

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" DE ICA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Actividad antiespasmódica y broncodilatadora de los extractos de diferente polaridad obtenidos a partir de las hojas y tallos de la especie *Trixis cacalioides* (kunth) D. Don

"lingo - lingo"

TESIS

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR:

Bach. ANDRÉS RAMOS TANIA IRIS

Bach. HUACHIN ROJAS MARY SUSSYBELL

ASESORES:

Dra. HAYDEE CHÁVEZ ORELLANA

Mg. ERNESTO TORRES VÉLIZ

ICA - PERU

2015

DEDICATORIA

A Dios por ser mi soporte espiritual.

A mi padre por ser mi guía

A mi madre, tía y hermano por su apoyo incondicional.

Andrés Ramos T.

A Dios por darme la oportunidad de vivir y regalarme una familia maravillosa.

A mis padres porque son ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ellos, hoy puedo ver alcanzada mi meta.

A mis hermanos porque me apoyaron y alentaron a seguir adelante.

A mi esposo, por su cariño, comprensión y paciente espera para que pudiera culminar esta tesis, son evidencias de su gran amor.

Le dedico esta tesis de manera muy especial a mi hijito Sebastián quien me prestó el tiempo que le pertenecía, para terminar esta tesis.

Huachin Rojas M.

AGRADECIMIENTO

Primero Queremos darle gracias a Dios, porque continua dándonos vida y nos permitió alcanzar un peldaño más en nuestra vida profesional.

Agradecer al Dr. Ernesto Torres Véliz por brindar orientación y haber compartido sus conocimientos con el único propósito de formar un correcto profesional.

En especial a la Dra. Haydee Chávez Orellana por su tolerancia, constancia y su continuo aporte académico para poder culminar esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	
SUMMARY	
INTRODUCCIÓN	1
1. CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	5
1.1. <i>Trixis cacalioides</i> (kunth) D. Don "lingo - lingo"	6
1.1.1 Familia asteraceae	6
1.1.2 Género <i>Trixis</i>	6
1.1.3 Clasificación taxonómica	7
1.1.4 Sinonimia	8
1.1.5 Descripción morfológica	9
1.1.6 Distribución y hábitat	9
1.1.7 Estudios Fitoquímicos y usos populares	9
1.2 Músculo liso	10
1.2.1 Regulación de la contracción del músculo liso	11
1.2.1.1 Regulación de la contracción por los iones Calcio	11
1.2.1.2 Regulación de la contracción por señales químicas	13
1.2.2 Músculo liso intestinal	13
1.2.2.1 Espasmos intestinales	14

1.2.2.1.1 Relajación del músculo liso intestinal	14
1.2.2.1.2 Tratamiento farmacológico	15
1.2.3 Músculo liso bronquial	16
1.2.3.1 Broncoconstricción	16
1.2.3.1.1 Relajación del músculo liso bronquial	17
1.2.3.1.2 Tratamiento farmacológico	17
2. CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL	19
2.1 Materiales	20
2.1.1. Materiales, reactivos y equipos	20
2.2. Métodos y procedimientos	21
3.2.1 Estudio Fitoquímico	21
2.2.1.1 Recolección de la muestra botánica.	21
2.2.1.2 Selección, secado y conservación de la muestra.	22
2.2.1.3 Obtención del extracto etanólico de hojas y tallos	23
2.2.1.4 Fraccionamiento del extracto etanólico	23
2.2.1.5 Screening Fitoquímico	25
2.2.1.5.1 Obtención de fracciones	25
2.2.2 Estudio farmacológico antiespasmódico y broncodilatador	32
2.2.2.1 Determinación de la actividad antiespasmódica en íleon aislado de cobayo.	32

2.2.2.2	Determinación de la actividad broncodilatadora en cadena traqueal de cobayos.	39
CAPÍTULO III: RESULTADOS		46
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN		57
CONCLUSIONES		61
RECOMENDACIONES		63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		65
ANEXOS		

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 01:	Clasificación de fármacos broncodilatadores.....	18
Cuadro N° 02:	Metabolitos secundarios identificados en el extracto etanólico de las hojas y tallos de <i>Trixis cacalioides</i> (kunth) D. Don "lingo - lingo".....	47
Cuadro N° 03:	Efecto antiespasmódico de los extractos de diferente polaridad de hojas de <i>Trixis cacalioides</i> , sobre la contracción producida por acetilcolina.....	49
Cuadro N° 04:	Efecto antiespasmódico de los extractos de diferente polaridad de hojas de <i>Trixis cacalioides</i> , sobre la contracción producida por histamina.....	49
Cuadro N° 05:	Efecto antiespasmódico de los extractos de diferente polaridad de tallos <i>Trixis cacalioides</i> , sobre la contracción producida por acetilcolina.....	51
Cuadro N° 06:	Efecto antiespasmódico de los extractos de diferente polaridad de tallos de <i>Trixis cacalioides</i> , sobre la contracción producida por histamina	51
Cuadro N° 07:	Efecto broncodilatador de los extractos de diferente polaridad de hojas de <i>Trixis cacalioides</i> , sobre la contracción producida por acetilcolina.....	53

Cuadro N° 08:	Efecto broncodilatador de los extractos de diferente polaridad de hojas de <i>Trixis cacalioides</i> , sobre la contracción producida por histamina.....	53
Cuadro N° 09:	Efecto broncodilatador de los extractos de diferente polaridad de tallos de <i>Trixis cacalioides</i> , sobre la contracción producida por acetilcolina.....	55
Cuadro N° 10:	Efecto broncodilatador de los extractos de diferente polaridad de tallos de <i>Trixis cacalioides</i> , sobre la contracción producida por histamina	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°01:	Contracción del músculo liso. (Adaptado de Libro Fisiología Humana. Un Enfoque Integrado. Autor: Silverthorn Unglaub Dee).....	12
Figura N° 02:	<i>Trixis cacalioides</i> “lingo-lingo” en su hábitat natural.....	22
Figura N°03:	Íleon aislado de cobayos.....	33
Figura N°04:	Inducción de la contracción del músculo liso intestinal por acetilcolina.....	35
Figura N°05:	Evaluación del efecto espasmolítico de los extractos sobre la contracción inducida por acetilcolina.....	35
Figura N°06:	Inducción de la contracción del músculo liso intestinal por histamina.....	37
Figura N°07:	Evaluación del efecto espasmolítico de los extractos sobre la contracción inducida por histamina.....	37
Figura N°08:	Ejemplo de contracción inducida por acetilcolina en músculo liso de íleon aislado de cobayo	38
Figura N°09:	Ejemplo de contracción inducida por histamina en músculo liso de íleon aislado de cobayo.....	38
Figura N° 10:	Cadena traqueal de cobayos.....	40

Figura N° 11:	Inducción de la contracción del músculo liso bronquial por acetilcolina.....	41
Figura N° 12:	Evaluación del efecto broncodilatador de los extractos sobre la contracción inducida por acetilcolina.....	41
Figura N° 13:	Inducción de la contracción del músculo liso bronquial por histamina.....	43
Figura N° 14:	Evaluación del efecto broncodilatador de los extractos sobre la contracción inducida por histamina.....	43
Figura N° 15:	Ejemplo de contracción inducida por histamina en músculo liso de tráquea aislada de cobayo.....	44
Figura N° 16:	Equipo de baño de órganos marca PANLAB-LE 13206 del Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica.....	45
Figura N°17:	Contracción - Relajación del músculo liso del íleon aislado de cobayo inducido por Histamina.....	52
Figura N°18:	Contracción - Relajación del músculo liso traqueal aislada de cobayo inducido por Histamina.....	56

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- Gráfico N°01:** Pasos para hallar el porcentaje de relajación.....48
- Gráfico N°02:** Porcentaje de relajación de los extractos de hojas, sobre la
contracción inducida por acetilcolina e histamina en músculo liso
de íleon.....50
- Gráfico N°03:** Porcentaje de relajación de los extractos de tallos, sobre la
contracción inducida por acetilcolina e histamina en músculo liso
de íleon52
- Gráfico N°04:** Porcentaje de relajación de los extractos de hojas, sobre la
contracción inducida por acetilcolina e histamina en músculo liso
de tráquea.....54
- Gráfico N°05:** Porcentaje de relajación de los extractos de tallos, sobre la
contracción inducida por acetilcolina e histamina en músculo liso
de tráquea56

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue: Evaluar la actividad antiespasmódica y broncodilatadora de los extractos de diferente polaridad de las hojas y tallos de *Trixis cacalioides* (kunth) D. Don "lingo - lingo". Los extractos de diferente polaridad de las hojas y tallos de *Trixis cacalioides* (kunth) D. Don "lingo - lingo"; se obtuvieron: primero por maceración y luego por reflujo, a los que posteriormente se les realizó screening fitoquímico. El efecto espasmolítico de los extractos de diferente polaridad se probó *in vitro* en íleon aislado de cobayo, evaluándose el efecto de los extractos a una concentración 500 mg/mL sobre la motilidad espontánea y la contracción producida después de la administración de la acetilcolina al 0.1% e histamina al 0.1%. El efecto broncodilatador se probó *in vitro* en cadena traqueal de cobayo con extractos de diferente polaridad a una concentración de 500 mg/mL, evaluándose la relajación del músculo liso traqueal el cual es sometido a sustancias constrictoras como la histamina al 0.1% y acetilcolina al 0.1%. Como resultado del presente trabajo; el extracto de tallos de la fracción diclorometánica presentó mayor actividad antiespasmódica y broncodilatadora.

Palabras claves: *Trixis cacalioides*, actividad antiespasmódica, actividad broncodilatadora, screening fitoquímico.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the bronchodilator and antispasmodic activity of extracts of different polarity of the leaves and stems of *Trixis cacalioides* (kunth) D. Don "lingo - lingo". The extracts of different polarity of the leaves and stems of *Trixis cacalioides* (kunth) D. Don "lingo - lingo", were obtained first by soaking and then reflux, which subsequently underwent phytochemical screening. The spasmolytic effect. extracts of different polarity was tested in vitro on isolated ileum of guinea pig, evaluating the effect of the extracts at a concentration 500 mg / mL on spontaneous motility and contraction after the administration of acetylcholine produced 0.1% and histamine 0.1%. The bronchodilator effect was tested in vitro in tracheal chain of guinea pigs with extracts of different polarity at a concentration of 500 mg / mL, evaluating relaxation of tracheal smooth muscle which undergoes constrictors such as histamine 0.1% and Acetylcholine 0.1%. As a result of this study, the extract stalks dichloromethane fraction showed greater bronchodilator activity and antispasmodic.

Keywords: *Trixis cacalioides*, antispasmodic activity, bronchodilator activity, phytochemical screening.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos inmemoriales, los pueblos atesoran en su cultura médica el conocimiento de las propiedades curativas de muchas plantas. Hoy en día, no existe duda sobre la importancia de las plantas y a pesar del desarrollo alcanzado por la síntesis química, éstas constituyen un arsenal de sustancias biológicamente activas. La Medicina tradicional actualmente recobra una posición que parecía perdida después del surgimiento y auge de la industria químico-farmacéutica que revolucionó con numerosos medicamentos la terapéutica tradicional.¹

Teniendo como punto de partida la información etnobotánica es que se procedió a iniciar el presente estudio con el objetivo de analizar las propiedades curativas atribuidas a la planta mediante los modelos experimentales adecuados.

Por lo expuesto anteriormente se evalúa la especie *Trixis cacalioides* que se desarrolla en el distrito de Yauca del Rosario, Departamento de Ica; que tradicionalmente se le atribuye propiedades antiespasmódicas intestinales y broncodilatadoras.

Los espasmos se consideran como una contracción súbita, violenta e involuntaria de un músculo o grupo muscular.² A menudo el dolor procedente de una víscera espástica adopta la forma de cólicos, con un agravamiento hasta un grado acusado de intensidad para después calmarse. Éste proceso persiste de un modo intermitente, una vez cada varios minutos. Los ciclos intermitentes se deben a los periodos de

contracción del músculo liso .Por ejemplo: cada vez que viaja una onda peristáltica a lo largo de un intestino espástico hiperexcitable, se produce un retortijón.³

Las enfermedades obstructivas de las vías respiratorias como asma, EPOC, enfisema pulmonar, síndrome de distress respiratorio en adultos, e insuficiencia respiratoria son de alta prevalencia en el país, que se convierten cada vez más en un azote para la población, limitando la actividad cotidiana. Las drogas que actúan sobre la motilidad bronquial son broncoconstrictoras o broncodilatadoras, pero como es evidente, solo son de interés farmacológico las que dilatan los bronquios por su aplicación clínica, ya que pueden utilizarse en el asma bronquial.⁴

La presente investigación busca comprobar el efecto antiespasmódico y broncodilatador de los diferentes extractos de hojas y tallos de *Trixis cacalioides* (kunth) D. Don "lingo - lingo"

Para esto nos planteamos los siguientes objetivos:

Objetivo General

Evaluar la actividad antiespasmódica y broncodilatadora de los extractos de diferente polaridad obtenidos a partir de las hojas y tallos de *Trixis cacalioides* (kunth) D. Don "lingo-lingo".

Objetivos Específicos

- Obtención de los extractos de diferente polaridad a partir de las hojas y tallos de *Trixis cacalioides* (Kunth) D.Don "lingo-lingo", e identificación de los metabolitos secundarios presentes.
- Determinar la actividad antiespasmódica y broncodilatadora de los extractos de diferente polaridad obtenidos a partir de las hojas y tallos de *Trixis cacalioides* (kunth) D.Don "lingo-lingo" en órgano aislado.

CAPÍTULO I:

MARCO TEÓRICO

1.1 *Trixis cacalioides* (kunth) D. Don "lingo - lingo"

1.1.1 Familia Asteraceae

La familia asteraceae es la más extensa de las dicotiledóneas con 1600 géneros y 24000 especies. Se distribuye en todos los continentes excepto en la Antártida. La familia es muy especiosa en zonas templadas especialmente Rusia y Estados Unidos donde quizá se encuentra más de la mitad de sus especies. También se encuentra bien representada en América tropical.⁵

Es una Familia importante económicamente para el hombre, debido a que pueden ser usadas como alimentos, jardinería o plantas medicinales, algunas de ellas son: la camomila (*Santolina chamaecyparissus*), té de roca (*Jasonia glutinosa*), aliento de toro y espina de pez (*Achillea ageratum* y *Achillea millefolium*), hierba de renegado (*Othanthus maritimus*), donceles (especies de *Artemisia*), caléndula (*Calendula officinalis*).⁶

1.1.2 Género *Trixis*

Es un género de plantas perteneciente a la familia asteraceae.

Comprende 37 especies predominantemente arbustivas, 16 de las cuales crecen exclusivamente en México y América central, la especie *Trixis inula* se encuentra distribuida en Colombia y Venezuela, y las 21 especies restantes son de América del Sur.

El género fue descrito por Patrick Browne y publicado en *The Civil and Natural History of Jamaica*. La especie característica es: *Inula trixis* L.
= *Trixis inula* Crantz.⁷

1.1.3 Clasificación taxonómica

Una muestra de la especie vegetal fue llevada al Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Mayor de San Marcos, e identificada por el Mag. Hamilton Beltrán Santiago, investigador del Departamento de Etnobotánica y Botánica Económica, según el sistema de clasificación de A. Cronquist. (1988), se ubica en la siguiente categoría taxonómica. (Ver anexo 1)

DIVISION : MAGNOLIOPHYTA

CLASE : MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE : ASTERIDAE

ORDEN : ASTERALES

FAMILIA : ASTERACEAE

GÉNERO : TRIXIS

ESPECIE : *Trixis cacaliodes* (kunth) D. Don

NOMBRE VULGAR: "lingo-lingo"

1.1.4 Sinonimia

A *Trixis cacalioides* también se le conoce como: lingo- lingo, coca inca, inga, hierba linda, hierba dinga.⁸

1.1.5 Descripción morfológica

Arbustos de hasta 1.50 m de altura, hojas sésiles o cortamente pecioladas; 2,5-7 cm de largo; 0,8-1,8 cm de ancho. Capítulos en pseudocorimbos, involucre cilíndrico, 1 - seriado, formado por 5-6 brácteas. Flores blancas y amarillas, 5-7 por capítulo. Anteras con colas glabras. Papús blanco o amarillo pálido, persistente. Inflorescencia en panícula terminal con pocas flores amarillas.⁹

1.1.6 Distribución y Hábitat

Se distribuye en Perú, Bolivia, Chile y en Argentina en las provincias biogeográficas. Se halla en suelos secos, en laderas de cerros, pedregales, desiertos y salitres, desde el nivel del mar hasta los 3000 m.s.m.⁹

1.1.7 Estudios Fitoquímicos y Usos populares

***Trixis cacalioides* (kunth) D. Don**

Este arbusto que se desarrolla a lo largo de toda nuestra costa y parte de la sierra, fue estudiado por primera vez en nuestro país alrededor del año 1950, aislándose de su raíz el ácido pipitazoico, el cual se evaluó y comprobó su actividad purgante en el modelo de órgano aislado de asa

intestinal de cobayo; verificándose además, la presencia de grasas, ceras, resinas, ácidos orgánicos, celulosa y sales minerales.⁸ También se evaluó y comprobó la actividad antiinflamatoria.¹⁰

Usado popularmente como diaforético en Argentina.¹¹

Industrialmente se usa para la confección de parches o yesos.¹²

No existen muchos estudios de la especie *Trixis cacalioides* a nivel mundial, pero si existen reportes de 5 especies de este género de las 37 especies que existen.

Trixis paradoxa; esta especie fue recolectada en Perú y se identificó los siguientes componentes: los triterpenos β -amirina, acetato de lupeol y lupeol, la cumarina perefiorina, el flavonoide xantomicrol y el nuevo sesquiterpeno trixol,¹³ lactonas sesquiterpénicas, y ésteres sesquiterpénicos.¹⁴

Trixis divaricata: Se han encontrado flavonoides, taninos,¹⁵ trixikingolido III,¹⁶ saponinas, resinas y un alcaloide que causa parálisis sensorial y motora en animales.¹⁷ La esencia se caracteriza por la presencia predominante de hidrocarburos sesquiterpénicos (78.9%) y en menor proporción por sesquiterpenos oxigenados (11.2 %); entre los componentes sesquiterpénicos se identificó: β -Elemeno, β -Cariofileno y Germacreno D. Es usado popularmente como contraveneno en accidentes ofídicos y en artritis crónica.¹⁸ Se comprobó la actividad

antiulcerogénica del extracto hidroalcohólico en ratas,¹⁵ con propiedades diaforéticas, diuréticas,¹⁷ vulnerario, detersorio y rubefaciente.¹⁹

En la especie *Trixis pallida*, se identificaron trixannolides.²⁰

Se aislaron flavonoides y se determinó la actividad tripanocida en la especie *Trixis vauthieri*.²¹

En la especie *Trixis inula* se aisló aceites esenciales que contenían sesquiterpenos, como germacreno, biciclogermacreno y en menor proporción el valenceno.²⁰ También se comprobó la actividad antiinflamatoria y analgésica.²¹

1.2 Músculo liso

El músculo liso se encuentra predominantemente en las paredes de los órganos y tubos huecos y puede dividirse en seis grandes grupos: vascular, gastrointestinal, urinario, respiratorio, reproductivo y ocular.

El músculo liso intestinal y bronquial es el músculo liso de unidad única, denominado así porque las células musculares individuales se contraen como una sola unidad. Todas las fibras del músculo liso de unidad única están conectadas eléctricamente entre sí, de modo que un potencial de acción en una célula se propaga rápidamente a través de las uniones en hendidura para hacer contraer a toda la capa del tejido.²²

La contracción del músculo liso puede estar estimulada por múltiples tipos de señales: señales nerviosas, estimulación hormonal, distensión del

músculo y otros diversos estímulos; esto se debe a que la membrana del músculo liso tiene muchos tipos de proteínas receptoras que pueden iniciar el proceso contráctil.²³

1.2.1 Regulación de la contracción

1.2.1.1 Regulación de la contracción por los iones calcio.

El aumento de la concentración citosólica de Ca^{2+} es la señal para iniciar la contracción. El Ca^{2+} entra en la célula desde el líquido extracelular y es liberado desde el retículo sarcoplásmico. Sin embargo, como los depósitos de Ca^{2+} en el músculo liso son limitados, las contracciones sostenidas dependen de la entrada continua de Ca^{2+} desde el líquido extracelular. La entrada de cantidades variables de Ca^{2+} en la fibra muscular crea contracciones cuya fuerza es graduada según la fuerza de la señal de Ca^{2+} . El Ca^{2+} entra en la célula del músculo liso a través de los canales de membrana abiertos por despolarización, estiramiento de la membrana o señales químicas.

La liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico esta mediada fundamentalmente por un receptor–canal activado por IP_3 .

La liberación de Ca^{2+} citosólico plasmático inicia la contracción a través de la regulación de la miosina ATPasa. Los iones calcio se unen a la calmodulina (CaM) y obedecen a la ley de acción de masas. El complejo Ca^{2+} - calmodulina activa luego una enzima denominada cinasa de la cadena liviana de miosina. Esta enzima aumenta la actividad de la

miosina ATPasa, al fosforilar las cadenas de proteínas livianas en la cabeza de miosina. Cuando la actividad de miosina ATPasa es alta, la unión de la actina y los ciclos de los puentes cruzados aumentan la tensión en el músculo. Por lo tanto, la contracción del músculo liso está controlada fundamentalmente a través procesos reguladores ligados a la miosina.²²

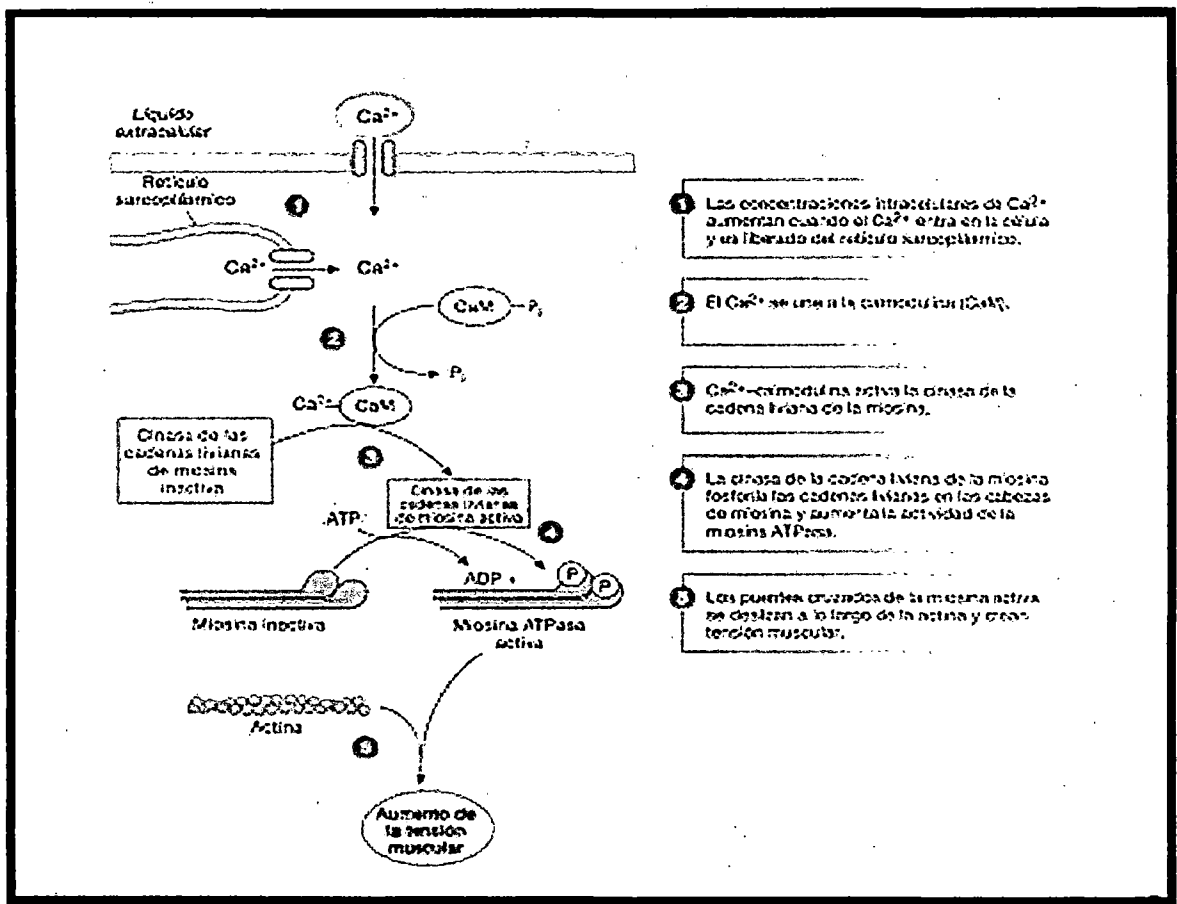


Figura N°01: Contracción del músculo liso. (Adaptado de Libro Fisiología Humana. Un Enfoque Integrado. Autor: Silverthorn Unglaub Dee).

1.2.1.2 Regulación de la contracción por señales químicas:

La contracción del músculo liso está controlada por distintas señales químicas que pueden ser inhibitoras o excitatorias. En general un estímulo despolarizante hace que la célula tenga mayor probabilidad de contraerse. La hiperpolarización de una célula disminuye la probabilidad de contraerse.

Un neurotransmisor puede tener diferentes efectos en diferentes tejidos, dependiendo a los receptores a los que se une. Así, tanto el neurotransmisor como su receptor determinan la respuesta de un músculo liso a la estimulación nerviosa. Los receptores adrenérgicos y colinérgicos muscarínicos actúan a través de los sistemas de segundos mensajeros IP_3 y AMP_c .

Los músculos lisos de los aparatos digestivo y respiratorio responden a sustancias químicas llevadas por la sangre o liberadas localmente.²²

1.2.2. Músculo liso intestinal

Se han identificado una docena o más de sustancias neurotransmisoras distintas liberadas por las terminaciones nerviosas de los diversos tipos de neuronas entéricas, como la acetilcolina, que provoca contracciones; y la noradrenalina casi siempre inhibe.

Las fibras del sistema parasimpático craneal (liberan acetilcolina) inervan en menor proporción al intestino, alcanzando hasta la primera mitad del intestino grueso.²⁴

En las células musculares lisas del intestino donde predominan los receptores M_3 , la activación muscarínica estimula principalmente a la proteína G, que desencadenan la activación de la PLC, con la consiguiente producción de IP_3 e IP_4 (movilización de Ca^{2+}) y de diacilglicerol que activa a la PKC; generando así la contracción muscular.²⁵

1.2.2.1 Espasmos intestinales

El dolor cólico abdominal es un síntoma que se manifiesta cuando los músculos de los órganos digestivos se contraen de forma espasmódica.

Los espasmos son contracciones musculares involuntarias exageradas y persistentes que puede afectar a los músculos estriados (voluntarios) y las fibras musculares lisas (involuntarias) de los órganos internos, este es el caso de los músculos de los bronquios (broncoespasmo o broncoconstricción) y del intestino (espasmo intestinal).²⁶

Los espasmos también se pueden considerar como una contracción súbita, violenta e involuntaria de un músculo o grupo muscular.²

1.2.2.1.1 Relajación del músculo liso intestinal

El sistema simpático inerva prácticamente todas las regiones del tubo digestivo, sin mostrar preferencia por las porciones cercanas a la cavidad bucal y al ano, como sucede con el parasimpático. Las terminaciones nerviosas simpáticas liberan, sobre todo, noradrenalina, aunque también

secretan pequeñas cantidades de adrenalina. En general su estimulación inhibe la actividad del tubo digestivo.²⁴

Los receptores que se encuentran en el intestino son: α_1 , α_2 , β_1 , β_2 .²⁷

1.2.2.1.2 Tratamiento farmacológico:

Antagonistas colinérgicos y espasmolíticos:

a) **Con estructura terciaria:** Los alcaloides naturales atropina y escopolamina, y los sintéticos trimebutina y dicitloverina.

b) **Con estructura cuaternaria:** Los derivados de los alcaloides naturales bromuro de butilescopolamina, metilbromuro de homatropina, bromuro de metilescopolamina, metilbromuro de octatropina, y los sintéticos otilonio y pinaverio que pueden, además reducir el movimiento de calcio.

Como espasmolíticos no anticolinérgicos, de acción directa sobre fibra muscular lisa, se encuentran la papaverina y la mebeverina. Son fármacos que relajan la fibra muscular lisa de la pared gastrointestinal por un mecanismo directo, es decir, no mediado por receptores de transmisores actualmente conocidos. Es posible que actúen intracelularmente, interfiriendo alguno de los procesos moleculares relacionados con calcio, necesarios para producir la contracción muscular. Por ello, su actividad inhibidora es amplia, sea cual fuere el estímulo desencadenante de la contracción o espasmo, y por

consiguiente más intensa que la de los fármacos estrictamente anticolinérgicos.

El fármaco prototipo es papaverina, cuya acción miorrelajante no se limita al tubo digestivo, sino que actúa también a nivel de las vías urinarias y vasos sanguíneos.²⁸

1.2.3 Músculo liso bronquial

El músculo liso de las vías aéreas es una célula mesenquimal habilitada para expresar una notable plasticidad fenotípica, cuya contracción y relajación están sometidas a regulación neurohormonal y moduladas por un conjunto de mecanismos diseñados para funcionar de manera integrada.²⁹

La mayor densidad de receptores muscarínicos se encuentra en la musculatura lisa bronquial, en menor grado en los bronquiolos proximales y están ausentes en los distales.²⁵

1.2.3.1 Broncoconstricción

Algunas fibras nerviosas parasimpáticas procedentes de los nervios vagos penetran en el parénquima pulmonar, secretando acetilcolina, que al activarse produce una constricción (broncoconstricción) leve a moderada de los bronquiolos. A veces los nervios parasimpáticos son activados por reflejos que se originan en los pulmones. La mayor parte de los mismos comienza con irritación de la membrana epitelial de las propias vías.

respiratorias, iniciada por gases irritantes, polvo, humo de cigarrillos o infección bronquial.³⁰

1.2.3.1.1 Relajación del músculo liso bronquial

El control directo de los bronquiolos por las fibras nerviosas simpáticas es relativamente débil porque pocas fibras de este tipo penetran hasta las porciones centrales del pulmón. Sin embargo, el árbol bronquial está muy expuesto a la noradrenalina y adrenalina que se liberan hacia la sangre por la estimulación simpática de la médula de las glándulas suprarrenales. Estas dos hormonas (especialmente la adrenalina, debido a su mayor estimulación de los receptores beta adrenérgicos) producen dilatación del árbol bronquial.³⁰

La estimulación de los receptores adrenérgicos de las vías aéreas provoca relajación de la musculatura lisa, inhibición de la liberación de mediadores de las células cebadas e incremento del aclaramiento mucociliar.³¹

1.2.3.1.2 Tratamiento farmacológico:

Los broncodilatadores se pueden clasificar en dos grandes grupos en función del mecanismo farmacológico que determina su actividad relajadora:

Los antagonistas selectivos (broncodilatadores indirectos) bloquean el efecto de los mediadores contráctiles actuando directamente sobre sus

receptores correspondientes o inhibiendo la síntesis y liberación del propio mediador.

Los antagonistas funcionales (broncodilatadores directos) engloban todas las sustancias que disminuye el tono del músculo liso bronquial, sea cual sea la naturaleza del estímulo contracturante. La relajación se consigue reduciendo la $[Ca^{2+}]$ o modificando la sensibilidad al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles de diversos modos, que incluyen entre otros, la activación del sistema mensajero de nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc); la inhibición de la degradación de dichos nucleótidos y la modulación de la actividad de los canales iónicos de la membrana celular .²⁹

Cuadro Nº 01: Clasificación de fármacos broncodilatadores²⁹

Antagonistas selectivos (broncodilatadores indirectos)	Antagonistas funcionales (broncodilatadores directos)
<p>Antagonistas muscarínicos</p> <p>Ipratropio</p> <p>Oxitropio</p> <p>Tiotropio</p> <p>Antagonistas de los receptores de los leucotrienos(LT1)</p> <p>Montelukast</p> <p>Zafirlukast</p> <p>Inhibidores de la 5-lipoxigenasa</p> <p>Zileutón</p> <p>Agonistas presinápticos con capacidad para suprimir la neurotransmisión colinérgica*</p> <p>Agonistas de los adrenoceptores $\alpha 2$</p> <p>Agonistas de los receptores colinérgicos M2</p> <p>Agonistas opioides</p>	<p>Agonistas de los adrenoceptores $\beta 2$</p> <p>Acción corta (salbutamol,terbutalina,...)</p> <p>Acción prolongada (salmeterol,formoterol)</p> <p>Agonistas no selectivos de los adrenoceptores β</p> <p>Isoproterenol</p> <p>Inhibidores no selectivos de las fosfodiesterasa</p> <p>Teofilina,aminofilina</p> <p>Inhibidores de las fosfodiesterasas III/IV *</p> <p>Ariflo</p> <p>Inhibidores selectivos de la fosfodiesterasa IV</p> <p>Agonistas de acción dual(adrenoceptores $\beta 2$ y receptores dopaminérgicos *)</p> <p>Sibendat</p> <p>Péptido auricular natriuretico *</p> <p>Prostaglandina (PG) E2 y agonistas del receptor PGE2 *</p> <p>Activadores de los canales de K^{+}*</p> <p>Antagonistas de los canales de Ca^{2+}*</p> <p>Inhibidores de la proteincinasa C *</p> <p>Anticalmodulínicos *</p> <p>Óxido nítrico *</p> <p>Nitratos, nitroprusiato sódico</p>

*Sin eficacia clínica comprobada.

CAPÍTULO II:
PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiales

2.1.1. Materiales, reactivos y equipos

➤ Materiales biológicos

- Hojas y tallos de *Trixis cacalioides* (Kunth) D. Don.-"lingo-lingo".
- Cobayos machos raza Hartley de 150-200 g

➤ Materiales de vidrio

- Matraz
- Probeta
- Vaso precipitado
- Varilla
- Agitador
- Frascos x 3 L
- Placa Petri

➤ Insumos

- Etanol de 96°
- Agua Destilada

➤ Reactivos y Fármacos

- Acetilcolina
- Histamina

➤ Equipos

- Balanza analítica
- Cocinilla

- Bomba al vacío
- Evaporador rotatorio Heidolph modelo laborota 4000
- Baño de órgano aislado
- Quimógrafo Speed Chart For
- Bomba termostato (made in Hungary)

➤ **Otros**

- Papel de filtro
- Equipo de disección
- Soporte universal
- Mascarillas
- Guantes
- Papel de aluminio
- Jeringas de 1 mL
- Hilo de seda

2.2 Métodos y procedimientos

2.2.1 Estudio fitoquímico

2.2.1.1 Recolección de la muestra botánica.

El material vegetal *Trixis cacalioides* (Kunth) D. Don conocido como “lingo-lingo”, fue recolectada por las autoras, en el distrito del Yauca del Rosario, Provincia de Ica, Departamento de Ica, en el mes de mayo del 2013.



Figura N° 02: *Trixis cacalioides* “lingo-lingo” en su hábitat natural.

2.2.1.2 Selección, secado y conservación de la muestra.

El material recolectado fue limpiado, se separaron las hojas y tallos del resto de la planta seleccionando las que se encontraban en buen estado, desechándose las hojas y tallos deterioradas y picadas. Se secaron bajo sombra y a temperatura ambiente por un periodo de 15 días (hojas) y 30 días (tallos).

Posteriormente las hojas fueron trituradas groseramente utilizando un molino, en caso de los tallos estos fueron cortados con una tijera, ambos fueron conservados en frascos color ámbar herméticamente cerrados para su posterior estudio.

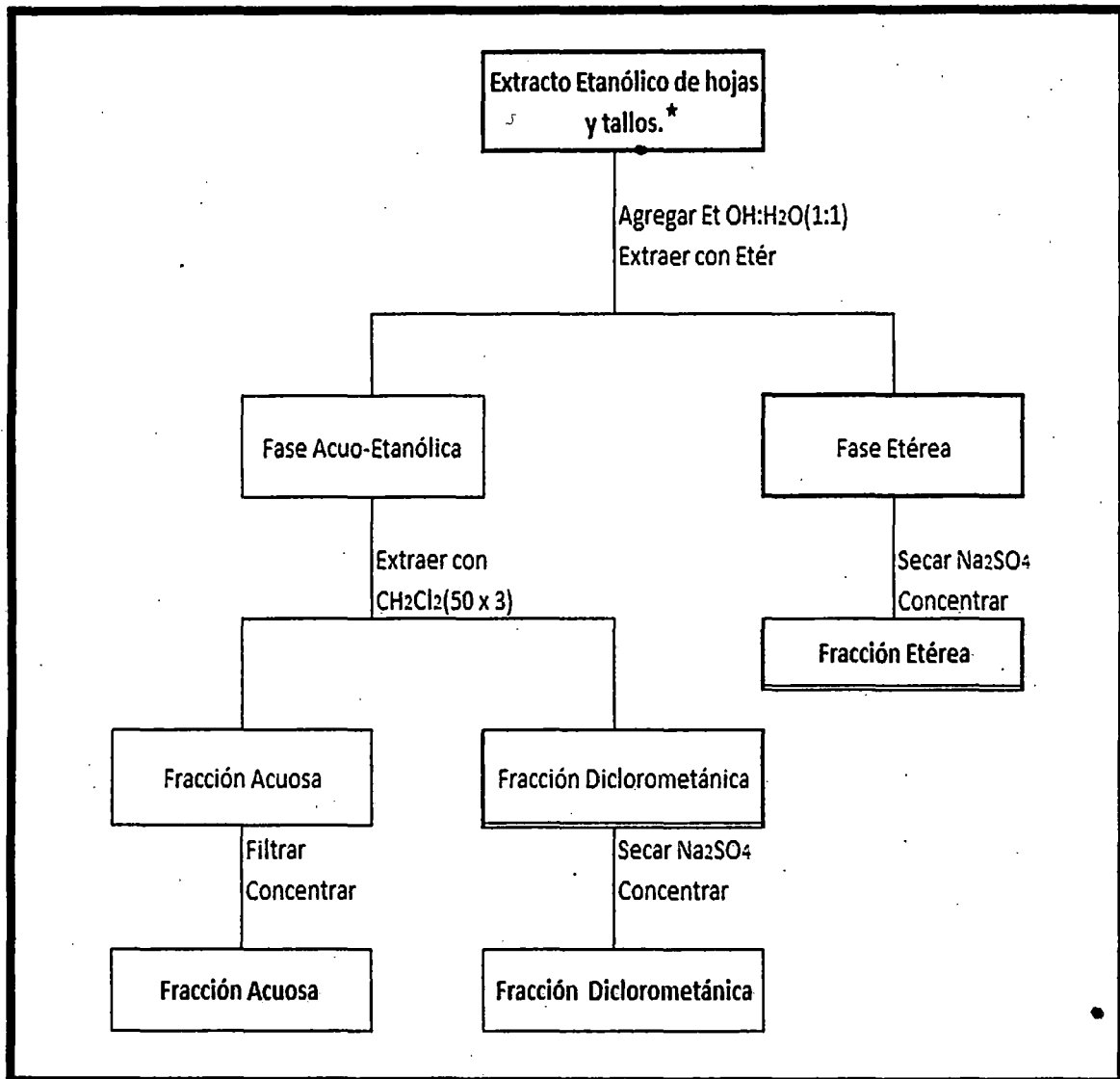
2.2.1.3 Obtención del extracto etanólico de hojas y tallos

Para la obtención del extracto etanólico de hojas se utilizó 2356 g de hojas secas y fragmentadas. La primera extracción se realizó mediante la técnica de maceración en frío durante 10 días previa agitación,³² la segunda extracción fue mediante la técnica de reflujo por un tiempo de 4 horas, el solvente utilizado fue: etanol de 96°. Se reunieron los extractos y se concentraron en un evaporador rotatorio (Heidolph modelo Laborota 4000) a presión reducida.

Para la obtención del extracto de tallos se utilizó 765 g de este material y se siguió el procedimiento antes mencionado (obtención del extracto etanólico de hojas)

2.2.1.4 Fraccionamiento del extracto etanólico de hojas y tallos

Los extractos etanólicos de hojas y tallos fueron disueltos en un volumen de etanol: agua destilada (1:1), mediante agitación hasta disolución, esta solución acuo-etanólica es trasvasada a una pera de bromo donde se realiza una extracción líquida - líquida hasta agotamiento con diversos solventes de diferente polaridad como éter de petróleo, diclorometano y agua destilada. Una vez obtenidos los extractos etéreo, diclorometánico y acuoso, se concentraron en un evaporador rotatorio (Heidolph modelo Laborota 4000) (ver Flujograma 01).



*Se procedió por separado para la obtención de los extractos de diferente polaridad.

FLUXOGRAMA N°01: Método para la obtención de los extractos de diferente polaridad de hojas y tallos de *Trixis cacaoides* "lingo-lingo"

2.2.1.5 Screening Fitoquímico ³³

2.2.1.5.1 Obtención de Fracciones

Con el fin de detectar los metabolitos secundarios presentes en las hojas y tallos de *Trixis cacalioides* "lingo-lingo", se realizó una marcha fitoquímica, basándose en la extracción con solventes de diferente polaridad.

El material seco y molido de hojas y tallos (50g), se colocan por separado en un matraz al que se añade 200 mL de etanol, se dejó macerar por 20 horas, bien cerrado a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se lleva a una extracción por reflujo de 4 horas. Se filtra en caliente y ese filtrado se le denomina **Fracción A**, de la cual se separa 2 mL para realizar reacciones de identificación. El resto se concentra hasta sequedad y presión reducida en una bomba de vacío a una temperatura menor de 40° C.

Luego se extrae con 15 mL de HCl 1% (2x 20 ml), se filtra y se obtiene 2 partes:

a) Insoluble:

Se lava hasta pH neutro con agua destilada, seguidamente se disuelve con 5 mL de diclorometano (CH_2Cl_2), a baño maría (37°C). Se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra, este filtrado constituye la **Fracción B**.

b) Solución Ácida: Se alcalinizó con 3 mL de hidróxido de amonio (NH_3) y se extrae con diclorometano (CH_2Cl_2) (2 x 25 ml). Se lava con agua destilada, obteniendo dos fases:

- **Fase Diclorometánica:** Se filtra y se deseca con Na_2SO_4 anhidro, obteniéndose la **Fracción C**.
- **Fase Acuosa:** Se satura con 5 g de Na_2SO_4 anhidro y se extrae con diclorometano: etanol (3:2) (2 x 25 mL), obteniéndose dos fases:
- ✓ **Fase Orgánica:** (Diclorometánica - Etanólica). Se lava con solución de sulfato de sodio anhidro (10mL), seguidamente la fase orgánica se deshidrata con 1g de sulfato de sodio anhidro. Se filtra y esto constituye la **Fracción D**.
- ✓ **Fase Acuosa:** A esta se adiciona los residuos acuosos obtenidos del lavado de la fase orgánica esto constituye la **Fracción E**.

Métodos de análisis. Detección de grupos funcionales y metabolitos.³⁴

A cada una de las fracciones obtenidas en la marcha fitoquímica preliminar se la realizaron reacciones de identificación de metabolitos secundarios. (Ver flujograma 02)

FRACCIÓN A

❖ Detección de taninos

- **Reacción de gelatina – cloruro de sodio**

La porción de la Fracción A seca, se disuelve en agua destilada y se divide en tres porciones:

1. A una porción se le agrega NaCl 5%.
2. A la otra gelatina al 1%.
3. A la tercera se le adiciona gelatina-sal.

Es positiva la reacción si precipita en la 3° o en la 2° y 3°. Si solamente ocurre con la 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 agregó una gota de la solución de FeCl_3 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:

- Blanco: solución de Ninhidrina al 2%
- Una gota de la Fracción A + una gota del reactivo Ninhidrina al 2%.

Luego del secado a temperatura ambiente las tiras de papel se colocan en la estufa a $110 - 120^\circ\text{C}$ hasta la aparición de un color en el blanco. La reacción es positiva si el papel de la muestra presenta un color azul violáceo.

❖ **Detección de flavonoides**

• **Reacción de Shinoda**

En una placa de porcelana se vierten gotas de la **Fracción A**, 5 limaduras de Mg y 2 gotas de HCl concentrado.

La reacción es positiva si dan coloración rojo, anaranjado y violeta.

FRACCIÓN B

❖ **Detección de Esteroides y/o Triterpenos**

• **Reacción de Liebermann-Burchard.**

A la muestra seca disuelta con CH_2Cl_2 , se le añade 5 gotas de ácido acético y 3 mL de anhídrido acético / ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado (50:1).

La reacción es positiva si aparecen colores verde o azul violáceo (vías rojo o azul).

❖ **Detección de Antraquinona**

- **Reacción de Borntrager.**- Sobre el resto de la **Fracción B** se agregan 5 mL de NaOH 5% y se agita suavemente. La reacción es positiva si la fase acuosa toma un color rojo.

FRACCIÓN C

❖ **Detección de Esteroides y/o Triterpenos**

- **Reacción de Liebermann Burchard:** Anteriormente descrita (Fracción B).

❖ **Detección de Alcaloides:**

El resto de la fracción C se evapora a sequedad y luego se agrega 2 mL de HCl 1% filtrar. Se realizan las reacciones de precipitación de Dragendorff, Mayer, 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 descrita anteriormente.

❖ **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 calienta durante 10 minutos a 100°C. Enfriar, luego se adiciona 2 mL de agua y 0.4 mL de alcohol amílico, agitar y observar el color en la fase amílica.

La reacción se considera positiva si aparece un color que va desde rosado débil hasta carmesí oscuro.

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

❖ **Detección de Esteroides y/o Triterpenos :** Reacción de Liebermann Burchard

❖ **Detección de Alcaloides:** Reacción de Dragendorff, Mayer, Wagner.

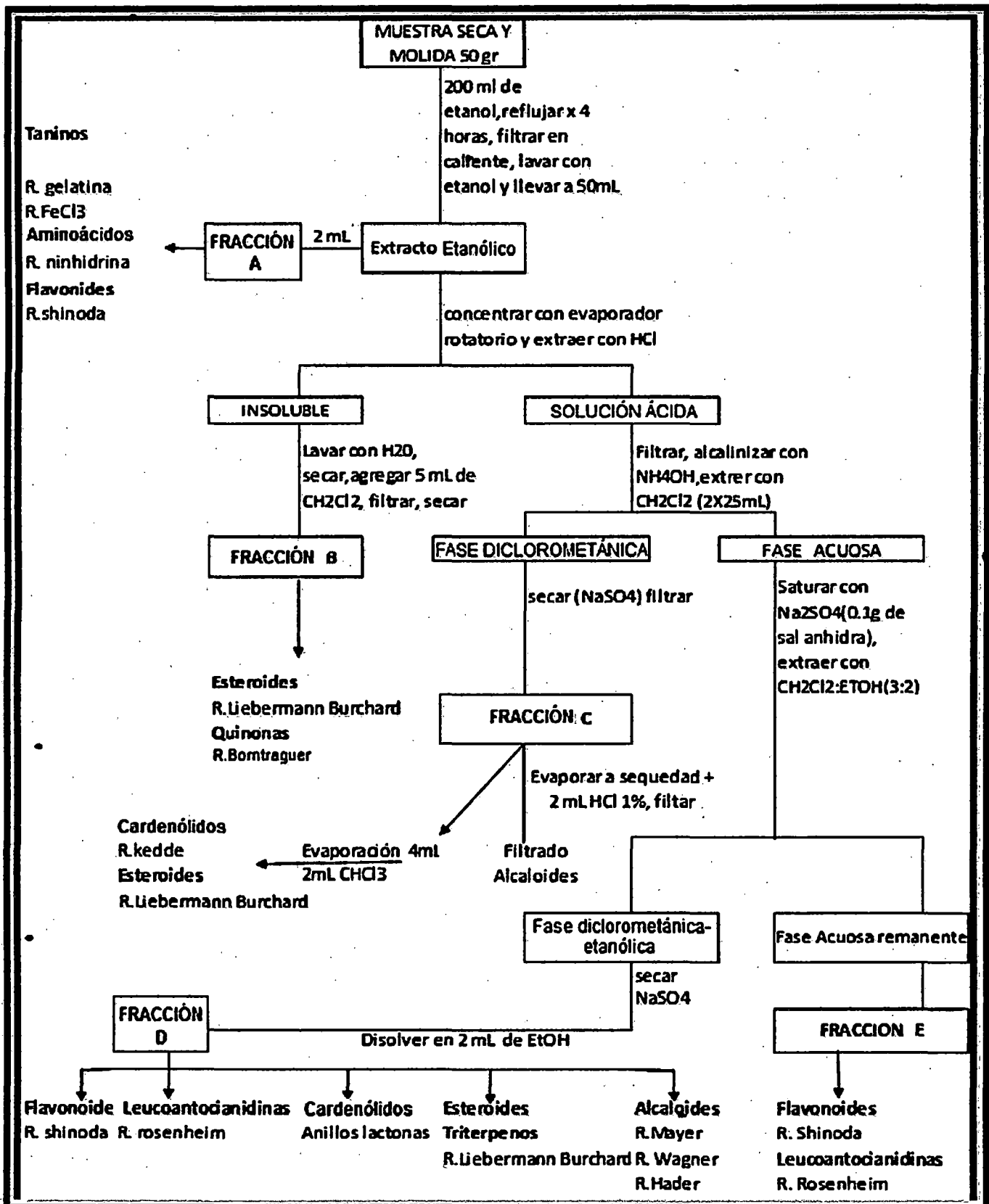
FRACCIÓN E

- ❖ **Detección de Flavonoides:** Reacción de Shinoda
- ❖ **Detección de Leucoantocianidinas:** Reacción de Rosenheim

FRACCIÓN F

A 1g de droga seca, agregar 20 mL de agua destilada, hervir durante 15 minutos, luego filtrar en caliente y completar a volumen (10mL). Enfriar y esto constituye la **Fracción F**.

- ❖ **Detección de Saponinas:**
 - **Prueba de espuma.-** En dos tubos de ensayo se agita 2.5mL de extracto por un minuto. Dejar reposar por 15 minutos y observar la formación de espuma. Se considera negativa la reacción si la altura de la espuma es menor a 5 mm.



FLUXOGRAMA N°02: Esquema de Marcha Fitoquímica.

2.2.2 Estudio farmacológico antiespasmódico y broncodilatador

- **Muestra en estudio:** Extractos etéreo, diclorometánico y acuoso de hojas y tallos.
- **Material biológico:** En los modelos antiespasmódicos y broncodilatador se utilizaron cobayos albinos machos raza Hartley con peso de 150-200 g adquiridos del Instituto Nacional de Salud "Centro de producción de biológicos". Estos fueron alojados en grupos de 2 por jaula y acondicionados por una semana, con libertad de comer y beber. Para los ensayos los animales se mantuvieron en ayunas durante 24 horas, con acceso al agua.
- **Equipos:** Baño de órgano aislado, marca PANLAB-LE 13206
- **Líquido nutricio:** Solución Tyrode, solución Krebs.

2.2.2.1 Determinación de la actividad antiespasmódica en íleon aislado de cobayos.³⁵

Fundamento: Se basa en la capacidad de inhibir la motilidad intestinal y la contracción producida por agonistas de receptores a nivel del músculo liso de íleon aislado de cobayo. Los agonistas utilizados fueron la acetilcolina e histamina.

Procedimiento: Se utilizaron cobayos (150-200 g) en ayunas con acceso a agua. Cada cobayo fue sacrificado mediante un golpe en la nuca y desangrado. Luego con una incisión de unos 10 cm en el abdomen se toma una porción del intestino delgado próximas al ciego, esta porción es

colocada en placas Petri con solución Tyrode a 37°C y oxigenado con una mezcla de oxígeno (95%), dióxido de carbono (5%). La porción de íleon a usar, se lava con solución Tyrode con la finalidad de eliminar posibles restos alimenticios de la luz intestinal.

Se tomó una porción del intestino de 2 cm, aproximadamente y se suspende en el baño de órgano aislado marca PANLAB-LE 13206 (25 mL) en una cámara de manera que el órgano mantenga una temperatura constante de 37°C mediante la circulación de agua temperada entre las paredes.

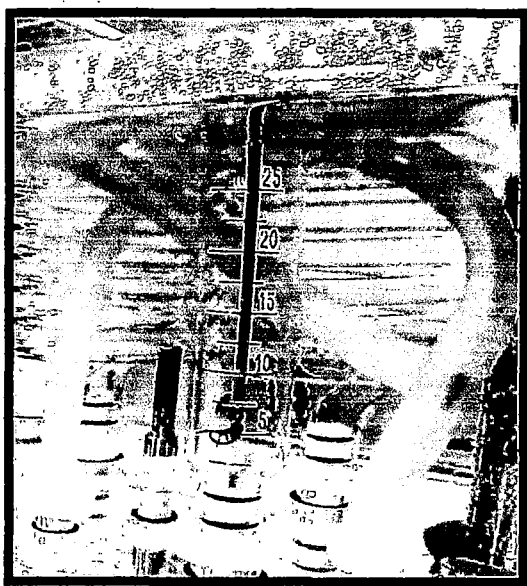


Figura N°03: Íleon aislado de cobayos.

- **Inducción de la contracción del músculo liso intestinal por la acetilcolina.**

La porción de intestino (íleon) introducida en la solución Tyrode se fija mediante ganchos e hilos a una palanca inscriptora. El órgano además de estar en una solución adecuada recibe una constante oxigenación con el dispositivo de burbujeo. El intestino se deja estabilizar por 20 minutos registrándose sus movimientos en un quimógrafo hasta obtener la gráfica de un movimiento basal constante. Se añade 0,1 mL acetilcolina al 0,1%, después de 6 segundos se observa una contracción sostenida en mm que se considera como el 100 %, la que persiste sin modificación (10 min) (Figura N° 04).

- **Evaluación del efecto espasmolítico de los extractos sobre la contracción inducida por acetilcolina.**

Se procede a probar los extractos: etéreo, diclorometánico y acuoso de hojas y tallos por separado a una concentración de 500 mg/mL (0,1 mL) disueltos en el líquido nutritivo (Tyrode), la cual se añade 30 seg después de iniciar la contracción máxima y se observa el descenso respectivo (Figura N° 05).

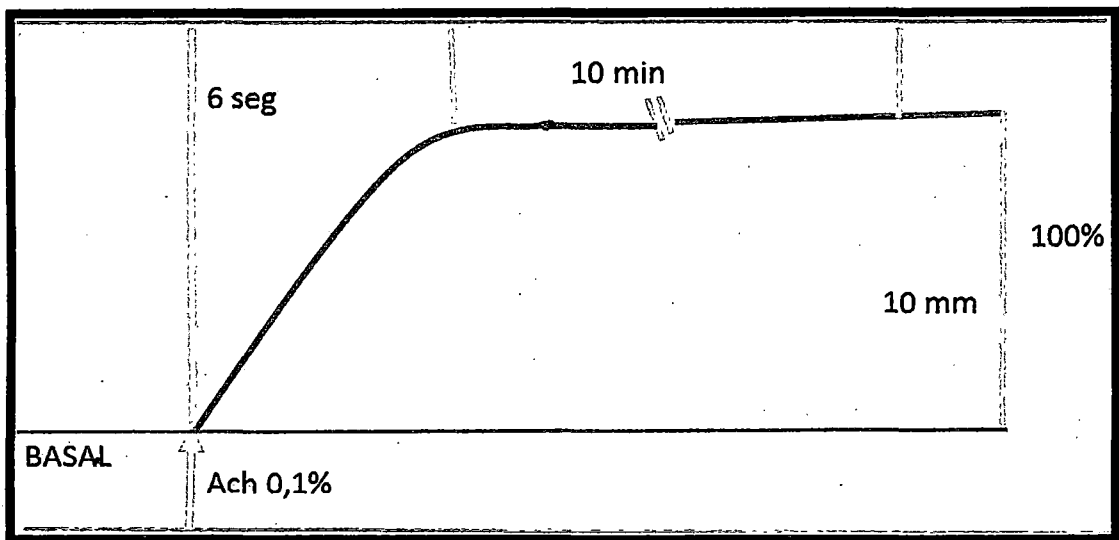


Figura N°04: Inducción de la contracción del músculo liso intestinal por acetilcolina.

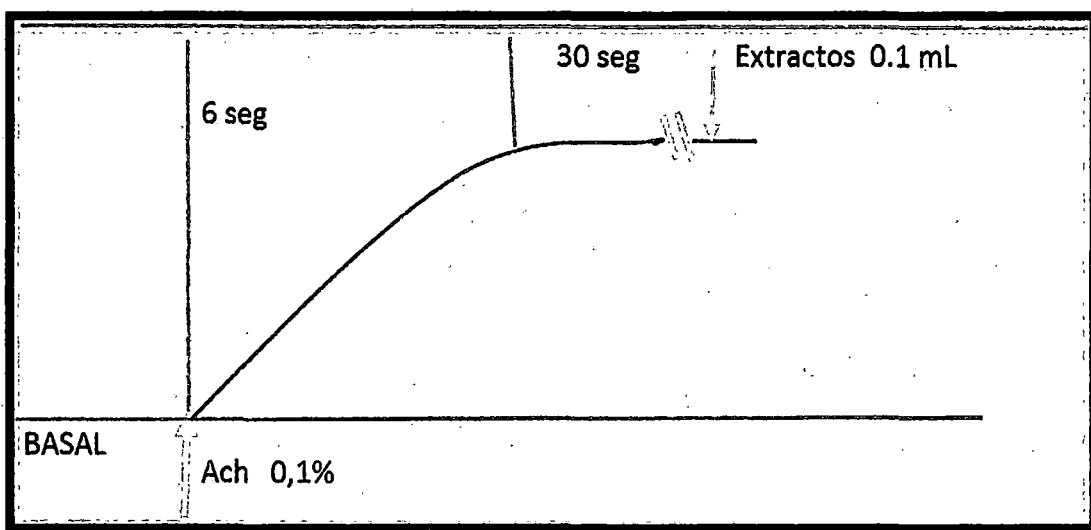


Figura N°05: Evaluación del efecto espasmolítico de los extractos sobre la contracción inducida por acetilcolina

- **Inducción de la contracción del músculo liso intestinal por histamina.**

La porción de intestino (íleon) introducida en la solución Tyrode se fija mediante ganchos e hilos a una palanca inscriptora. El órgano además de estar en una solución adecuada recibe una constante oxigenación con el dispositivo de burbujeo. El intestino se deja estabilizar por 20 minutos registrándose sus movimientos en un quimógrafo hasta obtener la gráfica de un movimiento basal constante. Se añade 0,1 mL de histamina 0,1% al baño de órgano, después de 6 segundos se observa la contracción sostenida en mm que se consideró como el 100 %, la que persiste sin modificación (10 min) (Figura N° 06).

- **Evaluación del efecto espasmolítico de los extracto sobre la contracción inducida por histamina.**

Se procede a probar los extractos: etéreo, diclorometánico y acuoso de hojas y tallos por separado, a una concentración de 500 mg/mL (0,1 mL) disueltos en el líquido nutricio (Tyrode), la cual se añade 30 seg. Después de iniciar la contracción máxima y se observa el descenso respectivo.

Cada ensayo se realiza por triplicado (n=3) y los resultados se expresan en porcentajes de actividad antiespasmódica. (Figura N° 07).

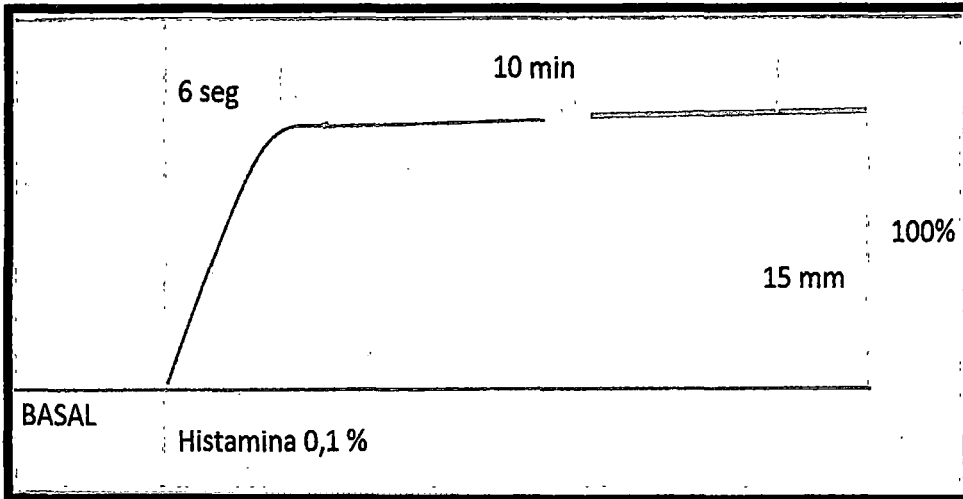


Figura N°06: Inducción de la contracción del músculo liso intestinal por histamina.

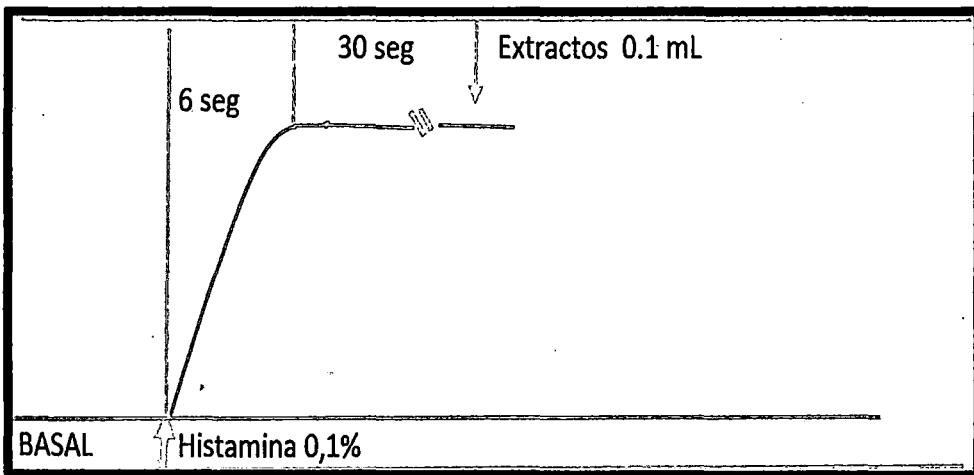


Figura N°07: Evaluación del efecto espasmolítico de los extractos sobre la contracción inducida por histamina.

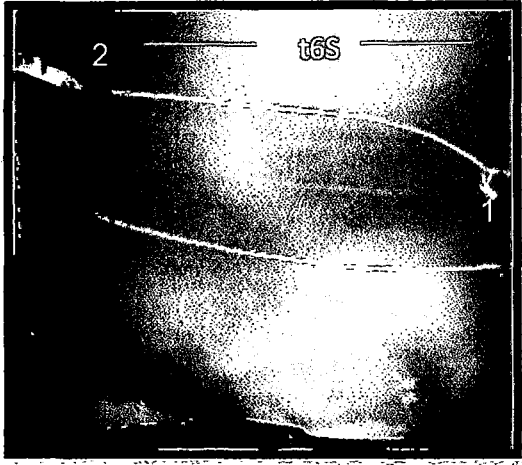


Figura N°08: Ejemplo de contracción inducida por acetilcolina en músculo liso de íleon aislado de cobayo. Dónde:

- 1: Estado basal del músculo liso.**
- 2: Contracción máxima ejercida por acetilcolina después de 6 segundos.**

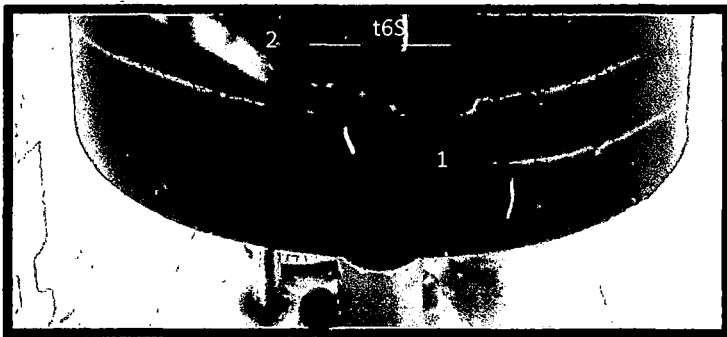


Figura N°09: Ejemplo de contracción inducida por histamina en músculo liso de íleon aislado de cobayo. Dónde:

- 1: Estado basal del músculo liso.**
- 2: Contracción máxima ejercida por Histamina después de 6 segundos.**

2.2.2.2 Determinación de la actividad broncodilatadora en cadena traqueal cobayos.^{36,37}

FUNDAMENTO: Se determina la actividad broncodilatadora del extracto activo mediante la evaluación de la relajación del músculo liso traqueal, el cual es sometido a sustancias constrictoras como la histamina y acetilcolina estos movimientos son registrados en un quimógrafo.

Procedimiento: Se utilizaron cobayos (150-200 g) en ayunos con acceso a agua. Cada cobayo fue sacrificado con golpe en la nuca y luego se procedió a cortar la garganta tan cerca de la cabeza como sea posible. La tráquea se disecciona fuera del animal, se transfiere a una placa que contiene solución de Krebs y se corta transversalmente entre los segmentos del cartilago, así como para dar un número de anillos del músculo traqueal. Varios de estos, por lo general aproximadamente seis, son unidos por medio de hilos, con el fin de formar una cadena, y se suspende en el baño de órgano aislado (25 mL) en una cámara, de manera que el órgano mantenga una temperatura constante de 37°C, mediante la circulación de agua temperada entre las paredes y aireada con una mezcla de oxígeno (95%) y dióxido de carbono (5%). Un extremo de la cadena es unido a un pasador fijo en el baño y otro a una palanca de escritura sobre un tambor ahumado para registrar la relajación del músculo liso traqueal.

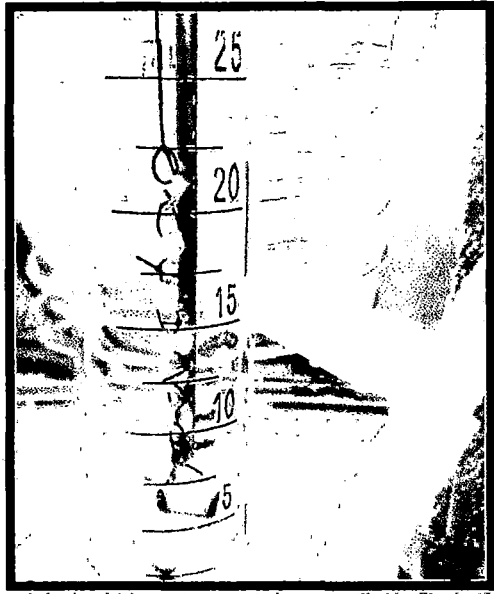


Figura N° 10: Cadena traqueal de cobayos.

- **Inducción de la contracción del músculo liso bronquial por la acetilcolina.**

La porción de cadena traqueal se deja estabilizar por 20 minutos registrándose sus movimientos en un quimógrafo, hasta obtener la gráfica de un movimiento basal constante. Se añade 0,1 mL de acetilcolina al 0,1%, después de 6 segundos se observa la contracción sostenida en mm que se considera como el 100 %, la que persiste sin modificación (10 min) (Figura N° 11).

- **Evaluación del efecto broncodilatador de los extractos sobre la contracción inducida por acetilcolina.**

Se procedió a probar los extractos: etéreo, diclorometánico y acuoso de hojas y tallos por separado a una concentración de 500 mg/mL disueltos

en el líquido nutritivo (Krebs), la cual se añadió 30 seg después de iniciar la contracción máxima y se observa el descenso respectivo. (Figura N° 12).

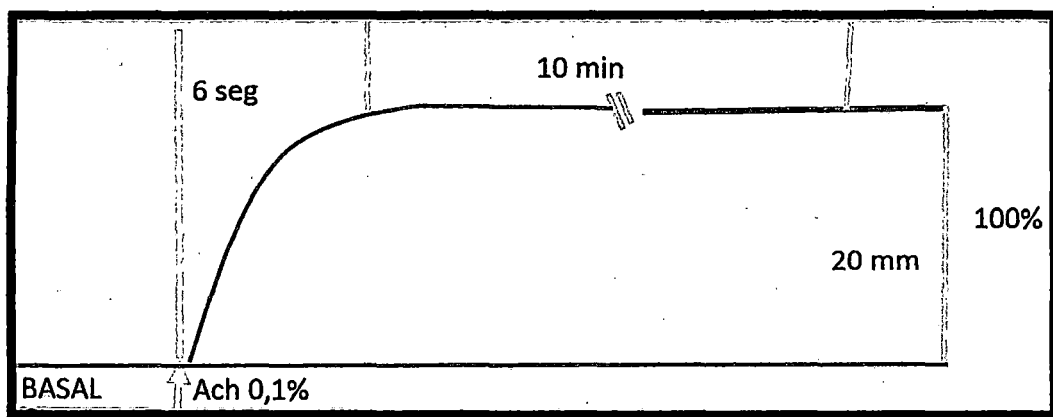


Figura N° 11: Inducción de la contracción del músculo liso bronquial por acetilcolina.

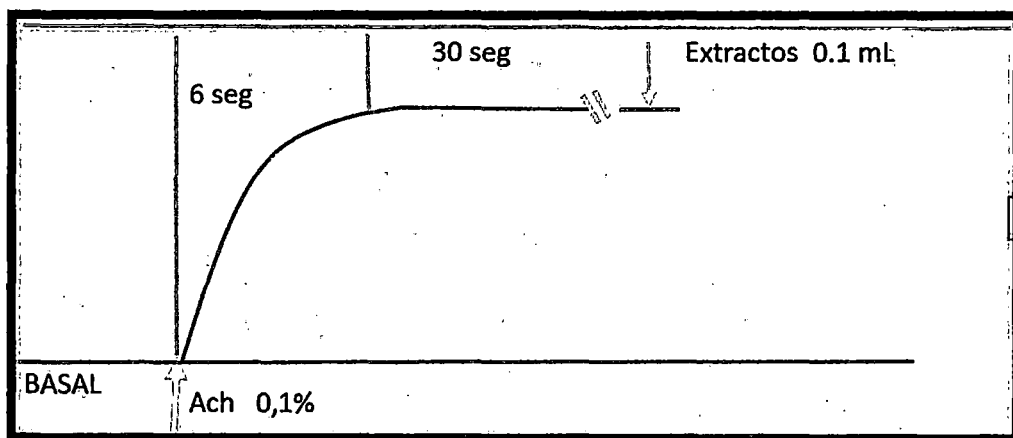


Figura N° 12: Evaluación del efecto broncodilatador de los extractos sobre la contracción inducida por acetilcolina.

- **Inducción de la contracción del músculo liso bronquial por histamina.**

La porción de cadena traqueal introducida en la solución Krebs se fija mediante ganchos e hilos en una palanca inscriptora. El órgano además de estar en una solución adecuada recibe una constante oxigenación con el dispositivo de burbujeo. La cadena traqueal se deja estabilizar por 20 minutos registrándose sus movimientos en un quimógrafo hasta obtener la gráfica de un movimiento basal constante. Se añade 0,1 mL de histamina 0,1% al baño de órgano, después de 6 segundos se observa la contracción sostenida en mm que se considera como el 100 %, la que persiste sin modificación (10 min) (Figura N° 13).

- **Evaluación del efecto broncodilatador de los extracto sobre la contracción inducida por histamina.**

Se procedió a probar los extractos: etéreo, diclorometánico y acuoso de hojas y tallos por separado a una concentración de 500 mg/mL, disueltos en el líquido nutricio (Krebs), la cual se añadió 30 seg después de iniciar la contracción máxima y se observa el descenso respectivo.

Cada ensayo se realizó por triplicado (n=3) y los resultados se expresan en porcentajes de actividad broncodilatadora. (Figura N° 14).

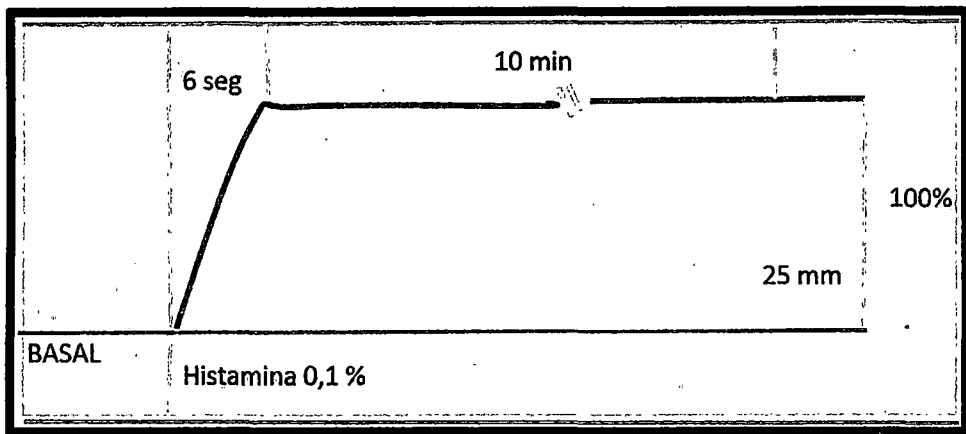


Figura N° 13: Inducción de la contracción del músculo liso bronquial por histamina.

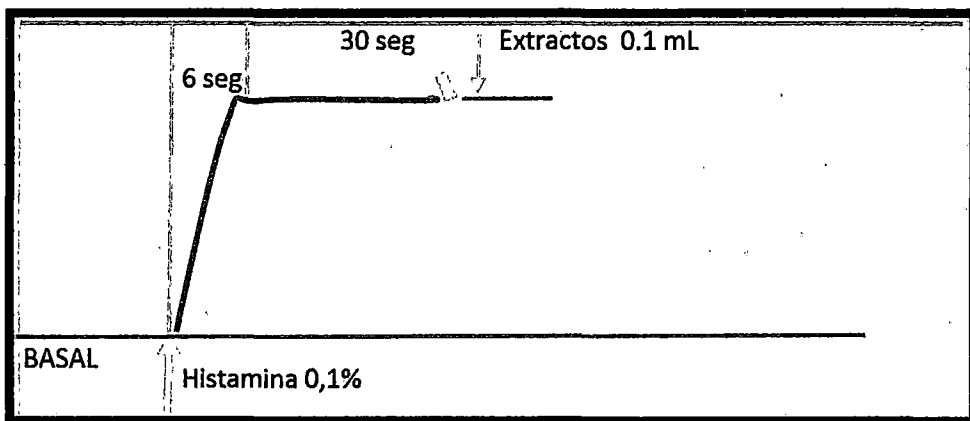


Figura N° 14: Evaluación del efecto broncodilatador de los extractos sobre la contracción inducida por histamina.

Fórmula para hallar el porcentaje de relajación del músculo liso intestinal y bronquial de cobayos.

$$\% \text{ de relajación} = \frac{\bar{X} \text{ MLR} \times 100}{\bar{X} \text{ MLC}}$$

Dónde:

\bar{X} MLR = Promedio del músculo liso relajado (mm).

\bar{X} MLC = Promedio de músculo liso contraído (mm)

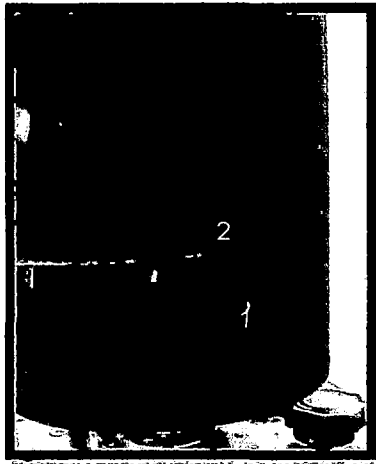


Figura N° 15: Ejemplo de contracción inducida por histamina en músculo liso de tráquea aislada de cobayo, donde:

1: Estado basal del músculo liso.

2: Contracción máxima ejercida por Histamina 0.1% después de 6 segundos.

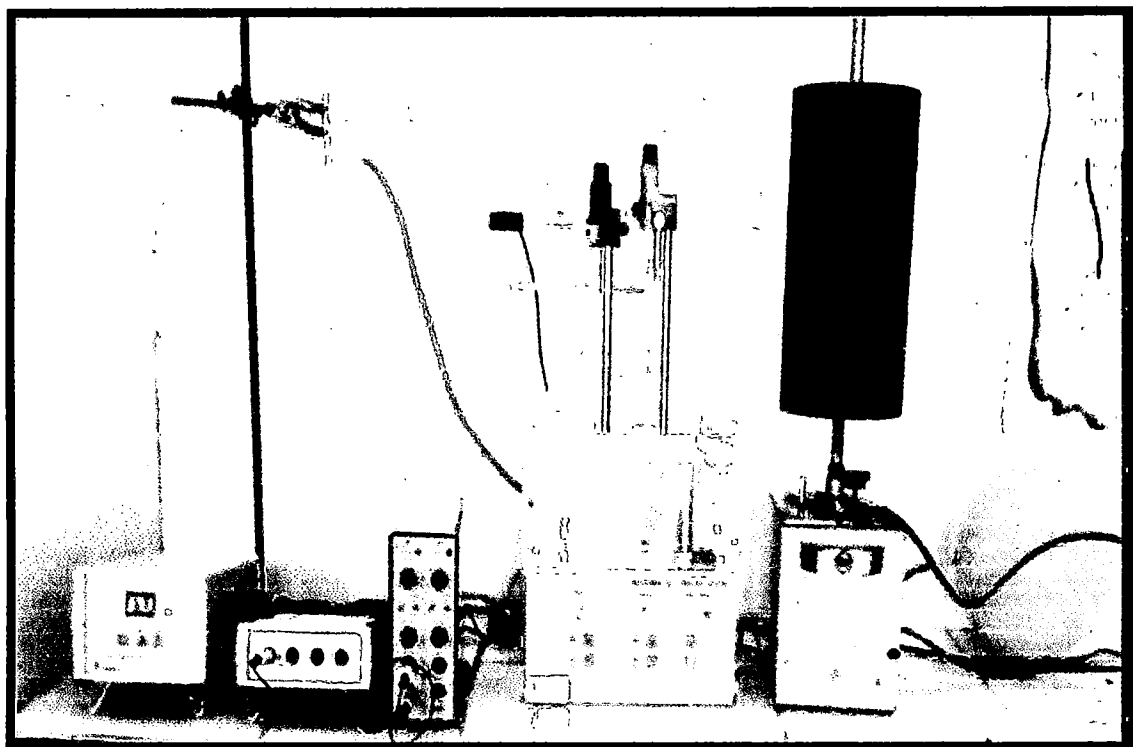


Figura N° 16: Equipo de baño de órganos marca PANLAB-LE 13206 del Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

CUADRO N° 02

**METABOLITOS SECUNDARIOS IDENTIFICADOS EN EL EXTRACTO
ETANÓLICO DE HOJAS Y TALLOS DE *Trixis cacaoides* (kunth)**

D.Don "lingo-lingo".

FRACCIONES	METABOLITOS SECUNDARIOS	REACCIONES	RESULTADOS	
			HOJAS	TALLOS
A	Flavonoides	Shinoda	+	+
	Aminoácidos	Reacción de Ninhidrina	+	+
	Taninos	Cloruro férrico	+	+
B	Triterpenos y/o esteroides	Reacción de Lieberman Burchard	+	+
	Antraquinonas	Reacción de Borntrager	-	-
C	Alcaloides	Dragendorff	-	-
		Wagner	-	-
		Mayer	-	-
	Triterpenos y/o esteroides	Reacción de Lieberman Burchard	+	+
D	Flavonoides	Shinoda	+	+
	Leucoantocianidinas y/o catequinas	Reacción de Rosenheim	-	-
	Triterpenos y/o esteroides	Reacción de Lieberman Burchard	+	+
	Alcaloides	Dragendorff	-	-
		Wagner	-	-
Mayer		-	-	
E	Flavonoides	Shinoda	+	+
	Leucoantocianidinas y/o catequinas	Reacción de Rosenheim	+	+
F	Saponinas	Prueba de Espuma	+	+

(-) = Ausencia, (+) = Presencia

Fuente: Datos de las autoras-Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.ICA 2013

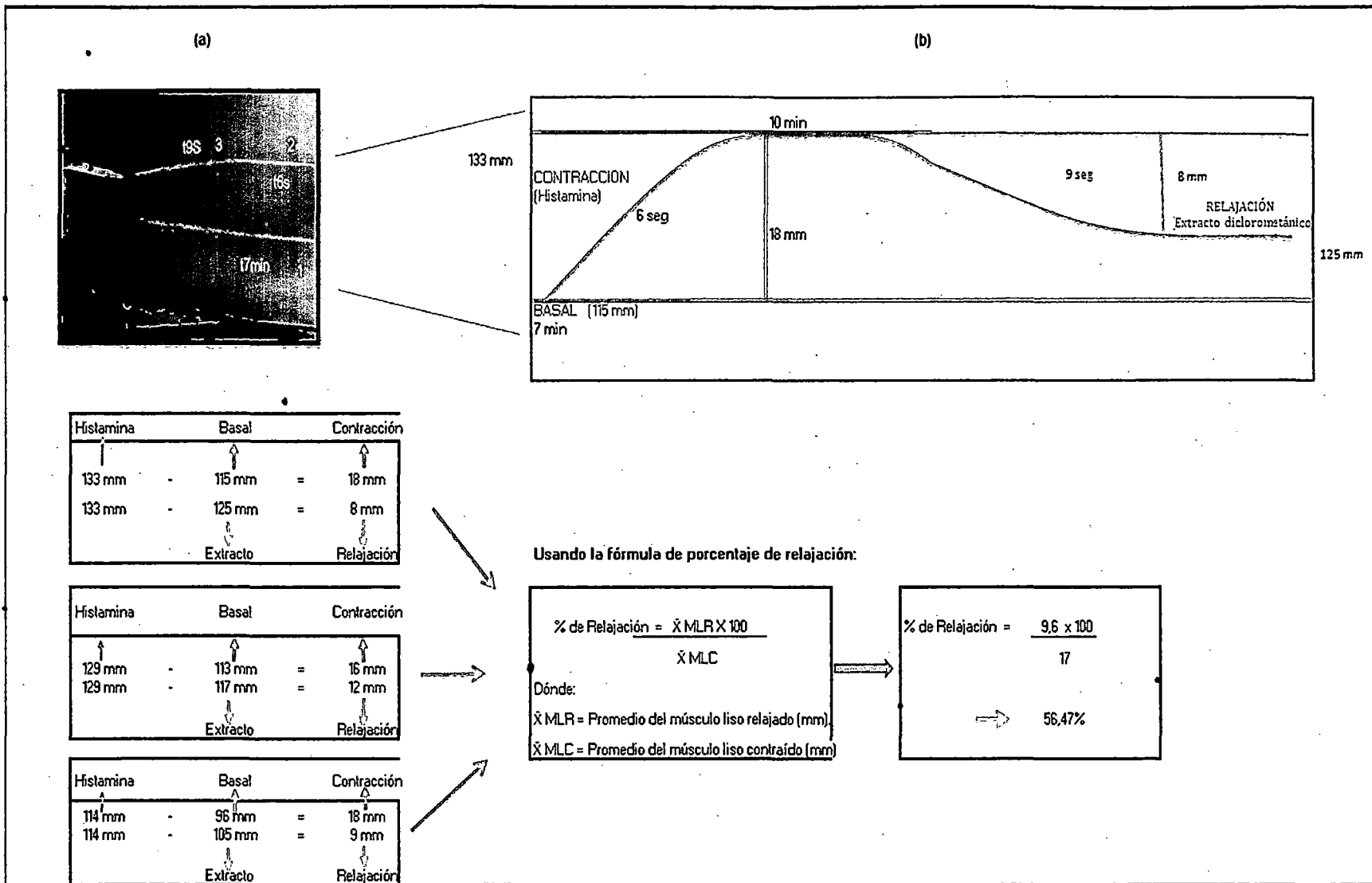


Gráfico N°01: Pasos para hallar el porcentaje de relajación. (a) Contracción- Relajación del músculo liso de ileon de cobayo. (b) Representación de Contracción - Relajación de músculo liso de ileon de cobayo.

CUADRO N°03

EFFECTO ANTIESPASMÓDICO DE LOS EXTRACTOS DE DIFERENTE POLARIDAD DE HOJAS DE *Trixis cacalloides*, SOBRE LA CONTRACCIÓN PRODUCIDA POR ACETILCOLINA

Grupo Experimental	Concentración	n°	Porcentaje de relajación
Extracto Etéreo	500 mg/mL	3	21,83 %
Extracto Diclorometánico	500 mg/mL	3	19.06%
Extracto Acuoso	500 mg/mL	3	52.53%

Fuente: Datos de las autoras-Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.ICA 2013

CUADRO N°04

EFFECTO ANTIESPASMÓDICO DE LOS EXTRACTOS DE DIFERENTE POLARIDAD DE HOJAS de *Trixis cacalioides*, SOBRE LA CONTRACCIÓN PRODUCIDA POR HISTAMINA

Grupo Experimental	Concentración	n°	Porcentaje de relajación
Extracto Etéreo	500 mg/mL	3	36,28%
Extracto Diclorometánico	500 mg/mL	3	56.47%
Extracto Acuoso	500 mg/mL	3	21.06%

Fuente: Datos de las autoras-Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.ICA 2013

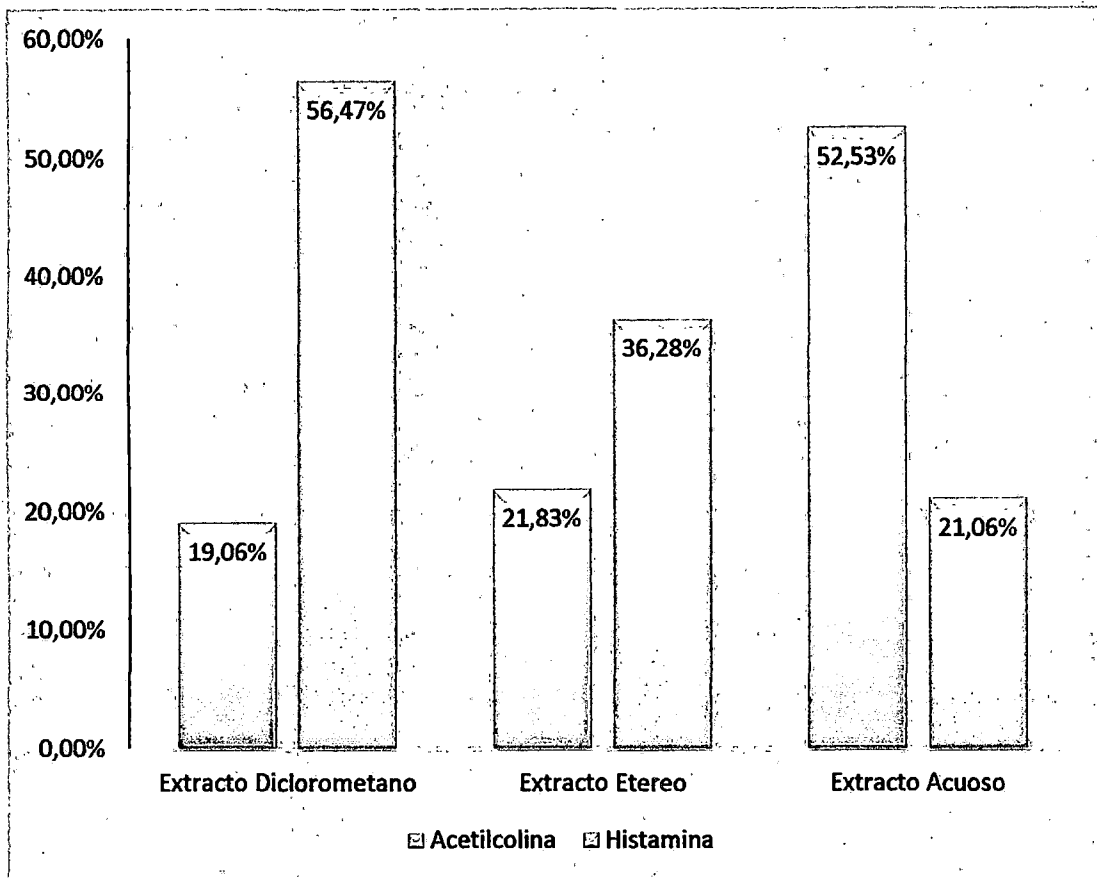


Gráfico N°02: Porcentaje de relajación de los extractos de hojas, sobre la contracción inducida por acetilcolina e histamina en músculo liso de íleon.

CUADRO N°05

EFFECTO ANTIESPASMÓDICO DE LOS EXTRACTOS DE DIFERENTE POLARIDAD DE TALLOS DE *Trixis cacalioides*, SOBRE LA CONTRACCIÓN PRODUCIDA POR ACETILCOLINA.

Grupo Experimental	Concentración	n°	Porcentaje de relajación
Extracto Etéreo	500 mg/mL	3	15.00%
Extracto Diclorometánico	500 mg/mL	3	18.60%
Extracto Acuoso	500 mg/mL	3	Negativo

Fuente: Datos de las autoras-Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.ICA 2013

CUADRO N°06

EFFECTO ANTIESPASMÓDICO DE LOS EXTRACTOS DE DIFERENTE POLARIDAD DE TALLOS DE *Trixis cacalioides*, SOBRE LA CONTRACCIÓN PRODUCIDA POR HISTAMINA

Grupo Experimental	Concentración	n°	Porcentaje de relajación
Extracto Etéreo	500 mg/mL	3	30.00 %
Extracto Diclorometánico	500 mg/mL	3	80.22%
Extracto Acuoso	500 mg/mL	3	Negativo

Fuente: Datos de las autoras-Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.ICA 2013

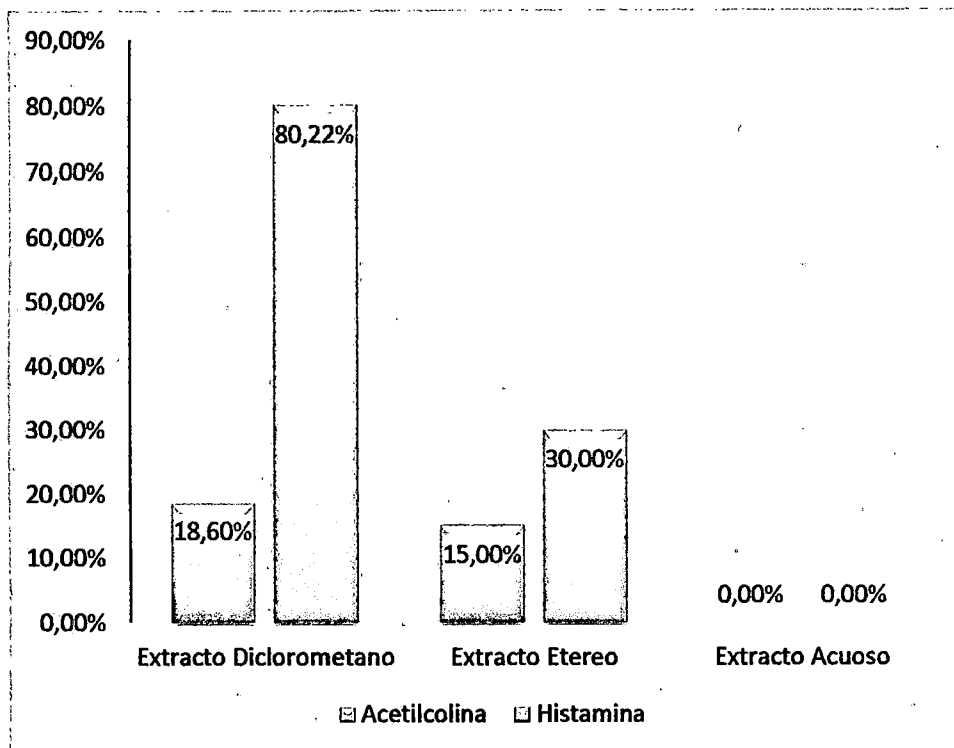


Gráfico N°03: Porcentaje de relajación de los extractos de tallos, sobre la contracción inducida por acetilcolina e histamina en músculo liso de íleon.

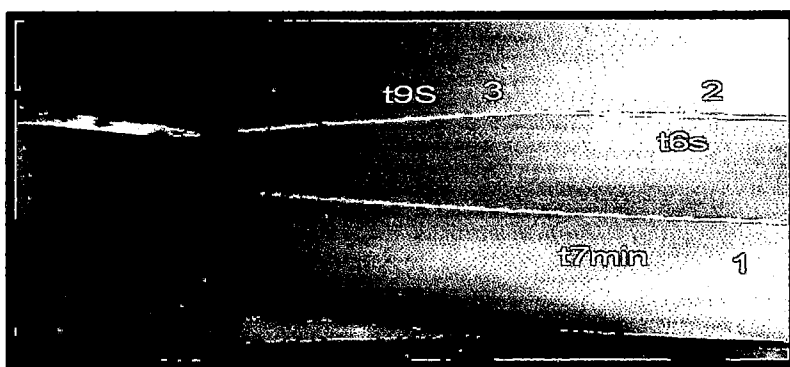


Figura N°17: Contracción - Relajación del músculo liso del íleon aislado de cobayo inducido por Histamina, donde:

- 1: Estado basal del músculo liso**
- 2: Contracción máxima ejercida por la Histamina al 0.1%.**
- 3: Adición del extracto Diclorometánico 500 mg/mL de tallos.**

CUADRO N°07

EFFECTO BRONCODILATADOR DE LOS EXTRACTOS DE DIFERENTE POLARIDAD DE HOJAS DE *Trixis cacalloides*, SOBRE LA CONTRACCIÓN PRODUCIDA POR ACETILCOLINA

Grupo Experimental	Concentración	n°	Porcentaje de relajación
Extracto Etéreo	500 mg/mL	3	43.67%
Extracto Diclorometánico	500 mg/mL	3	55.70%
Extracto Acuoso	500 mg/mL	3	19.43%

Fuente: Datos de las autoras-Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.ICA 2013

CUADRO N°08

EFFECTO BRONCODILATADOR DE LOS EXTRACTOS DE DIFERENTE POLARIDAD DE HOJAS DE *Trixis cacalloides*, SOBRE LA CONTRACCIÓN PRODUCIDA POR HISTAMINA

Grupo Experimental	Concentración	n°	Porcentaje de relajación
Extracto Etéreo	500 mg/mL	3	58.35%
Extracto Diclorometánico	500 mg/mL	3	70.80%
Extracto Acuoso	500 mg/mL	3	22.50%

Fuente: Datos de las autoras-Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.ICA 2013.

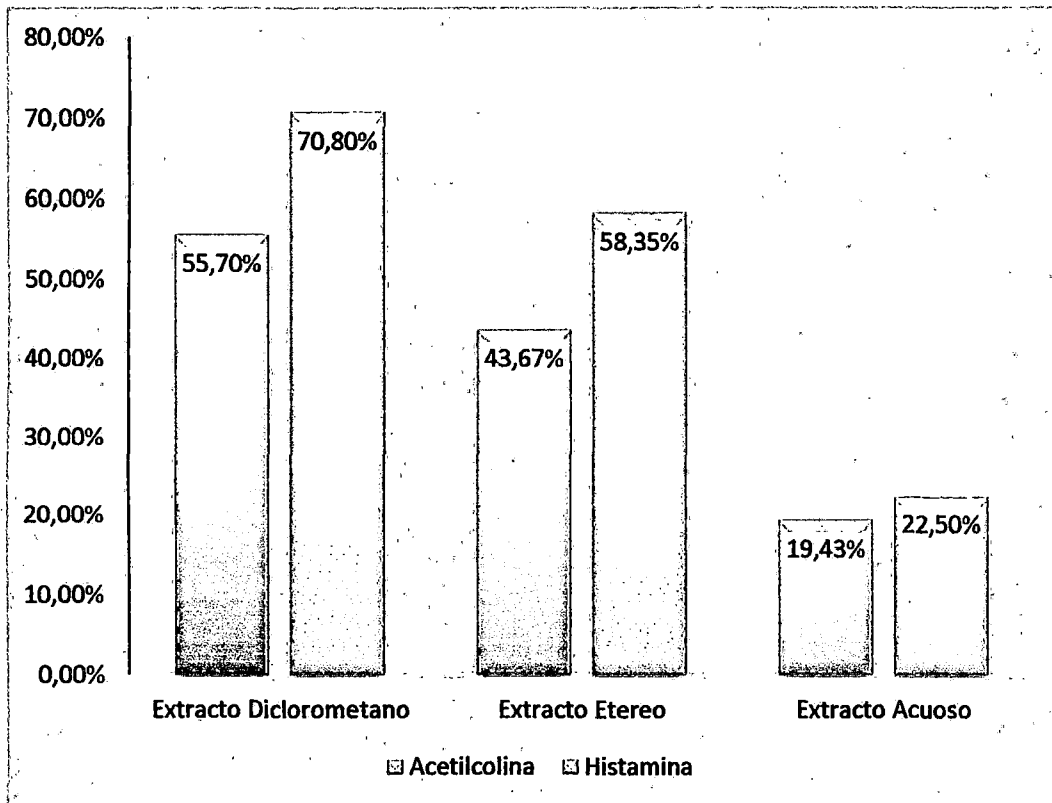


Gráfico N°04: Porcentaje de relajación de los extractos de hojas, sobre la contracción inducida por acetilcolina e histamina en músculo liso de tráquea.

CUADRO N°09.

EFECTO BRONCODILATADOR DE LOS EXTRACTOS DE DIFERENTE POLARIDAD DE TALLOS DE *Trixis cacaloides*, SOBRE LA CONTRACCIÓN PRODUCIDA POR ACETILCOLINA

Grupo Experimental	Concentración	n°	Porcentaje de relajación
Extracto Etéreo	500 mg/mL	3	22.90%
Extracto Diclorometánico	500 mg/mL	3	16.60%
Extracto Acuoso	500 mg/mL	3	Negativo

Fuente: Datos de las autoras-Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.ICA 2013

CUADRO N°10

EFECTO BRONCODILATADOR DE LOS EXTRACTOS DE DIFERENTE POLARIDAD DE TALLOS DE *Trixis cacaloides*, SOBRE LA CONTRACCIÓN PRODUCIDA POR HISTAMINA.

Grupo Experimental	Concentración	n°	Porcentaje de relajación
Extracto Etéreo	500 mg/mL	3	92.31%
Extracto Diclorometánico	500 mg/mL	3	104.68%
Extracto Acuoso	500 mg/mL	3	Negativo

Fuente: Datos de las autoras - Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.N.ICA 2013

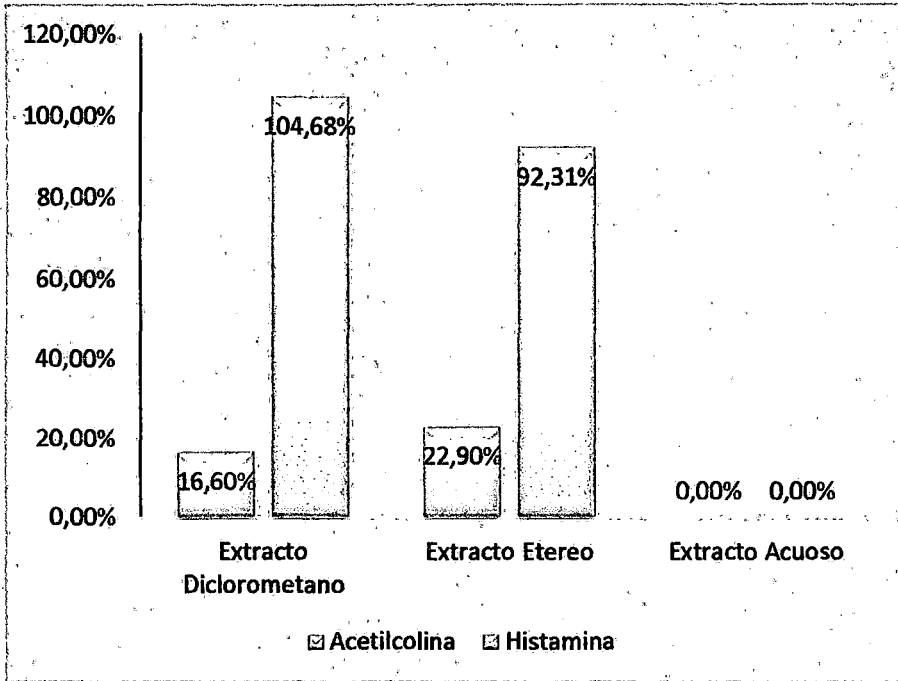


Gráfico N°05: Porcentaje de relajación de los extractos de tallos, sobre la contracción inducida por acetilcolina e histamina en músculo liso de tráquea.

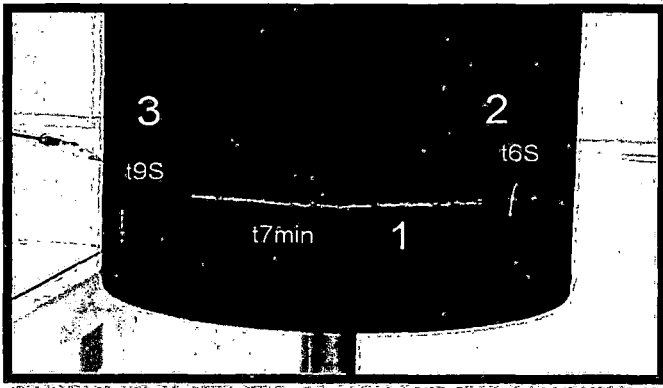


Figura N°18: Contracción - Relajación del músculo liso traqueal aislada de cobayo, inducido por Histamina, donde:

- 1: Estado basal del músculo liso.**
- 2: Contracción máxima ejercida por Histamina al 0.1%.**
- 3: Adición del extracto Diclorometánico 500 mg/mL de tallos.**

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

La marcha fitoquímica muestra la presencia de flavonoides, leucoantocianidinas, catequinas, grupos aminos libres, triterpenos y/o esteroides, compuestos fenólicos y saponinas. (Ver cuadro 02). La información recogida según estudios etnofarmacológicos, farmacológicos, toxicológicos y fitoquímicos, realizados en el género *Trixis* describe algunos de sus componentes químicos, tales como: flavonoides, taninos,¹⁵ trixikingolido III,¹⁶ saponinas, resinas y un alcaloide que causa parálisis sensorial y motora en animales,¹⁷ aceites esenciales que contienen sesquiterpenos, como germacreno, biclogermacreno y valenceno.²⁰

Existe referencia de actividad antiulcerogénica,¹⁸ antiinflamatoria y analgésica.²¹ En la especie *Trixis cacalioides*, se comprobó la actividad purgante atribuido al ácido pipitazoico de la raíz,⁸ efecto antiinflamatorio de sus hojas,¹⁰ y su uso popular como diaforético.¹¹

No se ha encontrado referencias de estudio de las actividades antiespasmódica y broncodilatadora de esta especie, se ha tratado con los medios disponibles de aclarar qué parte de la planta y tipo de extracto tendría el efecto antiespasmódico y broncodilatador analizando su comportamiento sobre el músculo liso intestinal (íleon) y bronquial (tráquea) de cobayos.

En la evaluación de la actividad antiespasmódica con el método de íleon aislado de cobayo, el extracto diclorometánico de hojas y tallos de lingo-

lingo (*Trixis cacalioides*), a una concentración final de 2 mg/mL fue capaz de relajar el músculo liso del intestino, frente al efecto contráctil de histamina 0.1% donde se observa una mayor actividad de relajación que corresponde a 56.47% (hojas) y 80.22% (tallos) (Ver gráfico 02 y 03), a diferencia de los demás extractos.

De manera similar se evaluó el efecto broncodilatador con el método de cadena traqueal aislada de cobayo, donde se pudo observar que el extracto diclorometánico de hojas y tallos, a concentración final de 2 mg/mL (en el baño de órgano aislado) produjo una mayor actividad de relajación con un 70.80% (hojas) y 104.68% (tallos) frente al efecto contráctil de histamina 0.1% sobre el tejido bronquial (Ver gráfico 04 y 05)

Los resultados nos demuestran que los extractos presentaron diferentes comportamientos, demostrando una potencia considerable el extracto diclorometánico de tallos en las actividades antiespasmódica y broncodilatadora frente a histamina; a diferencia del extracto acuoso de tallos que tiene un efecto negativo. La explicación a este efecto contradictorio de dicho extracto sería que posiblemente contienen principios activos estimulantes del músculo liso intestinal y traqueal.

El efecto relajante sobre el músculo liso intestinal y bronquial, atribuida a la especie *Trixis cacalioides*, valida su acción relajante sobre el músculo liso intestinal y bronquial, referida en la medicina popular y que corresponde con lo hallado experimentalmente. Hay que tener en cuenta

que el efecto variará, dependiendo del extracto que se use ya que puede causar un efecto de hormesis, produciendo una actividad contráctil, como sucede con el extracto acuoso de tallos.³⁸

A partir de los resultados obtenidos a nivel fitoquímico se podría establecer que los metabolitos responsables de las actividades demostradas son: los flavonoides, triterpenos y saponinas, ya que se ha encontrado información bibliográfica donde se les atribuye la actividad antiespasmódica y broncodilatadora, por ejemplo: el flavonoide hispidulina inhibe la contracción de la tráquea inducida por histamina.³⁹ Es necesaria la continuación de la investigación para identificar exactamente qué tipo de flavonoides, triterpenos y saponinas son los responsables de dichas actividades.

CONCLUSIONES

1. Los metabolitos secundarios presentes en las hojas y tallos de *Trixis cacalioides* (kunth) D. Don lingo- lingo de acuerdo al tamizaje fitoquímico preliminar son: flavonoides, grupos fenólicos, aminoácidos, triterpenos y/o esteroides, catequinas y saponinas.
2. Los extractos de diferente polaridad obtenidos a partir de las hojas y tallos de *Trixis cacalioides* (kunth) D. Don "lingo- lingo" presentan actividad antiespasmódica y broncodilatadora.
3. El extracto diclorometánico de tallos (2 mg/mL) frente a la histamina, presentó mayor actividad antiespasmódica y broncodilatadora cuyos porcentajes de relajación fueron: 80.22 % 104.68% respectivamente.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda aislar y caracterizar estructuralmente los metabolitos secundarios presentes en el extracto diclorometánico para luego evaluar el efecto antiespasmódico y broncodilatador que pueda tener cada uno de estos y con ello establecer la relación estructura - efecto.
2. Efectuar estudios toxicológicos para una mejor evaluación de la investigación.
3. Continuar con las investigaciones fitoquímicas y farmacológicas para validar los efectos de las propiedades medicinales mencionadas en la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ruiz A, De la Paz J, García A, Sebazco C, Carrazana A y Pereira E. Actividad espasmolítica de una tintura de *Melissa officinalis* en modelos experimentales. *Rev Cubana Plant Med.* [Revista en línea] 2004 [Consultado 23 Marzo 2013]; 9(3). Disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962004000300003

2. Dorland Diccionario Enciclopédico Ilustrado de Medicina. 27ª ed. Madrid: McGraw-Hill, Interamericana; 1997.
3. Guyton A, Hall J. Sensibilidades somáticas: II. Dolor, cefalea y sensibilidad térmica. En: Guyton A, Hall J. Tratado de fisiología médica. 11ª ed. España: Elsevier; 2011. p. 598-609.
4. Flórez J. Fármacos antitusígenos, mucolíticos, surfactantes pulmonar y estimulante de la respiración. En: Flórez J, Armijo J, Mediavilla A. Farmacología humana. 3ª ed. España: Masson; 2004. p. P.721-730.
5. Sistemática de plantas vasculares. Sistemática y taxonomía de compositae [Página principal en internet]. Uruguay: Universidad de la Republica; 2011 [2013; 20-03-2014]. Disponible en:

http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/asteraceae.html

6. Herbario Virtual. Compositae (Asteraceae) [Página principal en internet]. Valencia: Universidad de Valencia; 2005 [2007; 20-03-2014]. Disponible en:

<http://herbarivirtual.uib.es/cas-uv/familia/2076.html>

7. Katinas L. Revisión de las especies sudamericanas del género *Trixis* (asteraceae, mutisieae). Darwiniana Nueva serie [Sede Web]. 2000 [Acceso 14 Abril 2013].; 34(1). Disponible en:
[.http://www.ojs.darwin.edu.ar/index.php/darwiniana/article/view/374/36](http://www.ojs.darwin.edu.ar/index.php/darwiniana/article/view/374/36)
3
8. Del Valle D. Preparación del ácido pipitazoico a partir de la raíz de *Trixis cacalioides* [Tesis Bachiller]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 1950.
9. Catálogo de plantas vasculares del conosur. Asteraceae (Sede Web). Argentina: Flora de la Republica de la Argentina. Disponible en:
<http://www.floraargentina.edu.ar/detalleespecie.asp?forma=&variedad=&subespecie=&especie=cacalioides&espcod=17854&genero=Trixis&autor=5426&deDonde=6>
10. Garayar R. Estudio de la actividad antiinflamatoria de las hojas de *Trixis cacalioides* H.B.K. [Tesis Título profesional]. Ica: Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 1998.
11. Del vitto Luis, Petenatti E, Petenatti M. Recursos Herbolarios De San Luis Primera Parte: Plantas Nativas [Página principal en internet]. Argentina: Slideshare; c2000 [citado 24-03-14]. Disponible en:
<http://es.slideshare.net/gftaagnosticaespiritual/05-04-01-argentina-plantas-medicinales-wwwgftaagnosticaespiritualorg>

12. Villagrán C, Castro V. Ciencia indígena de los Andes del norte de Chile [Libro electrónico]. Santiago de Chile: Universitaria; 2004 [citado 24-03-14]: Disponible en: http://books.google.com.pe/books?id=n_nKYskOgDQC&pg=PA87&lpg=PA87&dq=trixis+cacalioides&source=bl&ots=kBxEIwRfWG&sig=qWkHxinHwNXmDdV_tO1gtVAqiSI&hl=es&sa=X&ei=w_51VNrkA8WZgwS_2pYKAAQ&ved=0CEIQ6AEwCQ#v=onepage&q=trixis%20cacalioides&f=false
13. Bermejo J. La farmacia moderna está en los productos naturales. Revista académica colombiana científica [Sede Web]. 2000; 24(92). Disponible en: http://www.accefyn.org.co/revista/Vol_24/92/441-447.pdf
14. Bohlmann F, King R, Robinson H. Weitere isocedren-derivate aus *Trixis paradoxa*. Phytochemistry. [Revista en Internet]. 2001 [Consultado 24 Marzo 2013]; 18(5). Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003194227980028X>
15. Pereira F, Guimaraes L, Cerutti S, Rodrigues R, Araujo C. Preliminary anti-ulcerogenic and chemical analysis of the aerial parts of *trixis divaricata* Sprengel. Acta Farmacéutica Bonaerense. [Revista en internet] 2004 [Acceso 26 Marzo 2013]; 24(1). Disponible en: http://www.latamipharm.org/trabajos/24/1/LAJOP_24_1_2_2_1AP30TS_UVH.pdf

16. Bohlmann F, Suwita A, Jakupovic J, King R, Robinson H. Trixikingolides and germacrene derivatives from *Trixis* species. *Phytochemistry*. [Revista en internet] 1981 [Acceso 20 Marzo 2013]; 20(7) 7: 1649-1655. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200985492>
17. Floriani L. Pharmacognosy of *Trixis divaricata* Spreng. var. *Discolor* Griseb. *Revista Farmacéutica*. 1935; 77(1):223-226.
18. Torres Ana, Camargo F, Ricciardi G, Dellacassa E. Examen del Aceite esencial de *Trixis divaricata* (Kunth) Spreng. de Corrientes. Argentina: Universidad Nacional del Nordeste; 2006. Disponible en :
<http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt2006/08-Exactas/2006-E-019.pdf>
19. Luján M, Pérez C. Cribado para evaluar actividad antibacteriana y antimicótica en plantas utilizadas en medicina popular de Argentina. *Rev Cubana Plant Med*. [Revista en internet]. 2008 [Acceso 16 Abril 2013]; 42(2). Disponible en:
http://www.bvs.sld.cu/revistas/far/vol42_2_08/far07208.htm
20. Berrios C, Rojas L. Estudio de los componentes volátiles de la *Trixis inula* que crece en Mérida – Venezuela. En: Book of XIX° SILAE Congress “Fernando Cabieses Molina”. Italia; Vincenzo Barbarulo & Luca Rastrelli © SILAE. 2010. p.128.

21. Universidad del Atlántico [Página principal en internet]. Colombia: Grupo fitoquímico; c2012 [actualizada Marzo 2012; consultado 24 Marzo 2013]. Disponible en: <http://uniatlantico.edu.co/uatlantico/inicio>
22. Silverthorn Unglaub Dee. Fisiología Humana. Un Enfoque Integrado [libro electrónico]. Madrid: ed. Médica Panamericana; 2009 Abr [Citado el 14 de Mar. de 2013.]; Disponible en:
https://books.google.com.pe/books?id=X5sKQuy8q0C&pg=PA427&lpq=PA422&focus=viewport&dq=musculo+liso+del+intestino&output=html_text
23. Guyton A, Hall J. Contracción y excitación del músculo liso. En: Guyton A, Hall J. Tratado de fisiología médica. 11ª ed. España: Elsevier; 2011. p. 92-100.
24. Guyton A, Hall J. Principios generales de la función gastrointestinal: motilidad, control nervioso y circulación sanguínea. En: Guyton A, Hall J. Tratado de fisiología médica. 11ª ed. España: Elsevier; 2011. p. 769-780.
25. González C, Calvo S, Ceña V. Transmisión colinérgica. Fármacos agonistas colinérgicos. En: Flórez J, Armijo J, Mediavilla A. Farmacología humana. España: Masson; 2004. p. 229-253.
26. Nigel B, Vishwanath R. Enfermedad gastrointestinal. En: McPhee S, Ganong W. Fisiopatología Médica: Una Introducción a la medicina clínica. 5ª ed. México. El Manual Moderno; 2007. p. 337-385.

27. Flórez J. Farmacología general del sistema nervioso autónomo. En: Flórez J, Armijo J, Mediavilla A. Farmacología humana. 4ª ed. España: Masson; 2004. p. 221-225.
28. Flórez J, Esplugues J. Farmacología de la motilidad gastrointestinal. En: Flórez J, Armijo J, Mediavilla A. Farmacología humana. 4ª ed. España: Masson; 2004. p. 757-781.
29. Perpiñá M, Lloris A. Los broncodilatadores, esos fármacos maravillosos. Archivos de Bronconeumología. 2004; 40(1):16-22. Disponible en:
http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?f=10&pident_articulo=13077784&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=6&ty=46&accion=L&origen=bronco&web=www.archbronconeumol.org&lan=es&fichero=6v40nSupl.1a13077784pdf001.pdf
30. Guyton A, Hall J. Ventilación pulmonar. En: Guyton A, Hall J. Tratado de fisiología médica. España: Elsevier; 2011. p. 471-483.
31. Abad F, Novalbo J, Gallego S, Gálvez A. Regulación del tono bronquial en la enfermedad obstructiva crónica (EPOC): Papel de los receptores muscarínicos. An. Med. Interna [Revista en internet]. 2003 [Acceso 20 Mayo 2013]; 20(4). Disponible en:
http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=s021271992003000400010&script=sci_arttext
32. Fernarolis G. Handbook of Flavor Ingredients [Libro electrónico]. New York; 1975 [citado 25 Abril 2013]; Disponible en:

<http://www.abebooks.com/book-search/title/fenaroli's-handbook-flavor-ingredients/>

33. Solis P, Guerrero N, Gattuso M, Caceres A. Manual de caracterización y análisis de drogas vegetales y productos fitoterapéuticos. Pág: 16,43-91.
34. Lock O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos Naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. 1994.
35. García A, Martínez M, Morón F. Actividad antiespasmódica de extractos de piper auritum en intestino. Rev Cubana Plant Med [Revista en internet]. 2001; 2001(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S102847962001000100005&script=sci_arttext
36. Experiments in pharmacology- experiments with other smooth muscle preparations pag.100.
37. Staff of the Department of Pharmacology University of Edinburgh. Pharmacological experiments on isolated preparations. London:E &S Livingstone Ltd; 1968.
38. Repetto M, Repetto G. Toxicología fundamental [Internet]. Madrid: McGraw-Hill; 2009 [Acceso 20 Abril 2013]. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=WheuVgivN6wC&pg=PA57&pg=PA57&dq=toxicologia+hormesis&source=bl&ots=Yz9tG9VTzk&sig=VB2S_dcMps-nDI4228x1wONwOkM&hl=es-

419&sa=X&ved=0CE0Q6AEwB2oVChMI58OVp_2cxwIVzI0NCh0zhgAi
#v=onepage&q=hormesis&f=false

39. Correa M, De Melo G, Costa S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. Revista Brasileira de Farmacognosia [Revista en internet]. 2008; 18(1). Disponible en :
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000500025



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Integración Nacional y el Reconocimiento de Nuestra Biodiversidad"

CONSTANCIA N° 204-USM-2012

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 (rama con hojas y flores), recibida de **Mary Susybel HUACHIN ROJAS**, estudiante de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica; ha sido estudiada y clasificada como: ***Trixis cacalioides*** (Kunth) D. Don y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: ASTERALES

FAMILIA: ASTERACEAE

GENERO: *Trixis*

ESPECIE: *Trixis cacalioides* (Kunth) D. Don


Nombre vulgar: "Lingo Lingo"

Determinado por: Mag. Hamilton Beltrán Santiago

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

Fecha, 25 de Julio de 2012




Dra. Haydee Montoya Terreros
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

CONSTANCIA

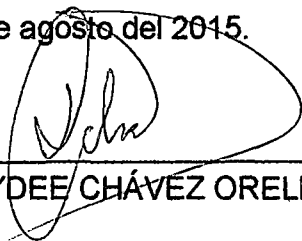
Mediante la presente, hago constar como asesora de tesis, la culminación del trabajo de investigación titulado: **Actividad antiespasmódica y broncodilatadora de los extractos de diferente polaridad obtenidos a partir de las hojas y tallos de la especie *Trixis cacalioides* (Kunth) D. Don "lingo lingo"**. Presentado por las egresadas:

Bach. ANDRÉS RAMOS TANIA IRIS

Bach. HUACHIN ROJAS MARY SUSSYBELL

He revisado la mencionada tesis y habiéndose alcanzado los objetivos, la considero apta para seguir el proceso de sustentación con el fin de obtener el título profesional de Químico farmacéutico.

Ica, 11 de agosto del 2015.



Dra. HAYDEE CHÁVEZ ORELLANA

Asesora de tesis

CONSTANCIA

Mediante la presente, hago constar como asesor de tesis, la culminación del trabajo de investigación titulado: **Actividad antiespasmódica y broncodilatadora de los extractos de diferente polaridad obtenidos a partir de las hojas y tallos de la especie *Trixis cacalioides* (Kunth) D. Don “lingo lingo”**. Presentado por las egresadas:

Bach. ANDRÉS RAMOS TANIA IRIS

Bach. HUACHIN ROJAS MARY SUSSYBELL

He revisado la mencionada tesis y habiéndose alcanzado los objetivos, la considero apta para seguir el proceso de sustentación con el fin de obtener el título profesional de Químico farmacéutico.

Ica, 10 de agosto del 2015.



Mg. ERNESTO TORRES VÉLIZ

Asesor de la tesis