Orellana Haydeé

Mg. Torres Véliz Ernesto

Dra. Molina Cabrera Aura

ICA – PERÚ

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" DE ICA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“Efecto broncodilatador y evaluación de la toxicidad aguda
del extracto etanólico de las flores de *Clerodendron fragrans*
Brocamelia”**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

PRESENTADO POR:

**BACH. MATTA MAVILA, Jackeline Lisset
BACH. RAMOS ANGULO, Karen Tatiana**

ASESORES:

**Dra. Chávez Orellana Haydeé
Mg. Torres Véliz Ernesto
Dra. Molina Cabrera Aura**

ICA – PERÚ

2015

Agradecimientos

En principio, queremos agradecerle a Dios por ser nuestra fortaleza en los momentos de debilidad.

A nuestros padres por ser fuente de apoyo constante e incondicional.

A nuestros asesores por su dedicación, paciencia y motivación, y por plasmar sus conocimientos en nosotras para hacer posible la realización del presente trabajo.

Dedicatoria:

A mis padres por ser el pilar fundamental en toda mi formación académica y personal, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

A mi abuela Mechita porque su sabiduría influyó en el cumplimiento de mis objetivos.

Jackeline Matta Mavila

Dedicatoria:

A mi madre y hermanos por ser ejemplos de lucha y dedicación constante.

A todos aquellos quienes me brindaron su apoyo incondicional y alentaron la realización y culminación del presente trabajo.

Karen Ramos Angulo

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ASPECTOS GENERALES	4
2.1	ANTECEDENTES	5
2.2	ESPECIE EN ESTUDIO: <i>Clerodendron fragrans</i>	7
2.2.1	Etimología y Sinonimia	7
2.2.2	Taxonomía	7
2.2.3	Descripción morfológica	8
2.2.4	Ecogeografía	8
2.2.5	Información etnomedicinal	8
2.2.6	Histología vegetal	9
	A. Meristemos	9
	B. Parénquima	9
	C. Tejidos vegetales de protección	9
	D. Tejidos vegetales de sostén	10
	E. Tejidos conductores	10
2.2.7	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)	11
	A. Definición	11
	B. Signos y síntomas	11
	C. Tratamiento	12
2.2.8	ASMA BRONQUIAL	12
	A. Definición	12
	B. Mecanismo del asma	13
	C. Signos y síntomas	14
	D. Tratamiento	14

2.2.9	LA HISTAMINA Y EL ASMA BRONQUIAL	15
2.2.10	MECANISMO DE LA ACCIÓN BRONCODILATADORA EN EL MUSCULO LISO	15
2.2.11	ESTUDIOS DE TOXICIDAD	18
	A. Toxicidad aguda	19
III.	PARTE EXPERIMENTAL	19
3.1	MATERIALES	20
3.2	MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS	21
3.2.1	ESTUDIOS HISTOLÓGICO VEGETAL	21
	A. Cortes Histológicos	21
	B. Reacciones Microquímicas	22
3.2.2	ESTUDIO FITOQUÍMICO	23
	A. Recolección y secado de la especie en estudio	23
	B. Obtención del extracto etanólico	24
	C. Screening Fitoquímico	24
3.3	ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS	30
3.3.1	Evaluación del Efecto Broncodilatador	30
	A. Animales de experimentación	30
	B. Determinación del Efecto Broncodilatador	30
3.3.2	Estudio toxicológico	32
	A. Evaluación de la toxicidad aguda	32
	B. Animales de experimentación	32
	C. Prueba límite	33

IV	RESULTADOS	36
4.1.	Resultado del estudio fitoquímico	37
4.2.	Resultado del efecto broncodilatador	38
4.3.	Resultado de toxicidad aguda	41
4.4.	Resultados del estudio histopatológico	42
4.5.	Resultados del estudio histológico vegetal	43
4.6.	Resultado de las pruebas microquímicas	53
V.	DISCUSIÓN	54
VI.	CONCLUSIONES	58
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
VIII.	ANEXOS	66

RESUMEN

Se realizaron estudios experimentales con el objeto de determinar el efecto broncodilatador y evaluar la toxicidad aguda del extracto etanólico de flores de *Clerodendron fragrans* "Brocamelia" reconocida por sus importantes propiedades farmacológicas; asimismo se buscó identificar mediante un screening fitoquímico los posibles grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto.

El efecto broncodilatador se determinó mediante el método de asma bronquial experimental inducido por histamina *in vivo* en cobayos machos tipo Hartley. El extracto se aplicó a una concentración de 25% a dosis de 100, 200 y 400 mg/kg, los resultados obtenidos en la prevención del shock histaminérgico, demuestran una protección significativa a dosis más altas, ofreciendo un grado máximo de protección de 48,61%. Asimismo los resultados demuestran la reversión del shock histaminérgico segundos después de instaurado; por tanto, el extracto ofrece una inhibición del 100%. Para evaluar el posible efecto tóxico, se empleó el procedimiento de dosis límite a 2000 mg/Kg y 5000 mg/Kg, administradas por vía orogástrica, realizándose observaciones durante 14 días. Los animales seleccionados fueron ratas Holtzman hembras con pesos comprendidos entre 200-250g. No se produjeron signos relacionados de toxicidad o mortalidad en ninguno de los animales ensayados, lo que permite afirmar que la DL50 se ubica por encima de 5000 mg/Kg. Es así que los resultados demostraron la inocuidad de la planta.

En el screening fitoquímico se identificaron taninos, aminoácidos, flavonoides, alcaloides, catequinas, triterpenos y esteroides.

Palabras clave: *Clerodendron fragrans*, histamina, broncoconstricción, shock histaminérgico, toxicidad, screening fitoquímico.

ABSTRACT

Experimental studies were conducted in order to determine the bronchodilator effect and evaluate acute toxicity of the ethanol extract of flowers of *Clerodendron fragrans* "Brocamelia" known for its important pharmacological properties; also sought to identify by a phytochemical screening possible groups of secondary metabolites present in the extract.

The bronchodilator effect was determined by the method of experimental bronchial asthma induced by histamine in vivo in guinea pigs Hartley male type. The extract was applied at a concentration of 25% at doses of 100, 200 and 400 mg / kg, results in preventing shock histaminergic demonstrate significant protection at higher doses, providing maximum protection of 48, 61%. Also the results show the reversal of shock histaminergic seconds after established; therefore extract offers a 100% inhibition.

To evaluate the toxic effect, the procedure was used to limit dose 2000 mg / kg and 5000 mg / kg, administered by orogastric route, performing observations for 14 days. The selected animals were female Holtzman rats weighing between 200-250g. There were no related toxicity or mortality in any of the animals tested signs. Body weight behaved according to the growth curve of the species and no macroscopic changes in the studied organs were observed, all that can be said that the LD50 is above 5000 mg / kg. Thus, the results demonstrated the safety of the phytochemical screening planta. En el screenig, amino acids, flavonoids, alkaloids, catechins, triterpenes and steroids were identified.

Keywords: *Clerodendron fragrans*, histamine, bronchoconstriction, histaminergic shock, toxicity, phytochemical screening

I. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han acompañado la evolución del hombre e históricamente han estado ligadas a la forma de curar ancestralmente, eran veneradas por las virtudes que se les había reconocido. El conocimiento de las drogas vegetales ha sido profundo y ampliamente difundido en los pueblos desde los tiempos más antiguos hasta la fecha en que vienen siendo utilizados para satisfacer las necesidades básicas de salud.

La medicina natural, de gran uso tradicional en nuestro país, es una fuente importante de metabolitos secundarios con propiedades terapéuticas. Ello sería de gran utilidad debido al aumento de diversas enfermedades entre ellas el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) que actualmente afectan a un porcentaje relevante de la población mundial; 235 millones de personas padecen de asma en el mundo, 90% de las muertes por EPOC se producen en países de bajos y medianos ingresos.^{1,2}

En el Perú un 31.2% de la población sufre de afecciones respiratorias, siendo las enfermedades del sistema respiratorio la primera de las diez causas de mortalidad en el departamento de Ica, alcanzando un porcentaje de 30.22%.³

Hoy se sabe que las plantas medicinales constituyen una valiosa alternativa terapéutica y la introducción de las mismas en la medicina natural debe efectuarse sobre una base científica que valide tanto sus acciones farmacológicas como su toxicidad. Una de estas especies de la flora medicinal iqueña es *Clerodendron fragrans*, cuyo nombre vulgar es “Brocamelia”, la cual es utilizada popularmente en el tratamiento de afecciones respiratorias, y crece en la provincia de Ica, departamento de Ica, distrito de Los Molinos, en los caseríos Chavalinas y los Romanes.⁴

Con el objetivo de validar el uso tradicional de esta especie, nos planteamos los siguientes problemas:

¿Presenta efecto broncodilatador el extracto etanólico de las flores de *Clerodendron fragrans*?

¿Presenta toxicidad aguda el extracto etanólico de las flores de *Clerodendron fragrans* a las dosis estudiadas?

El interés de esta investigación radica en validar un método científico que justifique el uso que se atribuye a esta planta en la medicina popular, para lo cual nos planteamos el objetivo de evaluar la actividad broncodilatadora en el extracto etanólico de flores de la especie en estudio. Y también obtener información sobre la toxicidad aguda oral en ratas hembras del extracto etanólico elaborado a partir de la *C. fragrans*, así como la estimación de la toxicidad aguda tras la administración por vía orogástrica a dosis límite del producto.

II. ASPECTOS GENERALES

2.1 Antecedentes:

No existen estudios sobre la actividad broncodilatadora de la especie *Clerodendron fragrans* ni sobre la toxicidad aguda de la misma.

Sin embargo existen investigaciones de otras especies en relación a la actividad que queremos demostrar:

2.1.1 Antecedentes internacionales:

- Hazekamp A. et al, 2001. Aislaron un flavonoide broncodilatador de la planta medicinal tailandesa *Clerodendrum petasites*. El extracto etanólico se ensayó para evaluar la actividad espasmolítica en el músculo blando traqueal de cobayo. El extracto crudo (2,25 a 9,0 mg/ml) causó, de forma dependiente de la dosis, relajación del músculo liso traqueal que era contraído por la exposición a la histamina.⁵
- Figueredo Y. et al, 2004. Estudiaron el posible efecto del extracto acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. sobre la anafilaxia pasiva cutánea, espasmo y tonicidad bronquial. Como resultado de este trabajo se encontró que el extracto acuoso liofilizado de la especie no presentó efecto protector del espasmo bronquial inducido por histamina, tampoco demostró propiedades broncodilatadoras en el modelo farmacológico empleado.⁶
- Maruga M. et al, 2010. Realizaron un examen amplio de *Clerodendrum phlomidis*, utilizado tradicionalmente como tónico amargo para las terapias populares del asma, la diabetes, el reumatismo, etc. En la investigación se validó su uso tradicional y los efectos observados experimentalmente de los extractos.⁷
- Yeboah A. et al, 2011. Evaluaron el extracto metanólico de las hojas de *Abrus precatorius* mediante el uso de diversos modelos in vivo e in vitro en los conejillos de indias, para este estudio se empleó el método de

broncoconstricción inducida por histamina. El extracto ofrece un grado máximo de protección de 41,62%, que era comparable a la de salbutamol 47,52%. El extracto exhibió un efecto máximo de relajación contra histamina y la contracción inducida por la acetilcolina a una concentración de 100mg/ml. ⁸

- Thounaojam J. et al, 2011. Evaluaron los efectos toxicológicos y potencial efecto hepatoprotector del extracto acuoso de las hojas de *Clerodendron glandulosum.Coleb* (CG). Las pruebas de toxicidad aguda y subcrónicas se realizaron según la directriz de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD). Las pruebas de toxicidad revelaron que el extracto de CG no es tóxico y el valor de su dosis letal media LD50 es mayor a 5000 mg/kg de peso corporal. ⁹
- Ávila J. et al, 2011. Estudiaron la evaluación de la toxicidad aguda a dosis fijas del extracto de *Werneria dactylophylla* (pupusa) Para el desarrollo del mismo se utilizó el procedimiento de dosis fijas, utilizando dosis límite de 2000 mg/Kg y 5000 mg/Kg de peso corporal, administradas por vía orogástrica, realizándose observaciones durante 14 días. Los resultados demostraron la inocuidad de la planta al no observarse signos ni síntomas de toxicidad. ¹⁰

2.1.2 Antecedentes nacionales:

- Gorriti A. et al, 1999. Lograron extraer e identificar de las especies *Werneria apiculata* y *Werneria marcida* SF Blake de la familia Asteraceae: azúcares reductores (glucosa, levulosa), goma, mucílagos, taninos catéquicos, esteroides, glicósidos fenólicos, flavonoides, alcaloides. Los ensayos practicados a ambas especies demostraron que *W. apiculata* presenta mayor actividad bronco-dilatador y antiinflamatorio de *W. marcida*. ¹¹

2.2. Especie en estudio: *Clerodendron fragrans*

2.2.1 Etimología y Sinonimia

Clerodendron: nombre genérico que deriva de las palabras griegas: *kleros* = (clero) y *dendron* = (árboles), fue acuñado por Linnaeus que se enteró de que las plantas estaban en uso por el clero de la población de Sri Lanka.

Sinonimia científica: *Clerodendron philippinum*, *Clerodendron fragrans* var. *Multiplex* Sweet, *Clerodendron philippinum* fo. *Multiplex* (Sweet) Mold, *Volkameria fragrans* Vent, *Volkameria japónica* Jacq.

Sinonimia vulgar: “brocamelia”, “brinco de dama”¹²

2.2.2 Taxonomía

Una muestra de la especie vegetal en estudio fue analizada en el herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Mayor de San Marcos, para su clasificación taxonómica, la cual fue realizada por la Dra. Haydee Montoya, según el sistema de clasificación de Cronquis (1988). (Ver anexo N°01)

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub clase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Verbenaceae

Género: *Clerodendron*

Especie: *Clerodendron fragrans* (vent.) Will.

Nombre vulgar: “Brocamelia”

2.2.3 Descripción morfológica

Son arbustos que alcanzan un tamaño de hasta 2 m de alto. Hojas ovadas, 6–25 cm de largo y 4–18 cm de ancho, márgenes ásperamente serrados, pubescente en ambas superficies; pecíolos 2–12 cm de largo. Inflorescencias cimosas, pedúnculos 0–2 cm de largo; cáliz 1–1.5 cm de largo; corola a menudo doble de color blanca a rosada; estambres y pistilos a menudo modificados en pétalos supernumerarios.¹³

2.2.4 Ecogeografía

A. *Características edáficas:*

- **Suelos:** arcilloso, limo-arcilloso, franco-limo-arcilloso.
- **Hábitat:** en América cálida y tropical, con frecuencia en jardines, bordes de acequia, bajo la sombra protectora de los árboles, en lugares sombríos y húmedos.¹⁴

B. *Características fitogeográficas:*

- **Distribución altitudinal:** 100-500 msnm.
- **Distribución latitudinal:** 6° - 14° L.S.
- **Distribución por departamentos:** Lambayeque, San Martín, La Libertad, Ancash, Ica, Lima, Loreto.¹⁴

2.2.5 Información etnomedicinal⁴

- A. Parte usada de la planta: hojas y flores.
- B. Forma de preparación: cocimiento.
- C. Uso medicinal: bronquitis y tos convulsiva.

2.2.6 Histología vegetal

A. *Meristemos*

Los meristemos son los responsables del crecimiento permanente de las plantas y están presentes durante toda la vida de éstas. La clasificación de los meristemos se realiza en base a su posición en el cuerpo de la planta.

Los meristemos primarios son los responsables del crecimiento en longitud de la planta.

Los meristemos secundarios son los responsables del crecimiento del espesor de la planta, también llamados meristemos laterales. Estos meristemos no existen en determinados órganos como las hojas.

B. *Parénquima:*

El parénquima es un tejido poco especializado implicado en una gran variedad de funciones como la fotosíntesis, el almacenamiento, la elaboración de sustancias orgánicas y la regeneración de tejidos.

C. *Tejidos vegetales de protección:*

Los tejidos de protección forman la parte más externa de los órganos de las plantas y se encuentran en contacto con el medio ambiente.¹⁵

- Epidermis

Durante el crecimiento primario de la planta la epidermis constituye el tejido de protección de tallos, hojas, raíces, flores, frutos y semillas. En la epidermis se encuentran: los estomas que son células epidérmicas especializadas que se organizan para dejar una abertura u ostiolo entre ellas a través del cual se pone en contacto el medio interno de la planta con el

exterior; y los tricomas o pelos que son células epidérmicas especializadas que se alargan y/o proliferan. Pueden ser de protección o glandulares.

- **Peridermis**

Estructuralmente está formada por tres capas: felógeno, suber y felodermis. La capa inicial es el felógeno. Las células del súber sufren engrosamiento secundario de su pared por depósito de suberina, por lo que mueren, disponiéndose de manera muy compacta para formar una barrera infranqueable al agua y a los gases. Por el contrario, las células de la felodermis son células vivas.¹⁵

D. Tejidos vegetales de sostén

- **Colénquima**

Es un tejido vivo formado por un solo tipo celular, la célula colenquimática que le confiere al tejido gran resistencia a la tensión y a otros tipos de estrés mecánico, se sitúa en posiciones periféricas, donde realiza mejor su función.

- **Esclerénquima**

Tiene una función muy importante en el soporte de los órganos que han dejado de alargarse. Protegen las partes más blandas de las plantas y más vulnerables a estiramientos, pesos, presiones y flexiones.¹⁵

E. Tejidos conductores

Están formados por el xilema y el floema. El xilema conduce grandes cantidades de agua y algunos compuestos inorgánicos y orgánicos desde la raíz a las hojas, mientras que el floema conduce sustancias orgánicas producidas en los lugares de síntesis, fundamentalmente en las hojas, y en los de almacenamiento al resto de la planta.

2.2.7 Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

A. Definición

La EPOC se define como una enfermedad prevenible y tratable caracterizada por una limitación crónica y poco reversible al flujo aéreo. Esta limitación del flujo aéreo es por lo general progresiva y está asociada a una reacción inflamatoria anómala a partículas nocivas o gases, principalmente al humo de tabaco.¹⁶

Es un importante problema de salud pública y la mayor causa de morbilidad crónica, las proyecciones al 2020 ubican a esta entidad pasando de la sexta a la tercera causa más común de mortalidad en el mundo.¹⁷

Se estima que es aproximadamente del 1%, pero se eleva bruscamente a más del 10% en la población mayor de 40 años, subiendo sensiblemente con el incremento de la edad. Según el estudio del Proyecto Latinoamericano de Investigación en Obstrucción Pulmonar (PLATINO) la prevalencia de EPOC en países latinoamericanos es de 15,8%.¹⁷

B. Signos y Síntomas

La EPOC se caracteriza con frecuencia por un periodo asintomático por lo que pueden pasar varios años entre la aparición de la limitación al flujo aéreo y el desarrollo de las manifestaciones clínicas. La disnea, tos y expectoración son los síntomas cardinales de la EPOC. Cuando la enfermedad progresa, aumentan en intensidad.¹⁸

C. Tratamiento¹⁹

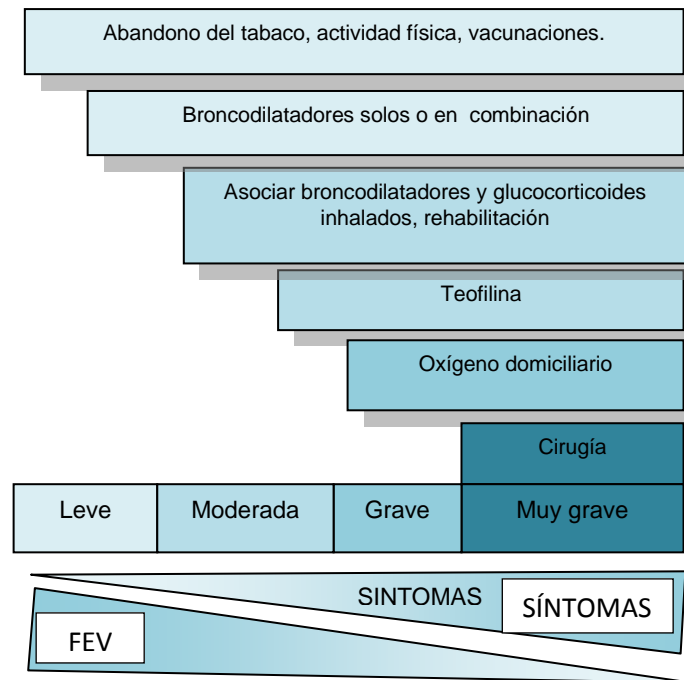


Fig N° 01. Tratamiento de la EPOC

*FEV Volumen Espiratorio Máximo

Tomado de www.mundoepoc.com, 2014.

2.2.8 Asma bronquial

A. Definición

Es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas que evoluciona en forma de episodios recurrentes de obstrucción bronquial. La característica predominante de la historia clínica es la falta episódica de aliento, especialmente durante la noche, a menudo acompañada de tos, intercalado con períodos asintomáticos más o menos prolongados.²⁰

La OMS calcula que en la actualidad hay 235 millones de pacientes con asma. Es una enfermedad de alta prevalencia, que causa morbilidad y mortalidad, ha llegado a ser una de las enfermedades crónicas más comunes en el mundo y en la población infantil.²¹

Las muertes por asma aumentarán en casi un 20% en los próximos 10 años si no se toman medidas urgentes. El asma no se cura, pero con un diagnóstico y tratamiento adecuado y la educación de paciente se puede lograr un buen control de la enfermedad.²

B. Mecanismo del asma

Múltiples células inflamatorias son reclutadas y activadas en las vías aéreas, donde liberan varios mediadores inflamatorios, que también pueden surgir a partir de células estructurales. Estos mediadores causan broncoconstricción, exudado plasmático, edema, vasodilatación, hipersecreción de moco y la activación de los nervios sensoriales. La inflamación crónica conduce a cambios estructurales, incluyendo la fibrosis subepitelial (engrosamiento de la membrana basal), hipertrofia e hiperplasia del músculo liso bronquial, angiogénesis e hiperplasia de las células secretoras de moco.²²

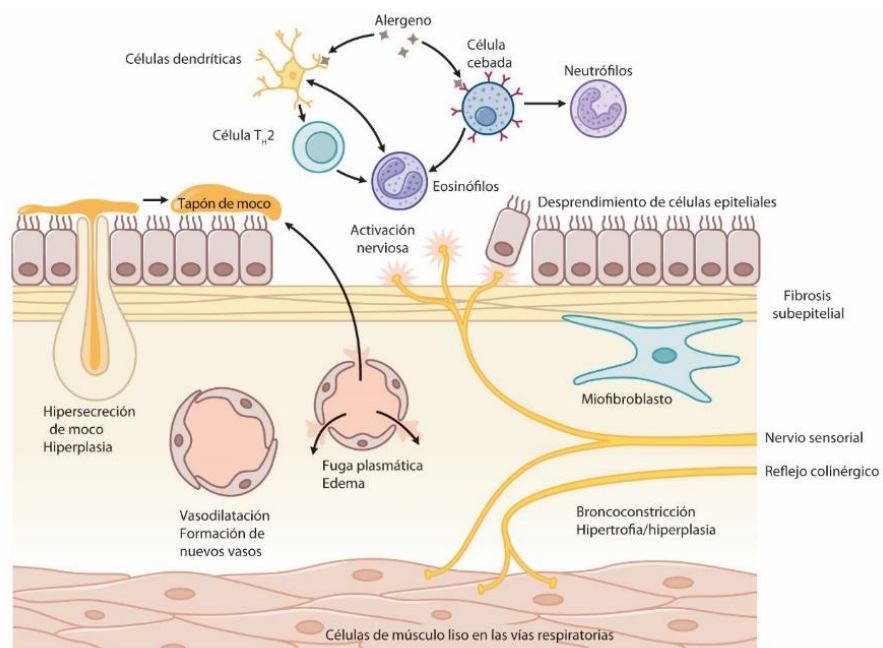


Fig N° 02. Mecanismo del asma

C. Signos y síntomas

Es habitual un empeoramiento de los síntomas durante la noche y las primeras horas de la mañana. La tos nocturna es un síntoma frecuente sobre todo en los niños. Las sibilancias episódicas y la disnea son casi universales.²⁰

Los síntomas característicos del asma son: disnea, sibilancias, tos y opresión torácica

D. Tratamiento del asma bronquial²³

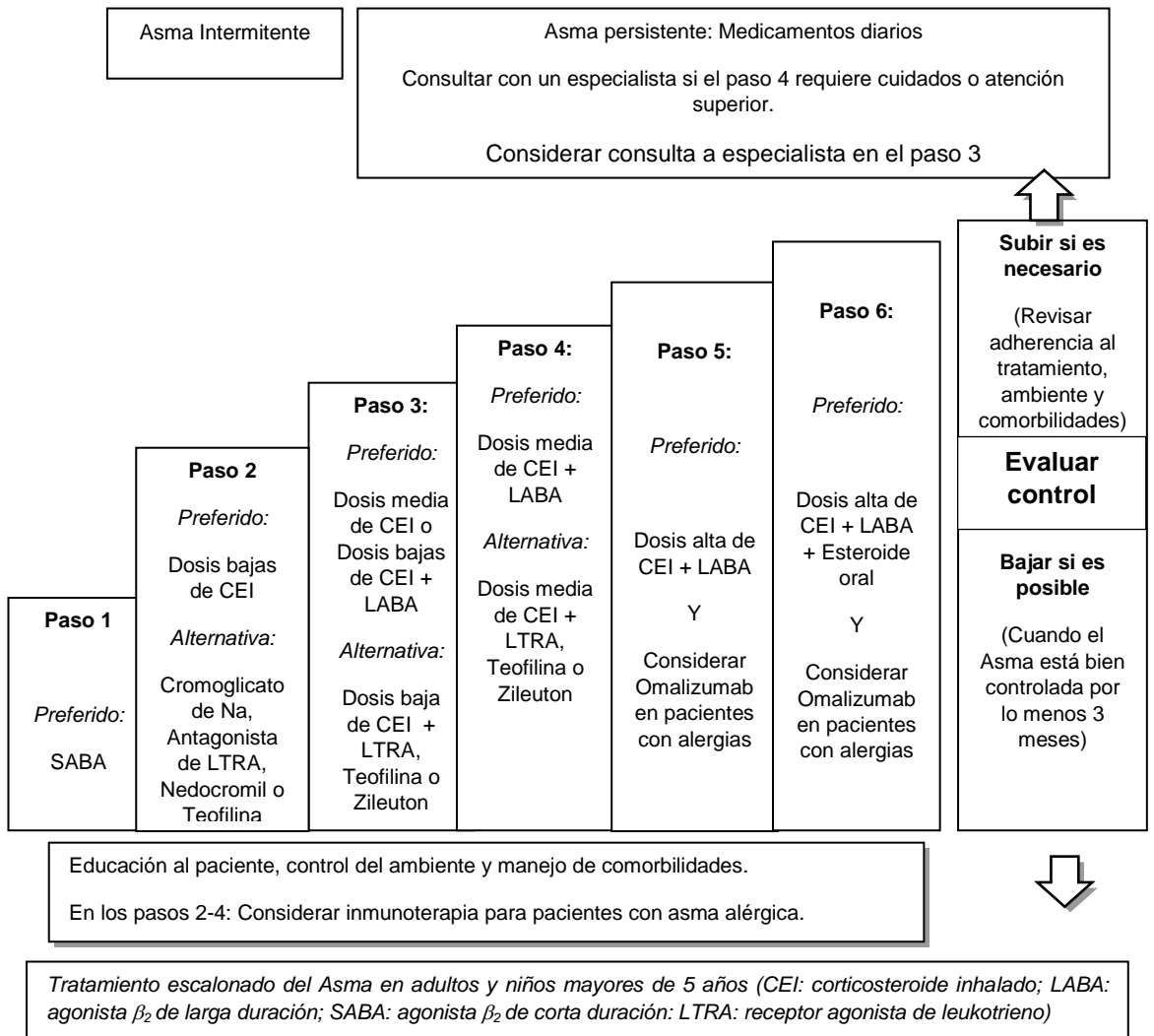


Fig N° 03. Tratamiento del asma

Tomado de Wells B. et al. Pharmacotherapy Hadbook, 2015.

2.2.9 La histamina y el asma bronquial

Un mediador celular que influye como desencadenante del asma es la histamina produciendo broncoconstricción, edema de la mucosa y secreción de moco. Se encuentra almacenada principalmente en los mastocitos del tejido conjuntivo y en las células basófilas de la sangre.²⁴

La histamina ejerce sus efectos fisiológicos por interacción con, al menos, tres tipos de receptores específicos, denominados H₁, H₂, H₃. Así, la estimulación de los receptores H₁ es responsable del desencadenamiento de los fenómenos de tipo alérgico, caracterizados fundamentalmente por broncoconstricción, aumento de secreciones y aumento de la permeabilidad capilar. La estimulación de los receptores H₂ es responsable del aumento de la secreción gástrica y los receptores H₃ se localizan fundamentalmente en el sistema nervioso central²⁵. La estimulación del receptor H₁ da como resultado la activación de la PLC como consecuencia se produce un incremento del IP₃ y la movilización de Ca⁺⁺ intracelular. Así, en los territorios de músculo liso, la liberación de Ca⁺⁺ genera la activación de la cinasa de la cadena ligera de miosina calmodulina-dependiente.²⁶

2.2.10 Mecanismo broncodilatador en el musculo liso.

A. Activación de los receptores β₂:

Existen abundantes receptores β₂- distribuidos por el músculo liso de las vías aéreas de grueso y pequeño calibre (desde la tráquea hasta los bronquiolos terminales), así como en el epitelio traqueobronquial, las glándulas submucosas, el músculo liso vascular y las paredes alveolares. Su activación origina broncodilatación, vasodilatación, inhibición de la liberación de mediadores, aumento del aclaramiento mucociliar, etc

Al activarse los receptores β adrenérgicos relajan la musculatura lisa bronquial mediante la activación de la adenililciclasa y la elevación del AMPc intracelular. Este mecanismo tiene una doble consecuencia. En primer lugar, la activación de la proteína-quinasa A y la fosforilación de la cinasa de la cadena ligera de miosina, la cual, fosforilada, es inactiva ya que pierde afinidad por el complejo Ca^{2+} -calmodulina. En segundo lugar, la disminución del Ca^{2+} libre intracelular por tres posibles mecanismos: secuestro en organelas, inhibición de la entrada e incremento de la salida. La consecuencia será una menor formación del complejo Ca^{2+} -calmodulina. En ambas circunstancias habrá una menor fosforilación de la miosina y un menor acoplamiento actina-miosina. En consecuencia se producirá relajación de todas las vías aéreas, desde la tráquea hasta los bronquiolos terminales.²⁷

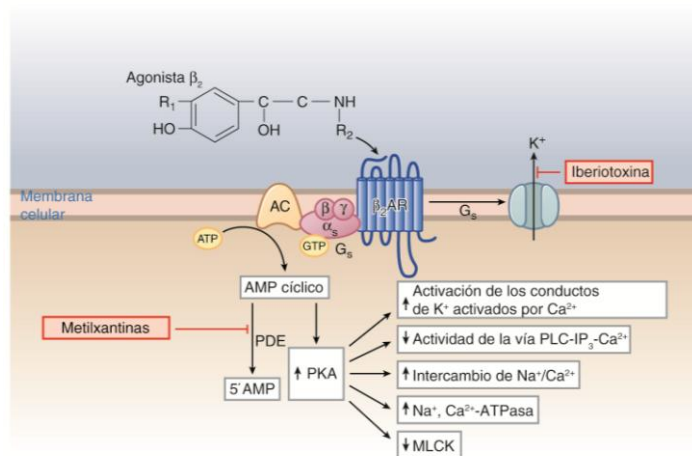


Fig N° 04. Acciones moleculares de β_2 agonistas para inducir la relajación de las células de músculo liso bronquial.

B. Metilxantinas

Teofilina: Parece producir broncodilatación a través de la inhibición no selectiva de fosfodiesterasa. Las metilxantinas son inefectivas en aerosol,

por ello deben tomarse por vía oral o intravenosa, de liberación sostenida, es la preparación oral preferida.²⁸

C. Bloqueo de receptores muscarínicos

La principal inervación vegetativa de las vías aéreas en la especie humana es de tipo parasimpático; las fibras eferentes vagales preganglionares entran en el pulmón a través de los hilios, viajan a lo largo de las vías aéreas y terminan en los ganglios parasimpáticos de las paredes de los bronquios. Las terminaciones posgangliónicas suplen a la musculatura lisa y las glándulas submucosas de las vías aéreas y a estructuras vasculares. La liberación de acetilcolina origina contracción de la musculatura lisa y secreción de las glándulas submucosas, mediante la activación de receptores muscarínicos. El bloqueo de los receptores M3 producen relajación de la musculatura bronquial.²⁷

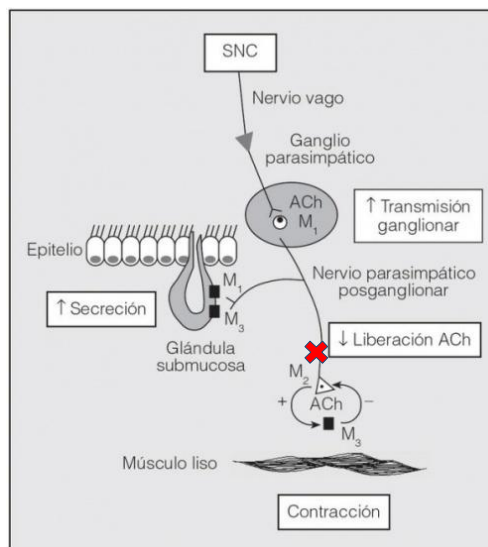


Fig N° 05. Bloqueo de receptores muscarínicos

2.2.11 Estudios de Toxicidad

Los estudios de toxicidad están diseñados para obtener la mayor información posible sobre los efectos adversos que pueden tener lugar bajo exposiciones normales o accidentales a sustancias químicas.

A. Toxicidad aguda

La toxicidad aguda de una sustancia química se refiere a los efectos adversos que se manifiestan tras la administración por vía oral o cutánea de una sola dosis de dicha sustancia.²⁹

La toxicidad aguda tiene por objetivo determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia. Usualmente, el punto final del estudio es la muerte del animal y la toxicidad aguda se expresa por la dosis letal 50, que viene a representar más o menos la dosis de la sustancia que produce la muerte en el 50% de los animales.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES

3.1.1 Animales de experimentación

- Cobayos tipo Hartley machos procedentes del Instituto Nacional de Salud.
- Ratas Holtzman hembras procedentes del Instituto Nacional de Salud.

3.1.2 Material botánico

- Flores de *Clerodendron fragrans*

3.1.3 Material de laboratorio

- Peras de bromo
- Pipetas volumétricas
- Probetas
- Viales
- Balones
- Agitadores de vidrio
- Vasos de precipitado
- Tubos de ensayo
- Pinzas para tubos de ensayo
- Gradillas
- Pinzas de metal
- Espátulas de metal
- Vasos de vidrio
- Embudos
- Luna de reloj
- Papel de filtro
- Papel de aluminio
- Soporte universal
- Aro de soporte
- Matraz
- Varillas de vidrio
- Materiales quirúrgicos

3.1.4 Reactivos y fármacos

- Etanol de 96°
- Suero fisiológico
- Histamina
- Adrenalina
- Fenobarbital
- Formol, etc.

3.1.5 Equipos

- Balanza
- Estufa
- Evaporador rotario
- Cámara de nebulización

3.1.6 Otros

- Jeringas de 1, 3 y 5 ml
- Sondas nasogástricas

3.2 Métodos y procedimientos

3.2.1 Estudios histológico vegetal

A. Cortes Histológicos

Para los estudios histológicos de las hojas, tallos, flores y peciolo de la especie *Clerodendron fragrans*, se realizaron cortes muy finos transversales empleando la técnica de la medula del sauco.

Se obtuvieron preparaciones microscópicas las cuales se observaron en microscopio óptico.

Corte: Para las hojas y pétalos de las flores (órgano vegetal plano), se colocó entre las dos mitades de un cilindro de medula de sauco; para el tallo y peciolo que son cilíndricos se hizo un surco en una de las mitades de la medula de sauco y se coloca en él. Los cortes se realizaron con una hoja de afeitar, colocando papel de aluminio doblado sobre el perfil sobre el que se ejercerá presión con el dedo índice. Los cortes se retiraron con el pincel fino humedecido y se colocaron en una cubeta con agua. Una vez realizado los cortes se colocaron en una lámina porta objetos y se observó en el microscopio con el objetivo de 40X y 10X.

B. Reacciones microquímicas

Las pruebas microquímicas se pueden realizar con material fresco para la determinación de metabolitos primarios y secundarios (Ver anexo N° 02).

- **Alcaloides (Reactivo de Drangendorff)**

Se colocaron los cortes sobre el portaobjetos, y agregó una gota de reactivo.

Se dejó actuar durante algunos minutos.

Ante la presencia de alcaloides aparece un precipitado color rojo ladrillo.

- **Almidón (Reactivo de Lugol)**

Se colocó el corte en el portaobjetos y se agregó una gota de lugol. El almidón se colorea de azul o azul violáceo.

- **Grasas y aceites (Reactivo Sudan III o Sudan IV)**

Se colocaron cortes delgados en el portaobjetos, se agregó una gota del reactivo y se dejó actuar durante 10 minutos, se lavó rápidamente con alcohol de 70°. Las grasas y los aceites se tiñen de color rojo como así también la cutina y la suberina.

- **Mucílagos (Azul de Cresil al 1%)**

Se colocó los cortes en los portaobjetos, se agregó una gota del reactivo.

Los mucilagos se tiñen coloración azul Francia.

- **Oxalato de calcio (Reactivo acetato cúprico)**

Se colocaron los cortes en los portaobjetos y se agregó una gota del reactivo. Los cristales de oxalato de calcio se disuelve y el ácido oxálico que difunden hacia los espacios intercelulares dá color azul.

- **Quitina (Reactivo de Lugol y cloruro de cinc)**

Se colocó el material sobre el portaobjetos y se agregó una gota de Lugol, se dejó actuar durante unos minutos, finalmente se agregó una gota de la

solución saturada de cloruro de cinc. Se lavó bien con agua. La quitina toma color violeta.

- **Saponinas (ácido sulfúrico concentrado)**

Se colocaron los cortes sobre el portaobjetos, se agregó una gota del reactivo. En presencia de saponinas, los cortes toman primero una coloración amarilla, a los 30 minutos rojo y finalmente violeta o azul-verdoso.

- **Taninos (sulfato férrico)**

Se colocaron los cortes sobre el portaobjetos, se agregó una gota del reactivo, se dejó actuar 2-3 minutos y se lavó con agua destilada. Los taninos dan una coloración azul-verdosa.

3.2.2 Estudio fitoquímico

A. *Recolección y secado de la especie en estudio (Ver anexo N° 03)*

El material vegetal (flores) fue recolectado en su hábitat de crecimiento silvestre en la región de Ica, provincia de Ica, distrito de Los Molinos, caserío Chavalinas ubicado a una latitud de 13°57,377´S; altitud de 426 msnm y una longitud de 75°41.972´O en el mes de Diciembre.

Para evitar cualquier tipo de alteración que pudiera afectar a la composición de la planta, inmediatamente después de recolectarla, fue desecada en una habitación lo suficientemente ventilada, alejada de la incidencia directa de los rayos solares (Ver anexo N° 02). Como paso previo para la obtención del extracto, las flores de *Clerodendron fragrans* fueron pulverizadas en molino manual, hasta alcanzar un tamaño de partícula adecuado.

B. Obtención del extracto etanólico

El material seco y molido, se maceró por 20 horas, posteriormente reflujo por 4 horas con etanol de 96° y filtrado en caliente, para ser llevado a sequedad en un evaporador rotatorio a temperatura menor de 45° C, obteniendo 70 g de extracto total.

C. Screening fitoquímico

El tamizaje o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que podrá determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y, a partir de allí, nos permitirá la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje o screening fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración y precipitación. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles y reproducibles.³⁰

a. Obtención de fracciones³⁰

El material seco y molido (50 g la especie en estudio), se maceró por 20 horas con etanol, y fue sometido a reflujo por espacio de 4 horas. Se filtró en caliente, y a este filtrado se llamó **Fracción A**, de la cual se separó 2 ml. para efectuar reacciones de identificación. El resto se concentró a sequedad y presión reducida en una bomba de vacío a una temperatura menor de 45° C. Luego se extrajo con HCl al 1% (2x20 ml), se filtró y se obtuvieron dos partes:

- **Insoluble:** Se lavó hasta pH neutro con agua destilada, seguidamente se disolvió con 5 ml de diclorometano, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y este filtrado constituye la ***Fracción B.***
 - **Solución Ácida:** Se filtró y alcalinizó con hidróxido de amonio, extrayéndose con diclorometano (2 x 25 ml) obteniéndose dos fases:
 - **Fase Diclorometánica:** Se lavó con 10 ml de agua destilada, Luego la fase diclorometánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se obtuvo la ***Fracción C.***
 - **Fase Acuosa:** Se saturó con 5 g de sulfato de sodio anhidro y se extrajo con diclorometano: etanol (3:2) (2 x 25 ml). Obteniéndose dos fases:
 - **Fase Orgánica:** (Diclorometánica-etanólica). Se lavó con solución de sulfato de sodio anhidro (10 ml) reuniendo las fases acuosas. Seguidamente la fase orgánica se deshidrató con 1g de sulfato de sodio anhidro. Se filtró y esto constituye la ***Fracción D.***
 - **Fase Acuosa:** A ésta se adicionó los residuos acuosos obtenidos del lavado de la fase orgánica esto constituyó la ***Fracción E.***
- Sobre estas fracciones se determinaron los metabolitos posibles por reacciones de coloración y precipitación.

b. Detección de grupos funcionales y metabolitos secundarios ³¹

Separada las fracciones se procedió a realizar sobre estas reacciones de coloración o precipitación para identificar grupos funcionales y metabolitos secundarios.

Fracción A

Detección de taninos:

Reacción de Gelatina – Sal.- Se vertió 0.5 ml de extracto sobre 5 ml. de solución de NaCl 5%, gelatina 1% y gelatina-sal, la precipitación con este último reactivo o con ambos el 1° y 2° es indicativo de la presencia de taninos, si solamente ocurre con el 1°, podría ser un falso positivo.

Reacción de Cloruro Férrico.- En un tubo de ensayo se colocó 0.5 mL. de la fracción A y se le agregó una gota de solución acuosa de FeCl₃ 1%.

La reacción es positiva cuando aparecen colores azul-negro, verde o azul verdoso.

Detección de Aminoácidos:

Reacción de Ninhidrina.- Sobre tiras de papel de filtro se colocó con una pipeta capilar:

- a) Una gota de fracción A + una gota del reactivo Ninhidrina al 2%.
- b) Blanco: Solución etanólica de Ninhidrina al 2%.
- c) Testigo: Una gota de solución de metionina 5%.

Luego del secado a temperatura ambiente las tiras de papel se colocaron en una estufa a 110-120° C hasta la aparición de un color en el blanco. Se compara con la mancha azul violácea de la solución testigo.

La reacción es positiva si el papel de la muestra presenta un color azul violáceo.

Detección de Flavonoides:

Reacción de Shinoda.- En una placa se vertieron 3 gotas de la fracción A, 5 limaduras de Mg, y 2 gotas de HCl concentrado. La reacción es positiva cuando aparecen tonos de color rojo, anaranjado y violeta.

Fracción B

Detección de Triterpenos y/o Esteroides:

Reacción de Liebermann Burchard.- Sobre 1 mL de la fracción se vertieron 5 gotas de ácido acético y 3 mL de anhídrido acético/ ácido sulfúrico (50:1).

La reacción es positiva si aparece el color verde, azul verdoso (vías rojo o azul).

Detección de Antraquinonas:

Reacción de Borntrager.- Sobre el resto de la fracción B se agregaron 5 mL. de NaOH 5% y se agitó suavemente.

La reacción es positiva si la fase acuosa toma un color rojo.

Fracción C

Detección de Esteroides y/o Triterpenoides:

Reacción de Liebermann Burchard.

Detección de Cardenólidos

Reacción de Kedde.-

- a) Solución **a**: 3.5- dinitrobenzoico 2% en metanol.
- b) Solución **b**: Hidróxido de potasio 5.7% en agua.
- c) Mezclar **a + b**, volúmenes iguales esto constituye el reactivo.

Se colocó en un tubo de ensayo 1 mg de muestra + 2 gotas del reactivo.

Si la reacción es positiva se formará un color púrpura o violáceo.

Detección de alcaloides:

El resto de la fracción C se evaporó a sequedad y luego se agregó 2 ml de HCl 1% filtrar. Se realizó las reacciones de precipitación, de Dragendorff, Mayer, Hager, Wagner.

La reacción es positiva si aparece un precipitado.

Fracción D

Se evaporó a sequedad y luego se agregó 2.5 ml de etanol, efectuándose las siguientes reacciones:

Detección de Flavonoides: Reacción de Shinoda.

Detección de Leucoantocianidinas y Catequinas:

Reacción de Rosenheim.- A 0.2 ml de la fracción D se agregó 0.1 ml de HCl concentrado, se calentó durante 10 minutos a 100° C. Enfriar, luego se adicionó 2 ml de agua y 0.4 ml de alcohol amílico, se agitó y observó el color en la fase amílica. La reacción se considera positiva si aparece un color que va desde el rosado débil hasta carmesí oscuro.

Si es rojo indica presencia de antocianidinas. Si es marrón indica presencia de catequinas.

Detección de Cardenólidos: Reacción de Kedde.

Detección de Esteroides y/o Triterpenoides: Reacción de Liebermann Burchard.

Detección de Alcaloides: Reacción de Mayer, Dragendorff, Hager y Wagner.

Fracción E

Detección de Flavonoides: Reacción de Shinoda.

Detección de Leucoantocianidinas: Reacción de Rosenheim

Fracción F

A 1 g de droga seca, se le agregó 20 ml de agua destilada, se hirvió durante 15 minutos. Se filtró en caliente, y completó a volumen (10 ml)

Se enfrió, esto constituye la fracción F.

Detección de Saponinas:

Prueba de espuma.- En dos tubos de ensayo se agitaron 2.5 ml de extracto por un minuto. Se dejó reposar 15 minutos y se observó la formación de espuma. Se considera negativa la reacción si la altura de la espuma es menor de 5 mm.

Droga cruda

Detección de Glicósidos Cianogenéticos:

Reacción de Grignard.- Se colocó 1 g del material vegetal seco recién pulverizado en un tubo de ensayo. Se humectó con cantidad suficiente de agua, se agregó una gota de cloroformo y se mezcló. Se tapó el tubo con un disco de papel picrosódico de tamaño adecuado. Se calentó a 35° C durante 3 horas y se observó luego el color desarrollado en el papel.

Se considera positiva la reacción cuando este es rojo.

Detección de Antraquinonas:

Reacción de Borntrager.- Sobre 1 g de material seco y pulverizado se agrega 3 ml de benceno, se maceró durante 6 horas, se separó el benceno el cual se agita con solución acuosa de NH₃, considerándose positiva la coloración rosada o roja en la fase acuosa.³⁰

3.3 Estudio farmacológico

3.3.1 Evaluación del Efecto Broncodilatador

La Broncoconstricción inducida por histamina es un modelo inmunológico tradicional de la obstrucción de las vías respiratorias inducida por el antígeno. La histamina al ser inhalada conduce a hipoxia y convulsión en los conejillos de indias y contrae muy fuerte el musculo liso, produciendo también hipotensión profunda y dilatación capilar en el sistema cardiovascular. El mayor efecto causado por la histamina es broncoconstricción grave en los conejillos de indias que causa asfixia y hasta puede ocasionar la muerte.

Los broncodilatadores pueden retrasar la aparición de estos síntomas.³¹

A. Animales de experimentación (Ver anexo N° 05)

Para la determinación del efecto broncodilatador de utilizaron 32 cobayos machos tipo Hartley procedentes del Instituto Nacional de Salud; los cuales se mantuvieron a temperatura ambiente. La iluminación fue en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se usaron dietas convencionales; con un suministro ilimitado de agua potable. Los animales fueron seleccionados al azar, marcados para permitir su identificación individual y se mantuvieron en sus jaulas durante al menos

5 días antes de la dosificación para permitir su aclimatación a las condiciones del laboratorio.

B. Determinación del Efecto Broncodilatador

La determinación de la actividad broncodilatadora se realizó mediante dos experimentos:

- **Reversión del broncoespasmo y shock histaminérgico.**

Se utilizaron 16 cobayos distribuidos en 4 grupos, los cuales fueron colocados en una cámara hermética donde fueron sometidos a histamina por espacio de 20 segundos a presión de 80 PSI, con la aparición del broncoespasmo se aplicó el extracto por vía intraperitoneal de la siguiente manera:

El grupo A control recibió adrenalina (0.1ml al 0.1% vía intraperitoneal.)

El grupo B recibió 400 mg/kg del extracto de *Clerodendron fragrans*.

El grupo C recibió 200 mg/kg del extracto de *Clerodendron fragrans*.

El grupo D recibió 100 mg/kg del extracto de *Clerodendron fragrans*.

Se determinó la reversión del efecto broncodilatador y el tiempo de recuperación del shock histaminérgico.

- **Prevención del broncoespasmo y shock histaminérgico.**

Para este experimento, donde se le administró al animal el extracto vía intraperitoneal un minuto antes de ser colocado en la cámara hermética, se utilizaron 16 cobayos distribuidos de la siguiente manera:

El grupo A control recibió solución salina.

El grupo B recibió 400 mg/kg del extracto de *Clerodendron fragrans*.

El grupo C recibió 200 mg/kg del extracto de *Clerodendron fragrans*.

El grupo D recibió 100 mg/kg del extracto de *Clerodendron fragrans*.

Con este ensayo se determinó el tiempo de pre convulsión y el porcentaje de protección del extracto.

3.3.2 Estudio toxicológico

A. Evaluación de la toxicidad aguda (Ver anexo N° 06)

La toxicidad aguda cuantifica los efectos adversos que ocurren dentro de un breve lapso con posterioridad a la administración de una dosis única o múltiple. La prueba más común de toxicidad aguda involucra la determinación de la dosis letal media (DL50) del compuesto en estudio. La metodología y el diseño experimental que se utilizó es la descrita por la OECD 425 (Organización Económica para el Comercio y Desarrollo) que abarca las 34 naciones más desarrolladas del mundo.

B. Animales de experimentación

Para la determinación de la toxicidad aguda se utilizaron 15 ratas distribuidas en 3 grupos: grupo control, prueba límite a 2.000 mg/kg y la prueba límite a 5.000 mg/kg. Los animales fueron ratas hembras, nulíparas y no embarazadas, procedentes del Instituto Nacional de Salud, esto es así porque la bibliografía de los ensayos convencionales de DL50 muestra que normalmente hay poca diferencia de sensibilidad entre los sexos, pero en aquellos casos en que se observan diferencias, las hembras son generalmente un poco más sensibles. Los animales se mantuvieron a temperatura ambiente con, una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación, se utilizaron dietas convencionales para roedores de laboratorio; con un suministro ilimitado de agua potable. Los animales fueron seleccionados al azar, marcados para permitir su identificación individual y se mantuvieron en sus jaulas durante al menos 5

días antes de la dosificación para permitir su aclimatación a las condiciones del laboratorio.³²

C. Prueba límite

Prueba límite a 2.000 mg/kg

Dosificar un animal a la dosis de prueba. Si el animal muere, llevar a cabo la prueba principal para determinar la DL50. Si el animal sobrevive, dosificar a cuatro animales adicionales secuencialmente de manera que un total de cinco animales se ponen a prueba. La DL50 es superior a 2000 mg/kg si tres o más animales sobreviven. Si un animal muere inesperadamente tarde en el estudio, y hay otros sobrevivientes, es apropiado detener la dosificación y observar todos los animales para ver si otros animales también morirán durante un periodo de observación. Las muertes tardías se deben contar los mismos que otras muertes.

Si un tercer animal muere, llevar a cabo el ensayo definitivo.³²

Procedimiento de la prueba limite a 2.000 mg/kg

Dosificamos un animal a la dosis de prueba con el extracto etanólico de flores de *Clerodendron fragrans* disuelto en solución salina, mediante cánulas por vía nasogástrica a una dosis por única vez, los volúmenes de administración no excedieron los 3 ml Se aplicó el extracto de acuerdo al peso de cada animal.

Durante el período de ensayo la rata 1 fue observada de forma individual, durante los primeros 30 minutos después de la dosificación. La rata 1 sobrevivió y se procedió a la dosificación de los roedores restantes, estos fueron observados individualmente, durante los primeros 30 minutos y

periódicamente durante las primeras 24 horas (con especial atención durante las primeras 4 horas), y diariamente a partir de entonces, para un total de 14 días. Se controló y observó los cambios de comportamiento las modificaciones del pelo y la piel, ojos y membranas mucosas, del aparato respiratorio, circulatorio, el sistema nervioso autónomo y central, la actividad somato-motriz y el comportamiento. La atención debe ser dirigida a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. También se controló el peso de los animales en los días 1, 7 y 14 del experimento como uno de los parámetros demostrativos de toxicidad. Al finalizar el experimento se procedió al sacrificio de los animales por sobredosis de pentobarbital para los estudios anatomopatológico macroscópico, histopatológicos del cerebro, estómago, hígado, corazón, pulmones y riñones.³²

Prueba límite a 5.000 mg/kg

Dosificar un animal a la dosis de prueba. Si el animal muere, llevar a cabo la prueba principal para determinar la DL50. Si el animal sobrevive, dosificar dos animales más. Si ambos animales sobreviven, la DL50 es mayor que la dosis límite, a continuación, dosificar un adicional de dos animales, uno a la vez. Si un animal muere inesperadamente tarde en el estudio, y hay otros sobrevivientes, es apropiado para detener la dosificación y observar todos los animales para ver si otros animales también morirán durante un periodo de observación similar. Las muertes tardías se deben contar los mismos que otras muertes.

La DL50 es menos de la dosis de prueba (5.000 mg/kg) cuando tres o más animales mueren.³²

La DL50 es mayor que la dosis de prueba (5.000 mg/kg) cuando tres o más animales sobreviven.³²

Procedimiento de la prueba limite a 5.000 mg/kg

Se dosificó a los roedores a la dosis de 5000 mg/kg de peso corporal con el producto a evaluar disuelto solución salina fisiológica mediante cánulas por vía orogástrica a una dosis por única vez, los volúmenes de administración no excedieron los 3 ml. El alimento fue retirado 12 horas antes de comenzar el experimento y vuelto a suministrar 3 horas después de la administración.

Se aplicó el extracto de acuerdo al peso de cada animal.

La observación se realizó de la misma manera que la dosis de 2000 mg/Kg. Al finalizar el experimento todos los animales deben ser sometidos al sacrificio por sobredosis con pentobarbital para los estudios anatomopatológico macroscópico, histopatológicos del cerebro, estómago, hígado, corazón, pulmones y riñones.³²

Cuadro N°01 Clasificación de tóxicos CYTED (programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo). Criterio de Williams³³

Clasificación de tóxicos	DL₅₀ mg/Kg (ratones vía oral)
Extremadamente tóxica	≤ 1
Altamente tóxica	≤ 50
Moderadamente tóxica	≤ 500
Ligeramente tóxica	≤ 5000
Prácticamente no tóxica	≤ 15000
Relativamente inocuo	≥ 15000

IV. RESULTADOS

4.1 Resultados del estudio fitoquímico

Cuadro N° 02. Determinación cualitativa de los metabolitos presentes en el extracto etanólico de las flores de la especie *Clerodendron fragrans*.

	METABOLITOS	ENSAYOS	EXTRACTO ETANÓLICO DE FLORES
FRACCIÓN A	TANINOS	Gelatina	-
		FeCl ₃	+
	AMINOÁCIDOS	Ninhidrina	+
	FLAVONOIDES	Shinoda	+
FRACCIÓN B	TRITERPENOS	Liebermann–Burchard	+
	ANTRAQUINONAS	Bornträger	-
FRACCIÓN C	TRITERPENOS Y/O ESTEROIDES	Liebermann–Burchard	-
	ALCALOIDES	Dragendorff	+
		Wagner	+
		Mayer	+
FRACCIÓN D	FLAVONOIDES	Shinoda	+
	CATEQUINAS	Rosenheim	+
	TRITERPENOS Y/O ESTEROIDES	Liebermann–Burchard	+
	ALCALOIDES	Dragendorff	+
		Wagner	+
		Mayer	+
FRACCIÓN E	FLAVONOIDES	Shinoda	+
	CATEQUINAS	Rosenheim	+

Leyenda:

(+) Positiva

(-) Negativo

Fuente: Datos de los autores – Laboratorio Productos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N. ICA 2015.

4.2 Resultado del efecto broncodilatador

Tabla N° 01. Efecto broncodilatador del extracto etanólico de flores de *Clerodendron fragrans* luego de la inducción del broncoespasmo.

Tratamiento	Material biológico	Vivos	Muertos	Broncoespasmo revertido	Observaciones
Grupo A Control	4	4	-	100%	Requerimiento de adrenalina 0.1mL (0.1% I.P.)
Grupo B 400mg/kg	4	4	-	100%	Conductas estereotipadas
Grupo C 200mg/kg	4	4	-	100%	Tranquilizante
Grupo D 100mg/kg	4	4	-	100%	-

Fuente: Datos de los autores – Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N. ICA 2015.

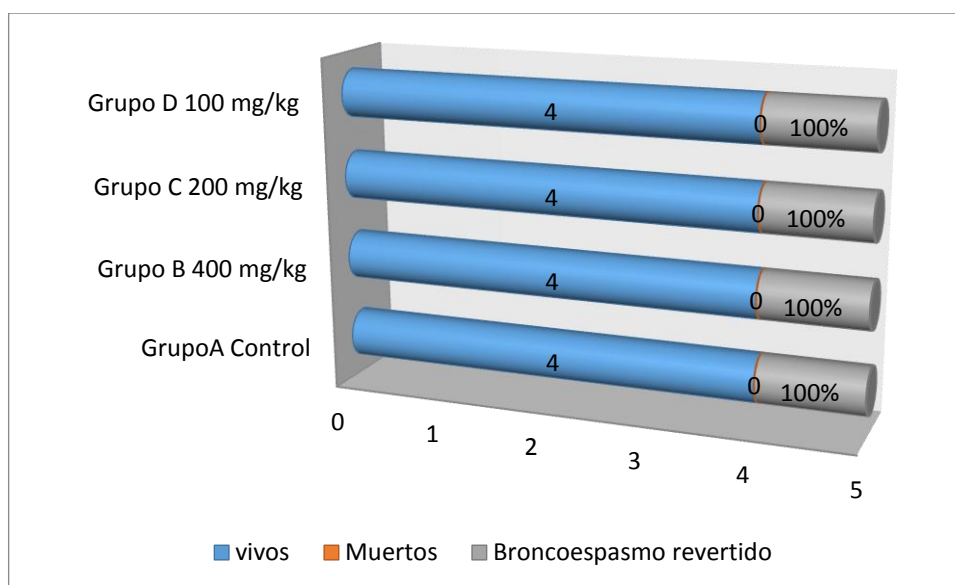


Gráfico N°01. Porcentaje de reversión del broncoespasmo después de la inducción del shock histaminérgico

Tabla N° 02. Efecto del extracto etanólico de flores de *Clerodendron fragrans* en la prevención del broncoespasmo.

Tratamiento	PCT (s)	Protección %
Control	92.75	-
<i>C.fragrans</i> 100 mg/kg	104.25	11.03
<i>C.fragrans</i> 200 mg/kg	125	25.8
<i>C.fragrans</i> 400 mg/kg	180.5	48.61

*PCT: Tiempo de pre convulsión.

Fuente: Datos de los autores – Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N. ICA 2015.

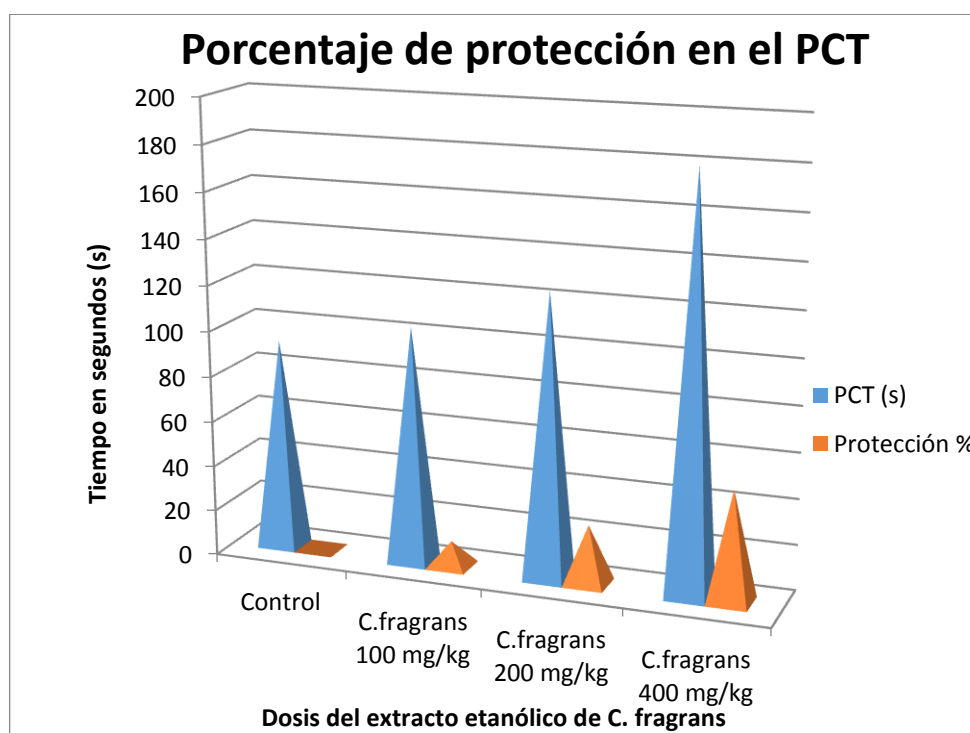


Gráfico N° 02. Porcentaje de protección en el tiempo de pre convulsión

Tabla N° 03. Prevención del shock histaminérgico con extracto etanólico de flores de *Clerodendron fragrans*.

Grupos - Concentración	Tiempo de recuperación (s)	Reacciones Adversas (s)
Control - Adrenalina	66.25	-
400 mg/kg	90.75	195
200 mg/kg	98.75	-
100 mg/kg	112	-

Fuente: Datos de los autores – Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N. ICA 2015.

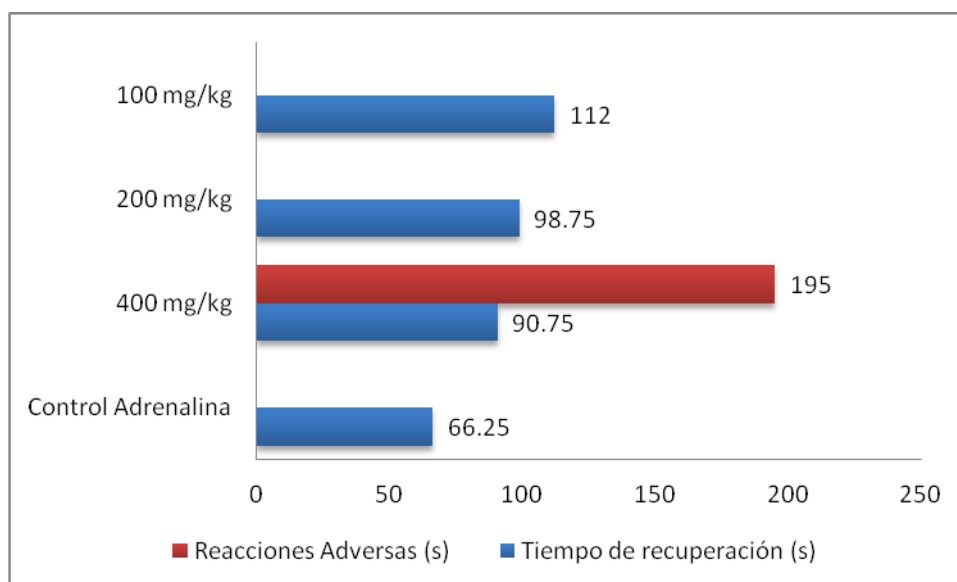


Gráfico N° 03. Tiempo de recuperación en la reversión del shock histaminérgico.

4.3 Resultados de toxicidad aguda

Tabla N° 04. Resultados de toxicidad aguda luego de la administración del extracto etanólico de flores de *Clerodendron fragrans*.

Comportamiento de pesos de los animales			Muertos	Signos	
Grupo	Promedio de pesos (g)				
	Peso Día 0	Peso Día 7	Peso Día 14		
Control	216.1	238.9	242.6	-	No presentan
Dosis 2000 mg/Kg	213.5	235.7	243.4	-	No presentan
Dosis 5000 mg/Kg	212.6	224.9	235.6	-	No presentan

Fuente: Datos de los autores – Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N. ICA 2015.

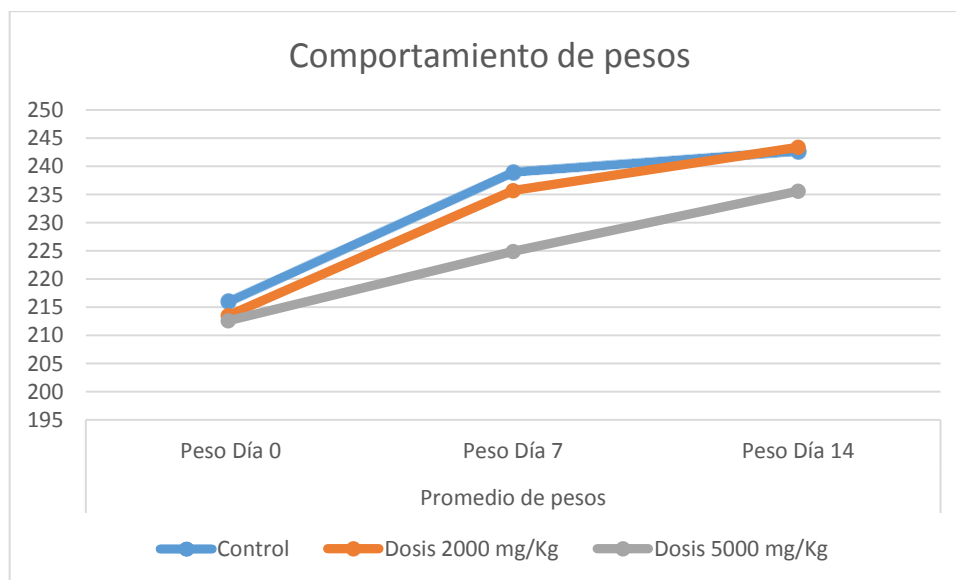


Gráfico N°04. Comparación de los pesos a las dosis administradas

4.4 Cuadro N°03. Resultados del estudio histopatológico realizado en animales de experimentación que recibieron dosis de 2000 y 5000 mg/kg del extracto etanólico de flores de *Clerodendron fragrans* (Ver Anexo 07).

	Grupo control	Prueba límite a 2.000 mg/kg	Prueba límite a 5.000 mg/kg
Tejido hepático	Con arquitectura conservada, hepatocitos sin alteraciones, espacio portal y centro lobulillar sin alteraciones.	Con arquitectura conservada, hepatocitos sin alteraciones, espacio portal y centro lobulillar sin alteraciones.	Con arquitectura conservada, tejido hepático con degeneración vacuolar de grado severo, espacio portal con infiltrado inflamatorio crónico de grado leve y presencia de células apoptósicas.
Tejido pulmonar	Con arquitectura conservada, alveolos pulmonares conservados, espacio interalveolar aumentado de tamaño, presencia de linfocitos de grado leve y macrófagos.	Con arquitectura conservada, alveolos pulmonares conservados, espacio interalveolar aumentado de tamaño, presencia de linfocitos de grado leve y macrófagos.	Con arquitectura conservada, alveolos pulmonares conservados, espacio interalveolar aumentado de tamaño, presencia de linfocitos de grado leve y macrófagos.
Músculo cardiaco	SA	SA	SA
Tejido renal	SA	SA	SA
Pared gástrica y esofágica	SA	SA	SA
Parénquima cerebral y cerebelar	SA	SA	SA

Leyenda:

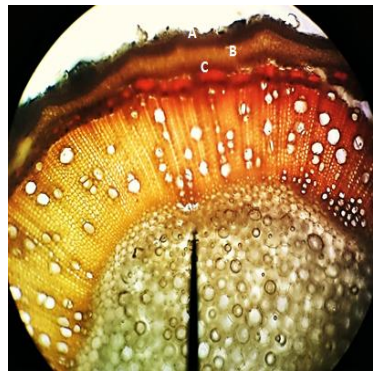
SA: Sin Alteración

4.5 Resultados del estudio histológico vegetal.

4.5.1 Estructuras observadas en el corte transversal del tallo de *Clerodendron fragrans*

- a) *Peridermis*: constituida por tres capas el súber, el felógeno y felodermis (Fig N° 06). El cambium suberoso o felógeno se divide por mitosis para originar un número de capas de súber o corcho hacia afuera y de felodermis hacia adentro. El tejido suberoso es el responsable de proteger a la planta contra la pérdida de agua y contra las altas temperaturas extremas.

Fig N° 06. Corte transversal de tallo

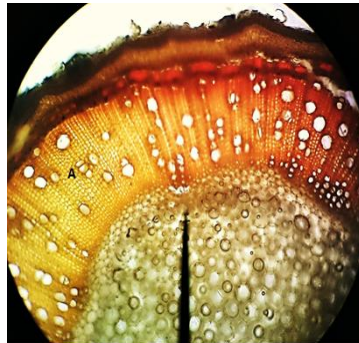


- A. Peridermis.
B. Súber Felógeno
C. Felodermis.

- b) *Células esclerenquimatosas*: está constituida por células muertas, cortas (esclereidas); cuyas paredes se lignifican y alcanzan un gran espesor. Y le otorga rigidez a la planta.

- c) *Vasos leñosos*: estos conducen la savia bruta (función de conducción), sus paredes se refuerzan con lignina, gracias a esto los vasos leñosos también cumplen la función de soporte a la planta (Fig N° 07).

Fig N° 07. Vasos leñosos



- d) *Fibras leñosas*: sus membranas están incrustadas de lignina, formando manojos alrededor de los vasos leñosos (Fig N° 08).

Fig N° 08. Fibras leñosas

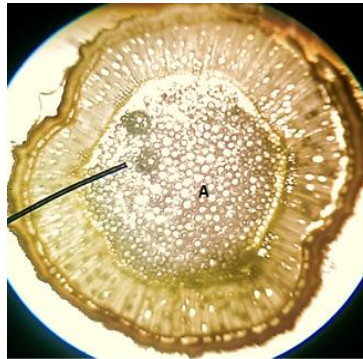


- A. Radios leñosos
B. Líber

- e) *Líber o floema*: el tejido liberiano es el responsable de transportar la savia elaborada desde las hojas al resto de la planta. Se observa sus células vivas y alargadas (Fig N° 07).

- f) *Cambium*: que divide la zona medular de los vasos leñosos. El cambium origina, hacia el interior, los vasos leñosos y, hacia el exterior, los vasos liberianos (Fig N° 09).

Fig N° 09. Zona medular

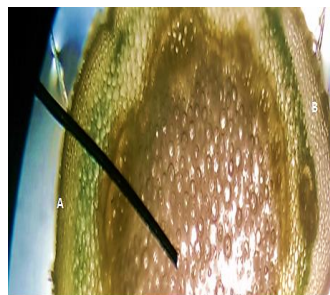


A. Células esclerenquimáticas

a) Estructuras observadas en corte transversal de peciolo de *Clerodendron fragrans*

Peridermis: presenta de 2 a 3 hileras de súber, el felógeno muy pegado al súber. Estos tejidos le brindan protección a la planta (Fig N° 10).

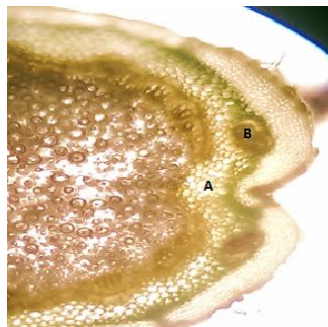
Fig N° 10. Corte transversal de peciolo de *C. fragrans*.



A. Súber
B. Felógeno

- b) Células colenquimáticas:** formadas por células vivas, alargadas y prismáticas, con presencia de lenticelas en los ángulos (Fig N° 11) que le permiten el paso del aire. Este tejido es el responsable de mantener erguidos y flexibles al pecíolo de las hojas.

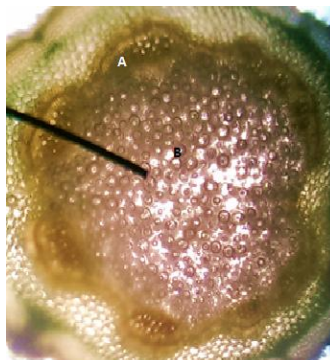
Fig N° 11. Corte transversal de pecíolo.



- A. Células colenquimáticas
B. Lenticelas.

- c) Vasos xilemáticos:** se observa los paquetes fibrovasculares formando ángulos (Fig N° 12).

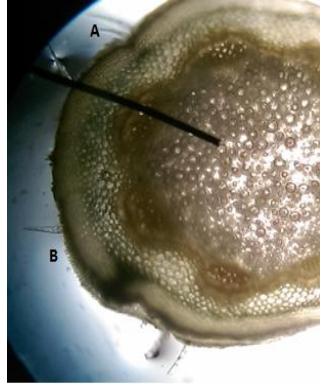
Fig N° 12. Vasos xilemáticos.



- A) Paquetes fibrovasculares.
B) Zona medular.

- d) *Pelos*: Presenta tricomas pluricelulares alargados, glandulares que son los responsables del olor característico de la planta (Fig N° 13).

Fig N° 13. Corte transversal de peciolo.

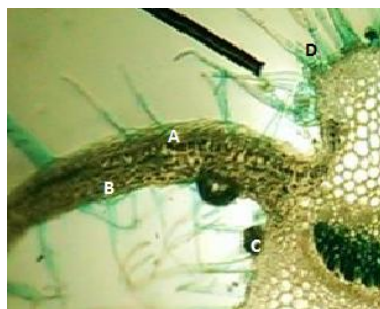


A. Pelos

4.5.2 Estructuras observadas en el corte transversal de hoja de *Clerodendron fragrans*

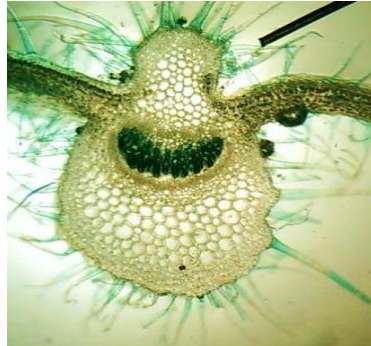
- a) *Partes laminares*: presenta epidermis superior (Fig N° 14) que está cubierta en su cara tangencial externa por una cutícula que disminuye la pérdida de agua y que está formada por cutina (sustancia impermeable al agua, viento) y por cera. El tejido epidérmico realiza una función de protección de la desecación y de permitir la absorción de agua de la parte aérea de la planta. Con gran cantidad de pelos o Tricomas tectores (Fig N° 15), unicelulares, pluricelulares, glandulosos con contenido de aceites esenciales que tiene función protectora contra animales herbívoros. Se observa una hilera de parénquima clorofiliano en empalizada y debajo de ella el parénquima esponjoso (Fig N° 14) con gran cantidad de cloroplastos en los que se realiza la fotosíntesis.

Fig N° 14. Parte laminar hojas de *C. fragrans*.



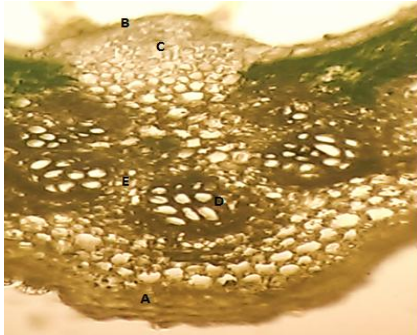
- A) Epidermis.
- B) Parénquima clorofiliano esponjoso.
- C) Pelos glandulosos.
- D) Pelos pluricelulares.

Fig N° 15. Corte laminar de hojas de *C. fragrans*.



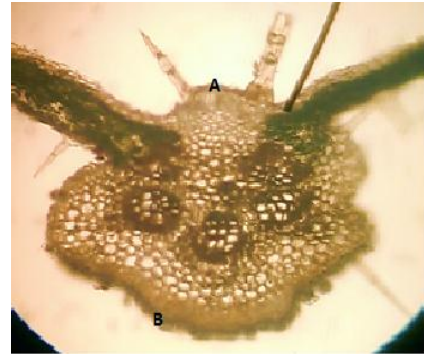
b) *Nervadura central*: se observa la epidermis superior e inferior (Fig N° 16) cutinizadas. En la parte superior e inferior hay de 3-4 hileras de células colenquimáticas (Fig N° 16). Parénquima fundamental conteniendo en la parte central el xilema (Fig N° 16) con células lignificadas; cuya función es la de conducción de la savia bruta (agua y sales minerales). La lignificación además le da la función de soporte a la planta. se observa también el floema o líber (Fig N° 16) con células celulósicas cumpliendo la función de conducción de la savia elaborada (agua, sacarosa, maltosa, etc.) desde las hojas al resto de la planta. Presencia de súber superior e inferior (Fig N° 17). Paquete libero leñosos (Fig N° 18)

Fig N° 16. Nervadura Central hojas de *C. fragrans*.



- A) Epidermis inferior.
- B) Epidermis superior.
- C) Células colenquimáticas
- D) Xilema
- E) Floema

Fig N° 17



- A) Súber superior.
- B) Súber inferior.

Fig N° 18. Paquetes libero leñosos



a) **Estructura observadas en un corte longitudinal de pétalos de la flor de *Clerodendron fragrans***

Células celulósicas: con presencia de pigmentos carotenoides, pigmentos marrones (Fig N° 19).

Fig N° 19. Corte longitudinal de flores de *C. fragrans*



A) Pigmentos carotenoides.
B) Pigmentos marrones.

b) *Estomas*: Son orificios microscópicos diseminados en la epidermis y que sirven para la comunicación de los tejidos con el medio ambiente. Un estoma (Fig N° 20) está formado por dos células provistas de clorofila, de forma arriñonada o semilunar. (Células constrictoras). Se unen por su parte cóncava dejando un pequeño orificio llamado ostiolo. De todas las formaciones epidérmicas, los estomas son los que desempeñan las funciones más importantes, pues por ellos se efectúan los intercambios gaseosos con el aire, como la respiración y la transpiración o exhalación de vapor de agua. Lo más notable es la facultad que tienen los estomas de graduar dichas funciones; en efecto, las células constrictoras se abren o se cierran bajo la influencia de algunos factores externos, como la luz, la oscuridad, el calor o el frío, la humedad o la sequedad del aire.

c) *Pelos glandulares*: Los pelos cumplen su función protectora por su sola presencia; pero también contienen los aceites esenciales demostrando así su aroma (Fig N° 21).

Fig N° 20. Corte longitudinal
de flores de *C. fragrans*.



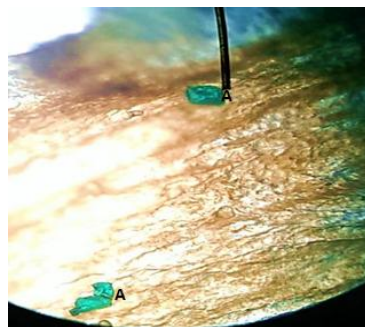
Fig N° 21. Pelos glandulares



A) Estomas.

d) *Cristales de oxalato*: (Fig N° 22).

Fig N° 22. Cristales de oxalato



4.6 Resultados de pruebas microquímicas

Cuadro N° 04. Determinación de metabolitos secundarios en las estructuras frescas de *Clerodendron fragrans*.

Metabolitos	Resultados			
	Tallos	Pecíolo	Hojas	Flores
Alcaloides	++++	+++	+++	+++
Almidón	-	-	+	+++
Grasas y aceites	++++	+++	++++	++++
Mucílagos	+++	++	+++	++
Oxalato de calcio	+++	+++	+++	+++
Quitina	-	-	-	-
Saponinas	+++	+++	++	+++
Taninos	+++	++	+++	++

Leyenda:

(+) Positiva – Grado de coloración

(-) Negativo

Fuente: Datos de los autores – Laboratorio Productos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N. ICA 2015.

V. DISCUSIÓN

Actualmente se realizan estudios preliminares a la validación farmacológica del empleo popular de plantas medicinales que son fundamentales en cuanto orientan la investigación hacia un tipo de actividad en concreto, con el objetivo de un posterior aislamiento e identificación de los compuestos, búsqueda de nuevos principios activos y estudio del mecanismo de acción de los mismos.

Como resultado del screening fitoquímico realizado al extracto etanólico de la especie estudiada, se comprobó la presencia de flavonoides, triterpenos, catequinas y alcaloides. Este estudio fue también corroborado con el estudio de las pruebas microquímicas que nos permitió identificar la presencia de estos metabolitos en material vegetal fresco; así también el estudio histológico nos ha permitido conocer sus caracteres microscópicos como por ejemplo sus tricomas glandulosos razón por la cual esta especie presenta su aroma característico de esta manera confirmamos la clasificación taxonomía de la especie en estudio conocer su estructura y como está relacionada con sus funciones.

De acuerdo a los resultados se determinó que el extracto etanólico de flores de *Clerodendron fragrans* si presenta efecto broncodilatador; ya que las tres dosis estudiadas (400, 200 y 100 mg/kg) revirtieron el broncoespasmo significativamente como sucedió cuando se administró adrenalina en el grupo control (ver tabla N° 01). Y en el ensayo in vivo para la prevención del broncoespasmo y del shock histaminérgico a las dosis estudiadas el extracto logró retrasar la aparición de los síntomas. Los resultados demostraron que el extracto prolonga el Tiempo de Pre Convulsión (PCT) en los cobayos después del broncoespasmo inducido por histamina (ver tabla N° 02).

El efecto broncodilatador se evaluó con el método espasmo bronquial inducido con histamina. Aunque la histamina no es el único ni el principal mediador en el asma

bronquial, es usada en muchos modelos experimentales para ensayos de sustancias broncodilatadoras ⁶; el hecho de que las muestras ensayadas tengan un efecto benéfico frente al broncoespasmo producido por histamina valida en cierto modo el uso terapéutico y las propiedades atribuidas a la planta. Este efecto broncodilatador del extracto podría deberse a la presencia de alcaloides y flavonoides que se identificaron en el estudio fitoquímico ⁵; los alcaloides que son sustancias muy potentes y dentro de sus acciones esta la oposición a la actividad broncoconstrictora de la acetilcolina, el extracto posiblemente actuaría antagonizando los receptores muscarínicos (M₃) que se encuentran en la musculatura lisa bronquial; produciendo disminución de la concentración de calcio intracelular y con ello la broncodilatación podemos citar como ejemplo a la atropina, cocaína, etc. Asimismo la presencia de flavonoides produciría efecto broncodilatador y esto se refuerza con el aislamiento de hispidulin un flavonoide presente en *Clerodendrum petasites* que actúa probablemente inhibiendo el canal de calcio regulado por ligando no produciéndose la unión del calcio con la proteína calmodulina; con eso no hay activación de la cinasa de la cadena ligera de miosina ⁵. Algunos flavonoides como luteolol, crisina, apigenol, etc. Tienen actividad antiinflamatoria y antialérgica debido a que inhiben la ciclooxigenasa y la agregación plaquetaria. Los efectos adversos que se presentaron a dosis de 400 mg/kg y 200 mg/kg obedecerían a la acción psicotrópica atribuida a los alcaloides como por ejemplo la atropina que tiene efecto sobre el sistema nervioso vegetativo.

A las dosis estudiadas se logró anular el shock histaminérgico sin presentar efectos adversos en la menor dosis (Ver tabla N° 01); mostrando el extracto de flores de *Clerodendron fragrans* mayor eficacia con respecto a los estudios realizados por Gorriti A. et al. quienes estudiaron *Werneria apiculata* y *Werneria* marcida obtuvieron un resultado de 86-97 segundos de retraso¹¹, mientras que Núñez Y. et

al. trabajaron con el extracto acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. obteniendo resultados negativos.⁶

Así mismo la prevención y reversión del shock histaminérgico comprobado en la especie en estudio puede ser comparada con un efecto similar que presenta otras plantas de la misma familia *Clerodendron* entre ellas encontramos la especie *Clerodendron phlomidis* que presento actividad antihistamínica utilizado como tónico amargo investigada por Maruga M. et al.⁷ También se puede comparar con el estudio realizado por Yeboah A. et al. quienes evaluaron el extracto metanólico de las hojas de *Abrus precatorius* donde incluyeron el uso de la histamina para producir la bronco-constricción. El extracto ofrece un grado máximo de protección de 48,61%, que era comparable a la de salbutamol 47,52% (Ver tabla N° 02)

Independientemente de los efectos beneficiosos de *C. fragrans*, un conocimiento detallado acerca de la toxicología aguda es insuficiente. Por lo tanto, se llevó a cabo el presente estudio para evaluar y centrarse en la toxicidad aguda de *C. fragrans* en un modelo animal. Durante la evaluación de las características tóxicas de las plantas medicinales, la determinación de la DL50 es generalmente un primer paso a realizar.

En este estudio, el extracto de *C. fragrans* en una dosis de 2000 mg/kg y 5000 mg/kg no tuvo ningún efecto adverso en las ratas ensayadas hasta 14 días de observación (Ver tabla N° 04). Por lo tanto, este estudio indica que el extracto de *C. fragrans* no causa efectos de toxicidad aguda a la dosis probada y con un valor LD50 mayor de 5000 mg / kg. En principio, el método de prueba de límite no está diseñado para determinar un valor de DL50 precisa, pero sirve como una estimación para clasificar el extracto crudo sobre la base de la expectativa en el que el nivel de dosis se espera que los animales para sobrevivir. Se puede afirmar

que el extracto de *C. fragrans* no interfirió con el metabolismo normal de los animales (no hubo cambios en el peso. Ver Tabla N° 04) que fue comparado por la diferencia no significativa a partir de animales en el grupo de control del vehículo.

El extracto de *Clerodendron fragrans* no causa efecto de toxicidad aguda y tiene semejanza con el estudio realizado por Ávila J. et al, quienes evaluaron la toxicidad aguda a dosis fijas del extracto de *Werneria dactylophylla* (pupusa) demostraron la inocuidad de la planta al no observarse signos ni síntomas de toxicidad.¹⁰

Finalmente podemos confirmar nuestras hipótesis que el extracto etanólico de flores de *Clerodendron fragrans* presenta actividad broncodilatadora y además no presenta toxicidad aguda.

VI. CONCLUSIONES

1. Mediante un screening fitoquímico se identificaron en el extracto etanólico de flores de *Clerodendron fragrans* los siguientes metabolitos secundarios: taninos, aminoácidos, flavonoides, triterpenos y/o esteroides, alcaloides y catequinas.
2. De la evaluación del efecto broncodilatador del extracto etanólico de flores de *Clerodendron fragrans* a diferentes dosis en cobayos machos tipo Hartley, se concluye que, el extracto revierte el broncoespasmo y anula el shock histaminérgico, siendo la dosis de 100 mg/kg la que no presenta efectos adversos.
3. Los resultados de la evaluación de la toxicidad aguda del extracto etanólico de flores de *Clerodendron fragrans*, a dosis de 2000 mg/Kg y 5000 mg/Kg realizada en ratas albinas hembras siguiendo la metodología y el diseño experimental descrita por la norma EPA (Agencia de Protección Ambiental) 870.1100, OECD 425 (Organización Económica para el Comercio y Desarrollo), demostraron la inocuidad de la planta al no observarse signos ni síntomas de toxicidad. Según el criterio de Williams para productos naturales administrados por vía orogástrica a dosis única por vía oral en ratas se clasifica como “prácticamente no tóxico”.
4. Se identificaron y describieron todas las estructuras histológicas presentes de las hojas, tallos, peciolo y pétalos de flores de la especie *Clerodendron fragrans*.
5. En el estudio microquímico se hallaron alcaloides, grasas y aceites, oxalato de calcio, saponinas y taninos en las siguientes estructuras frescas de *Clerodendron fragrans*: hojas, tallos, peciolo y pétalos de flores.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. International Committee of Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention. 2011; II – 23.
2. Organización Mundial de la Salud. 10 Datos sobre el Asma. [en línea]. USA: Mayo 2011 (Citado 10 Noviembre 2014). Disponible en: <http://www.who.int/features/factfiles/asthma/es/>
3. Anicama R. et al. Análisis de la situación de salud de la región Ica [en línea]. Perú 2011 (Citado 12 Noviembre 2014); (1): 17-19. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/documentosdigitales/bvsde/texcom/ASIS-regiones/Ica/Ica2011.pdf>
4. Mostacero J. León et al. Plantas medicinales del Perú, taxonomía, ecogeografía, fenología y etnobotánica. Trujillo: 2011. Pág. 186.
5. Hazekamp A, Verpoorte R y Panthong A. Aislamiento de un flavonoide broncodilatador de una planta tailandesa medicinal: *Clerodendrum Petasites*. Journal of Ethnopharmacology 78 (2001) 45 - 49. Tailandia 2001.
6. Núñez Y, Barzaga P, Carrillo C, Lastra H, Chávez I, Fernández D. Et al. Efecto del extracto acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. sobre la anafilaxia pasiva cutánea, espasmo y tonicidad bronquial. Revista Cubana de Plantas Medicinales. Sep.- Dic. 2004 (citado 10 Noviembre 2014). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S102847962004000300006&script=sci_arttext
7. Maruga M, Mirsha S. Examen amplio de *Clerodendrum phlomidis*: un tradicionalmente utilizado amargo. [Revista en Internet] Junio del 2010; 8(6): 510-24. (Citado 21 Diciembre 2014). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20550872>

8. Abraham Yeboah Mensah, Audrey Serwah Bonsu, Theophilus Christian Fleischer Investigación de la actividad broncodilatadora de *Abrus precatorius*. Revista Internacional de Ciencias Farmacéuticas de la opinión y la Investigación [Revista de Internet] Volumen 6, Número 2, Enero - febrero de 2011; Artículo 003 (Citado 10 Noviembre 2014). Disponible en:
<http://globalresearchonline.net/journalcontents/volume6issue2/Article-003.pdf>
9. Jadeja , Thounaojam , Ansarullah , Jadav , Patel , Patel et. Al Evaluación toxicológica y potencial hepatoprotector de extracto de hoja de *Clerodendron glandulosum*. Coleb. Toxicología humana y experimental. [Revista en Internet] Ene 2011 30 (1): 63-70 (citado el 15 Noviembre 2014). Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148599>
10. Ávila J. et al. Evaluación de la toxicidad aguda a dosis fijas del extracto de *Werneria dactylophylla* (pupusa). Rev. Bol. Quim [en línea]. 2011 (Citado 03 de Marzo del 2015); 28(2). Disponible en:
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602011000200007&lang=pt
11. Zárate R, Gorriti A, Lobatón M, Jurado B. Estudio farmacognóstico de *Werneria apiculata* y *Werneria marcida* s.f. blake. Ciencia e Investigación: Diciembre 1999. (Citado 09 Noviembre 2014).
12. Conabio.inaturalist.org [en línea]. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. (Citado 15 de Diciembre 2014). Disponible en:
<http://conabio.inaturalist.org/taxa/286542-Clerodendrum-fragrans>.

13. Wikipedia. *Clerodendrum chinense*. [en línea]. Actualizado el 21 Mayo 2015 a las 22:07. (Citado 01 Junio 2015). Disponible en:
https://es.wikipedia.org/wiki/Clerodendrum_chinense
14. Pietrellini F. Las plantas medicinales en un piso alto y mesoandino. 2007.
15. Molist P. Pomal M., Megías M. Atlas de histología vegetal y animal. Tejidos vegetales. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. [en línea]. Universidad de Vigo: Agosto 2014 (Citado 07 Febrero 2015). Disponible en:
<http://webs.uvigo.es/mmegias/inicio.html>
16. Grupo de trabajo de la guía de práctica clínica sobre Atención Integral al paciente con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). Desde la Atención Primaria a la Especializada. Sociedad Española de Medicina de Familia (semFYC) y Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR); 2010. Pág. 3.
17. Félix E. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Lima: Acta Med Per 26(4) 2009. Pág: 188- 191
18. Asociación Latinoamericana del Tórax (ALAT) 2011; (1): 6-25
19. Mundo EPOC [en línea]. Barcelona: Boehringer (Actualizado 22 de Dic del 2014; Citado 23 Enero 2015). Disponible en:
https://www.mundoepoc.com/epoc/cap08_01_tratamiento_epoc.html
20. Silva M, Tuneu L et al. Guía de seguimiento farmacoterapéutico sobre asma bronquial. Espai Gràfic Anagrafic. Granada. 2005(2): 2-18.
21. Stolle M. Los principales problemas de salud: Asma bronquial. AMF 2011; 7(9): 11-12.

22. National Heart, Lung, and Blood Institute. Section 2, Definition, Pathophysiology and Pathogenesis of Asthma, and Natural History of Asthma. Agosto 2007.
23. National Asthma Education and Prevention Program: Expert panel report III: Guidelines for the diagnosis and management of asthma. Bethesda, MD: National Heart, Lung, and Blood Institute, 2007. Disponible en: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/asthma/asthgdln.htm>
24. Pazos A. Mediadores celulares I. Histamina y 5-hidroxitriptamina. Farmacología de la migraña. En: Florez J, Armijo J, Mediavilla Á. Farmacología humana. Vol 1 3era ed. Barcelona: Masson; 1998. Pág. 305-325.
25. Delgado A, Minguiguillón C, Joglar J. Introducción a la Química Terapéutica. Cap 18 Fármacos moduladores de la histamina y de la adenosina. 2^{da} ed. Barcelona: Díaz de Santos; 2003. Pág: 337-355.
26. Cortijo J, Morcillo E. Fármacos broncodilatadores y antiinflamatorios en el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. En: Lorenzo P, Moreno A, Leza JC, Lizasoain I, Moro M, Farmacología básica y clínica. 18^a edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008. 729 - 738
27. Hurlé M. Fármacos antiasmáticos y broncodilatadores. En: Florez J, Armijo J, Mediavilla Á. Farmacología humana. Vol 1 3^{era} ed. Barcelona: Masson; 1998. Pág: 705-719.
28. Schwinghammer T. Respiratory disorders. En Wells B. et al. Pharmacotherapy Hadbook. 90^a ed. New York: Mc Graw Hill; 2015. Pág: 813 – 843.
29. The Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals. (GHS). Peligros para la salud. Cap 03. Rev 4; Nueva York y Ginebra, 2011. Pág: 115-228.

30. Herrera A, Kecán G. Análisis fitoquímico y farmacológico de *Solanum marginatum* [Tesis]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Escuela de Bioquímica y Farmacia; 2009.
31. Lock O. Investigación fitoquímica – Métodos en el Estudio de Productos Naturales. Fondo editorial PUCP Lima – Perú; 1994.
32. OECD Guidelines for the testing of chemicals 425. Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP). 2008. Disponible en:
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948378.pdf>
33. Ávila J. et al. Evaluación de la toxicidad aguda a dosis fijas del extracto de *Werneria dactylophylla* (pupusa). Rev. Bol. Quim [en línea]. 2011 (Citado 03 de Marzo del 2015); 28(2). Disponible en:
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602011000200007&lang=pt

VII. ANEXOS



"Año de la Inversión para el Desarrollo Rural y la Seguridad Alimentaria"

CONSTANCIA N° 275-USM-2013

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (Hojas), recibida de **Jackeline Lisset MATTA MAVILA**; de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad "San Luis Gonzaga", ha sido estudiada y clasificada como: ***Clerodendron fragrans* (Vent.) Will.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: VERBENACEAE

GENERO: Clerodendron

ESPECIE: *Clerodendron fragrans* (Vent.) Will.

Nombre vulgar: "Brocamelia".

Determinado por: Blgo. Mario Benavente.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 04 de noviembre de 2013

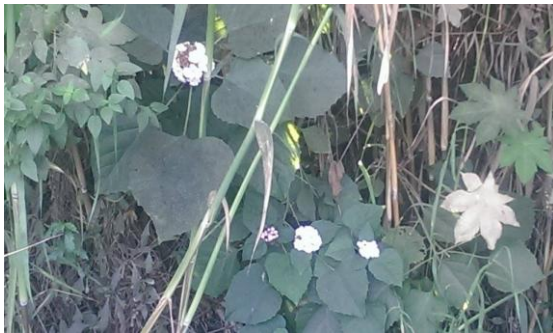


Haydee Montoya Terreros
Dra. HAYDEE MONTOYA TERREROS
JEFA HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Anexo N° 02. Realización de pruebas microquímicas y cortes histológicos en *Clerodendron fragrans*:



Anexo N° 03. Imágenes de la recolección de la especie vegetal



Anexo N° 04. Acondicionamiento y secado:



Anexo N° 05. Animales de experimentación para la determinación del efecto broncodilatador

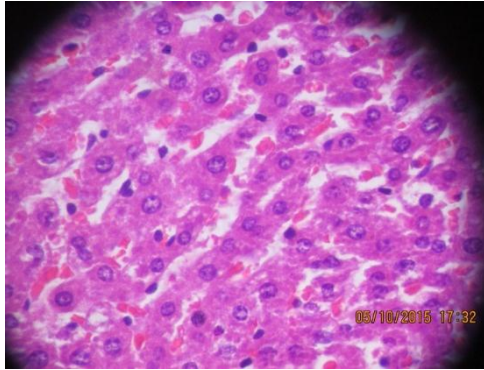


Anexo N° 06. Determinación de la toxicidad aguda



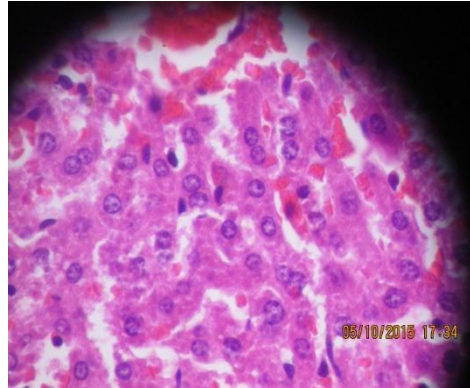
Anexo N° 07. Imágenes del estudio histopatológico

Fig. 1 Hígado rata control Aumento 40X



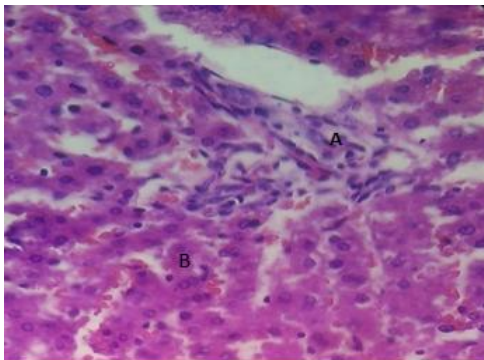
Arquitectura conservada. Hepatocitos sin alteraciones (conserva su citoplasma eosinofílico)

Fig. 2 Hígado rata control Aumento 40X.



Espacio porta sin alteraciones. Citoplasma eosinofílico

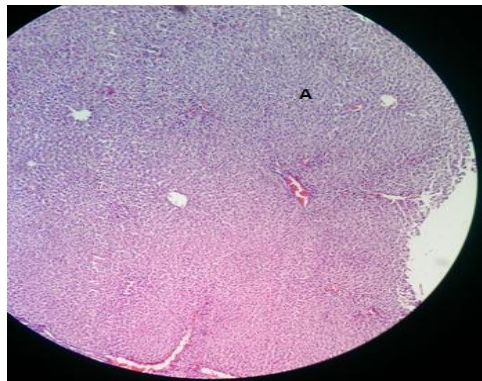
Fig.3 Hígado rata 2 dosis 2000 mg/kg Aumento 40X



Arquitectura hepática conservada, hepatocitos sin alteraciones (conserva su citoplasma eosinofílico) Aumento 40X

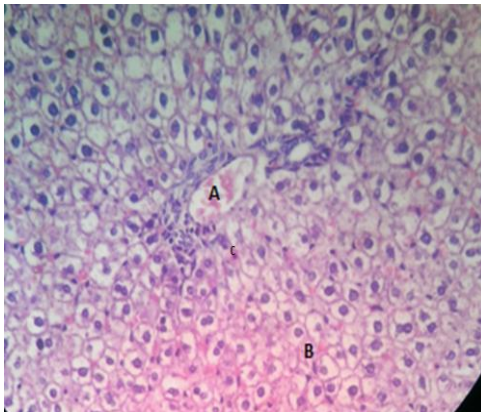
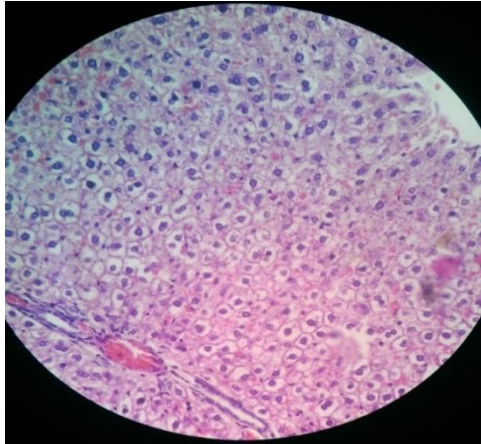
- A) Espacio porta sin alteraciones
- B) Hepatocitos sin alteraciones

Fig.4 Hígado de rata 1 dosis 5000 mg/kg Aumento 10x.



Arquitectura hepática conservada, degeneración vacuolar severa de los hepatocitos (citoplasma claro)

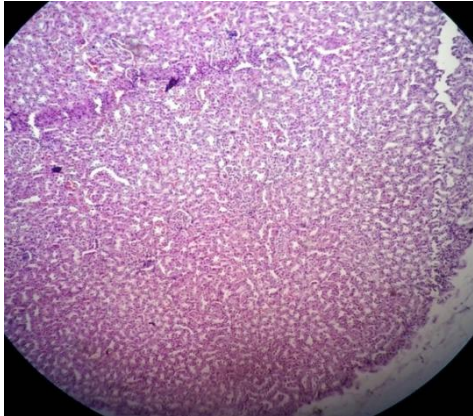
Fig.5 Hígado rata 5 dosis 5000 mg/kg. Aumento 40X



Arquitectura hepática conservada degeneración vacuolar de grado moderado a severo de los hepatocitos

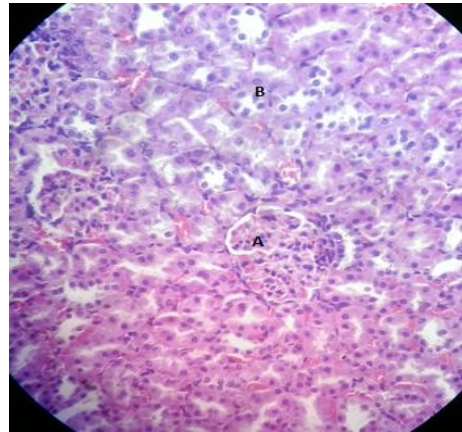
- A. Espacio porta con escaso infiltrado inflamatorio crónico de grado leve.
- B. Hepatocito con degeneración vacuolar.
- C. Cuerpos apoptóticos.

Fig.6 Riñón rata control aumento 10X



Arquitectura renal conservada
presencia de ductos y glomerulos.

Fig. 7 Riñón rata control. Aumento 40X



A. Glomerulos
B. Ductos

Fig.8 Riñón rata dosis 2000 mg/kg

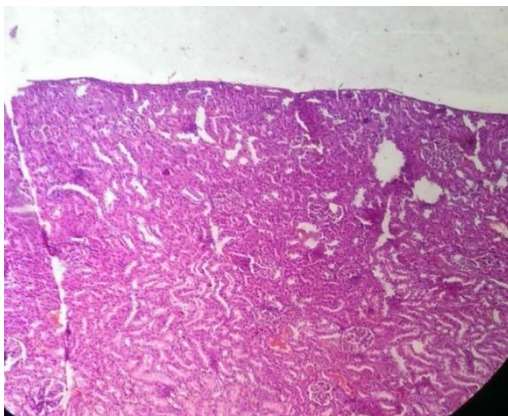


Fig.9 Riñón rata dosis 5000 mg/kg

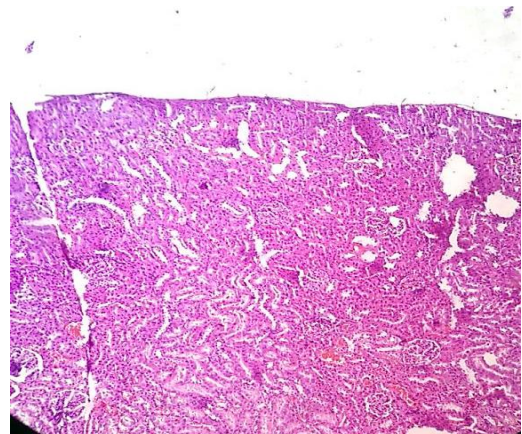
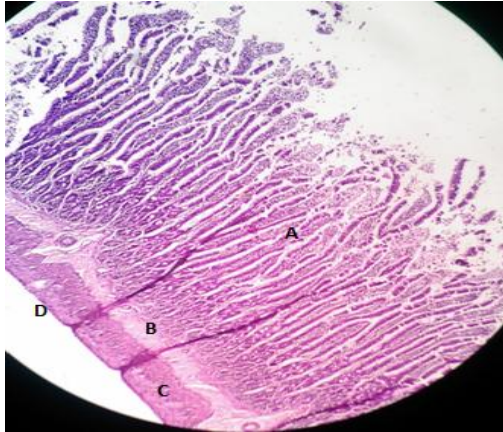


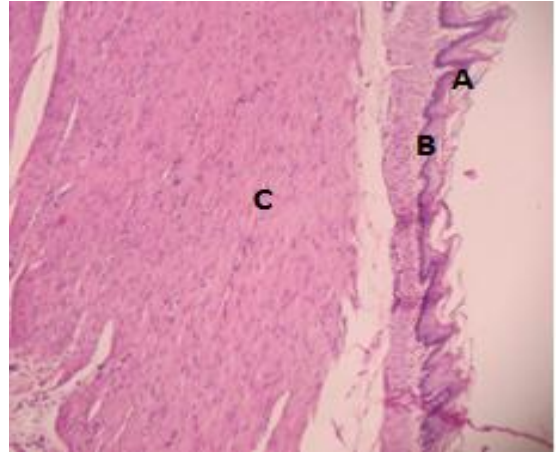
Fig.10 Estomago rata control 10X



Pared de estómago con sus cuatro capas

- A. Mucosa
- B. Submucosa
- C. Capa muscular
- D. Serosa

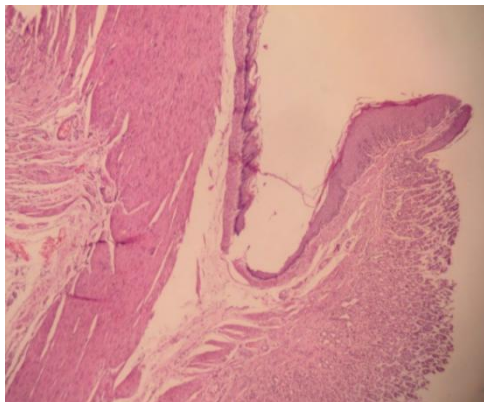
Fig.11 Estómago rata 1 dosis 5000 mg/kg



Pared del esófago

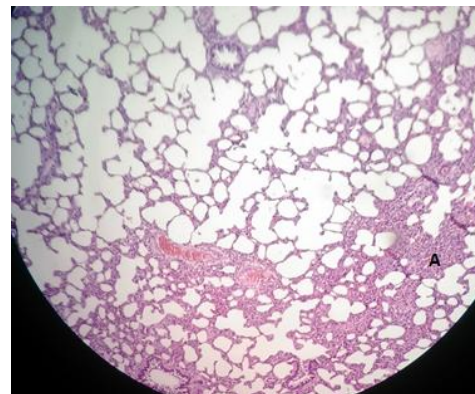
- A. Mucosa
- B. Submucosa
- C. Célula muscular

Fig.12 Estómago rata 1 dosis 5000 mg/kg



Zona transición cardioesofágica

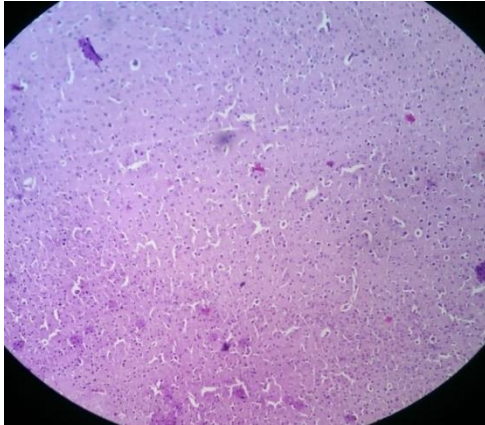
Fig.13 Rata control pulmón Aumento 10X



Parénquima pulmonar conservado

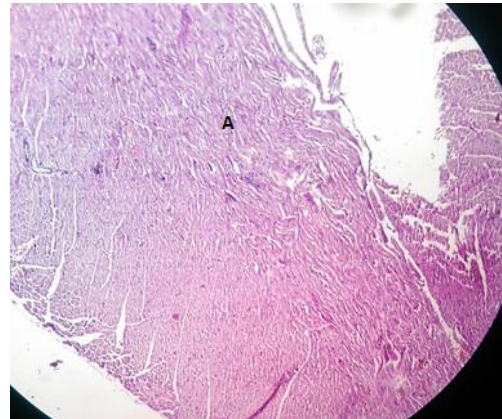
- A. Espacios interalveolares aumentados de tamaño
- B. Presencia de linfocitos de grado leve y macrófagos.

Fig.14 Cerebro rata 4 dosis 5000 mg/kg Aumento 10X.



Parénquima cerebral sin alteraciones

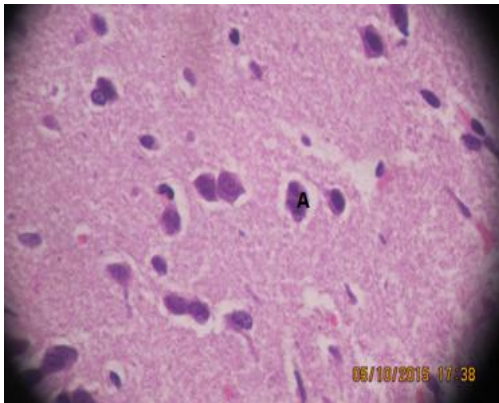
Fig.15 Musculo cardiaco rata control 10x



Tejido cardiaco conservado sin alteraciones

A) Musculo esquelético estriado

Fig.16 Cerebro rata dosis 5000 mg/kg. Aumento 40X



Parénquima cerebral

A. Neuronas

Anexo N° 08. Datos estadísticos

Resultado en la recuperación del shock histaminérgico y el broncoespasmo.

ANOVA de un factor

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4440.688	3	1480.229	51.598	.000
Intra-grupos	344.250	12	28.688		
Total	4784.938	15			

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Recuperación

t de Dunnett (bilateral)^a

(I) grupo		Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Ext 100 mg	Adrenalina	45,75000*	3.78731	.000	35.5891	55.9109
Ext 200 mg	Adrenalina	32,50000*	3.78731	.000	22.3391	42.6609
400 mg	Adrenalina	24,50000*	3.78731	.000	14.3391	34.6609

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

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

Resultado en la prevención del broncoespasmo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	18240.188	3	6080.063	380.499	.000
Intra-grupos	191.750	12	15.979		
Total	18431.938	15			

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: prevención

t de Dunnett (bilateral)^a

(I) grupo		Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Ext 100 mg	Control	11,25000*	2.82659	.005	3.6666	18.8334
Ext 200 mg	Control	32,25000*	2.82659	.000	24.6666	39.8334
400 mg	Control	87,75000*	2.82659	.000	80.1666	95.3334

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

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

Resultados de la toxicidad (Comparación de la variación de pesos)

ANOVA de un factor

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
dia7	Inter-grupos	80.871	2	40.436	3.127	.081
	Intra-grupos	155.179	12	12.932		
	Total	236.050	14			
dia14	Inter-grupos	29.811	2	14.906	.511	.612
	Intra-grupos	350.152	12	29.179		
	Total	379.963	14			

Comparaciones múltiples

t de Dunnett
(bilateral)^a

Variable dependiente			Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
dia7	Ext 2000 mg	Control	.14400	2.27434	.997	-5.5473	5.8353
	Ext 5000 mg	Control	-4.85200	2.27434	.096	-10.5433	.8393
dia14	Ext 2000 mg	Control	2.11200	3.41639	.766	-6.4371	10.6611
	Ext 5000 mg	Control	-1.31000	3.41639	.900	-9.8591	7.2391

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