

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**  
**INSTITUTO DE FARMACOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE ALCALOIDES TIPO TROPANO PRESENTES EN *Schizanthus grahamii* SOBRE LA ACTIVIDAD CONTRÁCTIL DE AORTA DE RATA.**

Memoria de Título presentada como parte  
de los requisitos para optar al TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO.

**CARLOS FELIPE GOTTSCHALK RADEMACHER**

**VALDIVIA - CHILE**

**2003**

**PROFESOR PATROCINANTE** : Dr. Frédérick Ahumada M. \_\_\_\_\_

**PROFESOR COPATROCINANTE** : Dra. Viviana Bustos S. \_\_\_\_\_

**PROFESOR COLABORADOR** : Dr. Orlando Muñoz M. \_\_\_\_\_

**PROFESORES CALIFICADORES** : Dr. Oscar Araya V. \_\_\_\_\_

Dr. Rafael Burgos A. \_\_\_\_\_

**FECHA DE APROBACIÓN** : 22 de Octubre del 2003

**ÍNDICE.**

	Pág.
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN.....	24
BIBLIOGRAFÍA.....	29
ANEXOS.....	33
AGRADECIMIENTOS.....	37

## EVALUACIÓN DE ALCALOIDES TIPO TROPANO PRESENTES EN *Schizanthus grahamii* SOBRE LA ACTIVIDAD CONTRÁCTIL DE AORTA DE RATA.

### 1. RESUMEN.

En este trabajo se evaluó el efecto de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii* sobre la actividad contráctil de aorta de rata, tanto en ausencia de sustancias vasoactivas como frente a la contracción por noradrenalina y la relajación por carbacol.

Se utilizaron anillos de aorta de ratas machos normotensas de la cepa Sprague Dawley, con pesos entre los 250 y 300 gramos. Los anillos de aorta fueron conectados a transductores de tensión e incubados por 40 minutos en una solución de Krebs Henseleit a 37° C (+/- 0,5°C), en presencia de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Se determinaron tres series en estudio. Serie control: preincubada sólo con etanol (0,5°). Serie experimental 1: preincubada con 0,03 mg/ml de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii*, disueltos en etanol. Serie experimental 2: preincubada con 0,1 mg/ml de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii*, disueltos en etanol.

Las preincubaciones realizadas en las series en estudio no mostraron actividad contráctil sobre aorta de rata, en ausencia de sustancias vasoactivas.

La contracción con noradrenalina ( $3 \times 10^{-7} \text{M}$ ) fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) en la serie experimental 2, respecto a la serie control.

La relajación con carbacol ( $1 \times 10^{-4}$  a  $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ) fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) en la serie experimental 2, respecto a la serie control. La relajación con carbacol ( $3 \times 10^{-7} \text{M}$ ) fue inhibida significativamente ( $p < 0,05$ ) en ambas series experimentales, respecto a la serie control.

Se concluye que los alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii* no poseen efecto en ausencia de sustancias vasoactivas; disminuyen significativamente ( $p < 0,05$ ) la magnitud de la contracción por noradrenalina; disminuyen o inhiben significativamente ( $p < 0,05$ ) la relajación por carbacol, en aorta de rata.

Palabras claves: *Schizanthus grahamii*, alcaloides tipo tropano, aorta, ratas.

## EVALUATION OF THE ACTIVITY OF TROPANE TYPE ALKALOIDS FROM *Schizanthus grahamii* ON CONTRACTILE ACTIVITY OF RAT AORTA.

### 2. SUMMARY.

The effect of tropane type alkaloids from *Schizanthus grahamii* on contractile activity from rat aorta was analysed in absence of any vasoactive agent and contracted by noradrenaline and relaxed by carbachol.

The aortic rings were taken from Sprague Dawley male normotensive rats, 250 to 300 grams body weight. The aortic rings were connected to a tension transducer and equilibrated at 2 g tension for 40 minutes in a Krebs Henseleit solution at 37°C (+/- 0,5°C), with 95% of O<sub>2</sub> and 5% of CO<sub>2</sub>. Three series of study were established. Control serie: preincubated with ethanol only (0,5°). Experimental serie 1: preincubated with 0,03 mg/ml of tropane type alkaloids from *Schizanthus grahamii* dissolved in ethanol. Experimental serie 2: preincubated with 0,1 mg/ml of tropane type alkaloids from *Schizanthus grahamii* dissolved in ethanol.

The preincubations in the study series did not showed any contractile activity on rat aorta in absence of any vasoactive agent.

The contraction with noradrenaline ( $3 \times 10^{-7} \text{M}$ ), was significantly reduced ( $p < 0,05$ ) in the experimental serie 2 respect to the control serie.

The relaxation with carbachol ( $1 \times 10^{-4}$  a  $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ), was significantly less ( $p < 0,05$ ) in experimental serie 2 respect to the control serie. The relaxation with carbachol ( $3 \times 10^{-7} \text{M}$ ) was significantly inhibited ( $p < 0,05$ ) in both experimental series respect to control serie.

It can be concluded that tropane type alkaloids from *Schizanthus grahamii* do not have an effect in absence of any vasoactive agent; they reduced significantly ( $p < 0,05$ ) the magnitude of the contraction induced by noradrenaline; they reduced or inhibit significantly ( $p < 0,05$ ) the relaxation induced by carbachol on the rat aorta.

Key words: *Schizanthus grahamii*, tropane alkaloids type, aorta, rats.

### 3. INTRODUCCIÓN.

#### 3.1. FISIOLOGÍA DE LA PARED VASCULAR.

La pared vascular es considerada actualmente como un órgano, dado que ejerce funciones que participan en el mantenimiento de la homeostasis vascular al regular el flujo sanguíneo, formación de trombos, adhesión de leucocitos, mantención de la estructura parietal, y traducción de fuerzas biomecánicas y hormonales (Tresguerres y col., 2000).

La estructura anatómica de las arterias está constituida por tres capas concéntricas. La capa interna, llamada túnica íntima, está constituida por células endoteliales con su eje mayor orientado longitudinalmente; una capa media o túnica media compuesta principalmente por células musculares lisas dispuestas circularmente, y una capa externa o túnica adventicia formada por fibroblastos y fibras de colágeno orientadas longitudinalmente. Existe además una lámina elástica interna que separa la capa íntima de la media y una lámina elástica externa que separa la capa media de la adventicia. La estructura de la pared vascular así como sus propiedades biomecánicas, dependen en gran medida de la matriz extracelular formada por fibras elásticas y de colágeno, incluidas en un gel compuesto por proteoglicanos, ácido hialurónico, glucoproteínas y agua (Tresguerres y col., 2000).

Las células musculares lisas se encuentran en la pared de todos los vasos sanguíneos a excepción de los capilares y son las responsables de que los vasos puedan modificar su diámetro de acuerdo a las necesidades de cada tejido. Estas células son fusiformes, presentando un único núcleo en posición central y una disposición circular formando capas alrededor de la circunferencia del vaso (Tresguerres y col., 2000).

La musculatura lisa de las arterias no presenta estrías transversales visibles, dado que la actina y miosina se ubica en disposiciones irregulares a diferencia de lo que ocurre en el músculo esquelético y cardíaco (Ganong, 1998). Además, a diferencia de lo que ocurre en la musculatura estriada, posee calmodulina y no troponina (Tresguerres y col., 2000).

La contracción de las células del músculo liso vascular es activado por iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y energía aportada por la degradación de ATP a ADP (Tresguerres y col., 2000). Existen tres mecanismos que modifican la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. En primer lugar, canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por depolarización de membrana, los cuales se abren frente a un cambio de voltaje permitiendo que el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular se mueva hacia el interior de la célula siguiendo su gradiente electroquímico, produciendo la contracción (Hardman y col., 1996; Iturriaga, 2001). En segundo lugar, contracciones inducidas por agonistas que no depolarizan la membrana, pero que activan receptores acoplados a proteína G, modulando respuestas intracelulares que finalmente producen un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma que lleva a la contracción (Flórez, 1997). En tercer lugar, canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados

por receptores, los que son activados por neurotransmisores y hormonas (Hardman y col., 1996).

Dentro de la pared vascular el endotelio es el principal órgano de regulación, actuando como receptor y transmisor de señales al ser capaz de registrar cambios hemodinámicos, interactuar con células sanguíneas, modificar los mensajeros químicos circulantes y responder a dichos cambios mediante la liberación de numerosos factores vasoactivos (Tresguerres y col., 2000).

En 1980 Furchgott y Zawadzki, descubrieron que era necesaria la presencia de endotelio para que la acetilcolina produzca la relajación *in vitro* de un anillo de aorta de conejo. Se llegó a la conclusión de que la relajación endotelio-dependiente producida por acetilcolina, resultaba de la liberación de una sustancia por parte del endotelio que se denominó factor relajante derivado de endotelio (EDRF) y que más tarde se identificó como óxido nítrico (Furchgott y Zawadzki, 1980). El óxido nítrico es liberado frente a la presencia en el endotelio de los llamados vasodilatadores endotelio-dependiente como acetilcolina y bradicinina, además de cambios en la presión sanguínea, catecolaminas y angiotensina entre otros, actuando como modulador local de estos. De esta forma, el óxido nítrico es un factor de acción paracrina cuyos principales efectos son la relajación del músculo liso vascular, proliferación de las células del músculo liso, inhibición de la agregación plaquetaria, manteniendo por lo tanto la función, estructura e integridad vascular (Tresguerres y col., 2000).

La prostaciclina ( $PGI_2$ ), es otro factor relajante derivado del endotelio, siendo sus principales acciones la inhibición de la agregación plaquetaria y la relajación de las células de la musculatura lisa vascular. Su liberación está dada por acetilcolina, bradicinina y angiotensina II (Tresguerres y col., 2000).

El factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF), es también un factor de relajación dependiente de endotelio, el cual produce principalmente una relajación del músculo liso vascular al inducir hiperpolarización de su membrana celular. Es liberado por concentraciones elevadas de acetilcolina y bradicinina, mediando así parcialmente la acción vasodilatadora de estos agentes (Tresguerres y col., 2000).

Entre los factores derivados de endotelio que participan como constrictores de la pared vascular está la endotelina (ET) y los factores constrictores derivados del endotelio, denominados genéricamente así dado que son de naturaleza aún no establecida. Estos serían mediadores de la vasoconstricción producida por la hipoxia y el aumento en la presión transmural (Tresguerres y col., 2000).

### 3.2. MECANISMOS DE CONTROL DE LA MUSCULATURA LISA VASCULAR.

En términos generales, el control de la musculatura lisa vascular está dado por un control local (intrínseco) determinado por mecanismos como son los de autorregulación, metabólicos, hiperemia activa e hiperemia reactiva, y un control central (extrínseco) que incluye mecanismos humorales y neuronales (Cunningham, 1999).

Dentro del mecanismo humoral destacan hormonas con acción vasoactiva como angiotensina II, vasopresina, prostaciclina, bradicinina, serotonina, histamina, prostaglandinas y catecolaminas circulantes, éstas últimas liberadas por estimulación simpática (Tresguerres y col., 2000).

El control neuronal es llevado a cabo por el sistema nervioso autónomo (S.N.A). Este sistema es involuntario y controla las funciones viscerales del organismo, activándose principalmente por centros situados en la médula espinal, tallo cerebral, hipotálamo y porciones de la corteza cerebral (corteza límbica). El S.N.A se divide en sistema nervioso simpático y sistema nervioso parasimpático, con bases anatómicas y funcionales diferentes. La noradrenalina es el neurotransmisor de las neuronas simpáticas posganglionares, denominándose adrenérgicas a las terminaciones nerviosas que la liberan. La acetilcolina es el neurotransmisor preganglionar de ambas divisiones de S.N.A y de las neuronas posganglionares del sistema parasimpático, denominándose colinérgicas las terminaciones nerviosas en donde se libera acetilcolina (Flórez, 1997; Tresguerres y col., 2000).

**3.2.1. Transmisión Adrenérgica:** La transmisión adrenérgica está dada por adrenalina, noradrenalina y dopamina, denominadas también catecolaminas, las cuales forman parte fundamental del sistema simpático (Tresguerres y col., 2000). Los receptores adrenérgicos son estructuras moleculares glucoproteicas, que reciben selectivamente la señal de adrenalina y noradrenalina (Flórez, 1997). Ahlquist en 1948 clasificó los receptores adrenérgicos en clases  $\alpha$  y  $\beta$  (Hardman y col., 1996; Flórez, 1997). Los estudios de fijación de radioligandos agonistas o antagonistas muestran que en un mismo órgano coexisten varios subtipos de  $\alpha$  y  $\beta$  receptores en proporciones distintas, como ocurre en la pared vascular. Los  $\alpha$ -receptores son estimulados, en orden de mayor a menor potencia, por adrenalina, noradrenalina e isoproterenol y se les asocia a una actividad contráctil de la musculatura lisa vascular. Bajo consideraciones funcionales y anatómicas se clasifican en dos grandes grupos: los receptores presinápticos clasificados como  $\alpha_2$ -adrenérgicos, que al activarse inhiben la liberación de noradrenalina, teniendo un efecto de retroalimentación negativa, y los receptores postsinápticos “excitatorios” clasificados como  $\alpha_1$  (Flórez, 1997; Iturriaga, 2001). Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, son estimulados por agonistas adrenérgicos en orden de mayor a menor potencia por isoproterenol, adrenalina y noradrenalina, y se les asocia una actividad relajadora de la musculatura vascular. Se dividen en  $\beta_1$ , que predominan en el miocardio;  $\beta_2$  ubicados especialmente en músculo liso y  $\beta_3$  presentes en el tejido adiposo (Hardman y col., 1996; Flórez, 1997).

Las reacciones que ocurren después de la activación de todos los tipos de receptores adrenérgicos son resultado de los efectos mediados sobre proteína G (Hardman y col., 1996). De esta forma los receptores  $\alpha_1$ , asociados a la proteína  $G_q$ , actúan estimulando la fosfolipasa C, que hidrolisa el fosfoinositol, resultando en la formación de los segundos mensajeros, inositol trifosfato y diacilglicerol, los que llevan a un aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular. La respuesta a la activación de receptores  $\alpha_2$  está asociada a la proteína  $G_i$ , la cual inhibe al segundo mensajero adenosinmonofosfato (AMPc), produciendo apertura de canales de  $K^+$  y canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje. Los receptores  $\beta$  adrenérgicos estimulan la enzima adenilciclase mediante la interacción con una proteína  $G_s$  lo que lleva a un aumento de los niveles del segundo mensajero AMPc. Estos movimientos iónicos a través de la membrana plasmática terminan modificando los potenciales de acción y el grado de contracción de las proteínas contráctiles (Flórez, 1997; Iturriaga 2001).

Los agonistas adrenérgicos como la noradrenalina, generan vasoconstricción, es decir contraen la musculatura lisa vascular al activar receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , ubicados tanto en el endotelio como en la musculatura lisa vascular (Fauaz y col., 2000).

Los antagonistas adrenérgicos inhiben la actividad simpática, existiendo de tipo reversible e irreversible, teniendo diferente afinidad por cada tipo y subtipo de receptor. Para la pared vascular tienen importancia especial el bloqueo  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , que conduce a vasodilatación. El efecto del bloqueo no selectivo de los  $\beta$  adrenoreceptores lleva a una vasoconstricción (Flórez, 1997).

**3.2.2. Transmisión Colinérgica:** Dentro de la transmisión colinérgica se encuentran todos aquellos fármacos que imitan la acción de la acetilcolina, liberada en las terminaciones posganglionares parasimpáticas. Los receptores muscarínicos fueron definidos por Sir Henry Dale en 1914, como aquellos que eran activados selectivamente por muscarina y bloqueados por atropina, y los receptores nicotínicos como aquellos activados por nicotina y bloqueados por curare (Hulme y col., 1990).

Hoy en día sabemos por estudios en biología molecular que existen múltiples variantes de ambos tipos de receptores, que son miembros de dos familias de genes distintos y que coinciden en la propiedad de ser activados por el mismo ligando, la acetilcolina (Hulme y col., 1990).

Se han determinado 5 subtipos de receptores muscarínicos designados de  $M_1$  a  $M_5$ , los que se identificaron por clonación molecular, con base en su especificidad farmacológica (Flórez, 1997). Los receptores  $M_1$ , se presentan en ganglios autonómicos y corteza cerebral; los receptores  $M_2$ , predominan en el miocardio y en mucho menor grado en la musculatura lisa; los receptores  $M_3$  y  $M_5$ , se encuentran en células secretoras y en células de la musculatura lisa; los receptores  $M_4$ , se ubican en células endoteliales y neuronas ganglionares (Hardman y col., 1996; Flórez, 1997). Las respuestas a la activación de estos receptores son muy variables, llevando por ejemplo, a un aumento en la motilidad del tracto gastrointestinal,

broncoconstricción, miosis, aumento general de la secreción glandular, reducción de la frecuencia cardíaca y vasodilatación (Flórez, 1997).

A pesar de la diversidad funcional de los subtipos de receptores muscarínicos, todos ejercen sus efectos mediante la proteína G. Dependiendo de la naturaleza de la proteína G, esta interacción activa el sistema de segundos mensajeros a través de tres vías: inhibición de la enzima adenilciclase, estimulación de la hidrólisis de fosfoinositol y regulación de la abertura de un canal iónico. De acuerdo al sistema de activación, se ha clasificado a los receptores en dos subgrupos:  $M_1$ ,  $M_3$  y  $M_5$ , que activan a una determinada proteína G denominada  $G_{q/11}$ , encargada de la estimulación de la actividad de fosfolipasa C, que conduce a la formación de un segundo mensajero a través de la hidrólisis de polifosfoinositol, llevando a una descarga de  $Ca^{2+}$  intracelular;  $M_2$  y  $M_4$ , que interactúan con un grupo específico de proteínas G denominados  $G_i$  y  $G_o$ , que conducen a la inhibición de la adenilciclase que termina activando canales de  $K^+$  (Hardman y col., 1996; Flórez, 1997).

Los efectos de la activación de los diferentes subtipos de receptores muscarínicos, presentes tanto en la musculatura lisa vascular como en el endotelio, son variables según la especie animal; localización anatómica del vaso sanguíneo; subtipo de receptor muscarínico predominante y la interacción con agentes muscarínicos. Es así como la activación de receptores  $M_3$  ubicados a nivel vascular producen vasodilatación en: arterias coronarias de equinos y simios; arterias mesentéricas y renales de ratas; aorta de conejo y rata; arteria uterina de cerdos; arterias pulmonares humanas; arterias cerebrales y femorales de gatos. A su vez existe vasoconstricción mediada por receptores  $M_3$  en: arterias coronarias de rata; vena porta de cerdos y arterias pulmonares de humanos (Eglen y col., 1996). Además se debe considerar que los receptores  $M_3$  ubicados en la musculatura lisa vascular poseen un efecto vasoconstrictor, el cual es normalmente anulado por la actividad de los receptores  $M_3$  endoteliales que vasodilatan (Cunningham, 1999). Las características funcionales de los receptores muscarínicos en animales hipertensos son diferentes a las mencionadas (Boulanger y col., 1994).

Los receptores muscarínicos encargados de la relajación vascular se encuentran principalmente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, los que al ser estimulados descargan factores de relajación dependientes de endotelio, como prostaciclina ( $PGI_2$ ) y óxido nítrico, los cuales difunden hacia las células del músculo liso adyacentes (Hardman y col., 1996).

Dentro de los fármacos que tienen acción sobre los receptores muscarínicos, existe un grupo denominado agonista colinérgico de acción muscarínica, en donde se encuentra la acetilcolina, carbacol, metacolina, betanecol, muscarina, pilocarpina y oxotremorina, entre otros (Tresguerres y col., 2000). Carbacol es un fármaco de origen sintético y su acción sobre el sistema vascular está dada por vasodilatación arterial generalizada, al relajar la musculatura lisa vascular, siempre y cuando el endotelio esté intacto, dado que es un agente vasorelajador endotelio-dependiente al igual que todos los agonistas muscarínicos mencionados (Flórez, 1997).

Existen fármacos llamados anticolinérgicos o antagonistas muscarínicos que bloquean la acción muscarínica de la acetilcolina a nivel de receptores y así inhiben la función del sistema parasimpático (Sakmann, 1992). Los efectos anticolinérgicos están dados por actividad antiespasmódica de la musculatura intestinal, midriasis, ciclopegia, broncodilatación, disminución de las secreciones, entre otros. Los dos fármacos anticolinérgicos más conocidos son la atropina, que se encuentra en las plantas *Atropa belladonna* y *Datura stramonium*, y la escopolamina, que proviene de la planta *Hyoscyamus niger*, teniendo ambos afinidad similar por todos los subtipos de receptores muscarínicos. Existen otros semisintéticos como la hemotropina, bromuro de metescopolamina, butilbromuro de escopolamina, ipratropio y pirenzepina. En dosis clínicas, los derivados atropínicos a nivel vascular contrarrestan por completo la vasodilatación periférica provocada por acetilcolina (Hardman y col., 1996).

Los fármacos antagonistas en general pueden actuar de forma competitiva como no competitiva frente a los fármacos agonistas. El antagonismo competitivo está dado cuando el fármaco antagonista actúa sobre el mismo receptor en el cual actúa el agonista, en tanto el antagonismo no competitivo ocurre cuando el fármaco antagonista actúa en un sitio de fijación íntimamente relacionado con el receptor, pero diferente del sitio de fijación del agonista (Flórez, 1997).

El efecto del sistema parasimpático y por lo tanto la acción de los fármacos agonistas y antagonistas colinérgicos sobre la pared vascular, es en general escaso y variable, dado que la mayor parte de los lechos vasculares carecen de inervación colinérgica importante (Hardman y col., 1996; Flórez, 1997). Por lo tanto, el control nervioso del flujo sanguíneo periférico se realiza fundamentalmente a través del sistema nervioso simpático (Tresguerres y col., 2000).

### 3.3. ALCALOIDES TIPO TROPANO.

Durante el desarrollo de la farmacología han sido aislados numerosos alcaloides, que de acuerdo a estudios en modelos biológicos, presentan múltiples propiedades como por ejemplo: antiinflamatorios, antiarrítmicos, bactericidas y relajantes musculares. Los alcaloides de tipo tropano son un grupo determinado de alcaloides que se encuentran distribuidos en el reino vegetal en varias familias de plantas entre las que se encuentran: Orchidaceae, Dioscoreaceae, Proteaceae, Rhizophoraceae, Cruciferae, Eritroxilaceae, Euphorbiaceae, Convolvulaceae, Brassicaceae, Olacaceae y Solanaceae (Muñoz, 1992).

Los alcaloides tipo tropano son conocidos también como alcaloides de esqueleto tipo tropano o de base de tropano, ya que comparten una estructura molecular común dada por un anillo tropánico. Las diferencias estructurales entre cada uno de los alcaloides están dadas por la diversidad de radicales que se unen al anillo tropánico (Muñoz, 1992).

La principal familia en donde se encuentran los alcaloides de tipo tropano corresponde a la Solanaceae, compuesta por más de tres mil especies de las cuales las tres cuartas partes contienen alcaloides tipo tropano, algunos de innegable importancia terapéutica. Precisamente

en esta familia de plantas fue donde primero se encontraron los alcaloides de tipo tropano y es la que ha recibido mayor atención, particularmente los géneros *Datura*, *Atropa* y *Scopolia*, de donde se extraen comercialmente los principales alcaloides de tipo tropano de interés medicinal como atropina y escopolamina, inhibidores de los efectos muscarínicos de la acetilcolina, al bloquear sobre todo los órganos que reciben inervación parasimpática. Los efectos se manifiestan a nivel cardíaco, vascular, visceral (tracto digestivo y urinario), en las secreciones (digestivas, pancreáticas, sudorales y salivales), a nivel bronquial y ocular (Brachet y col., 1997).

Las investigaciones farmacológicas de los alcaloides tipo tropano están dirigidas al tratamiento de intoxicaciones por organofosforados, en la farmacoterapia de afecciones oculares por su efecto midriático, como inhibidores de la secreción de HCl, estados broncoconstrictivos de predominio vagal, reductoras de la espasticidad del músculo liso intestinal, en la disminución riesgosa de la frecuencia cardíaca, mareos, vómitos y últimamente para minimizar los síntomas de la enfermedad de Parkinson (Muñoz, 1992).

Algunos de los alcaloides tipo tropano naturales y semisintéticos aislados de solanáceas son de actual uso clínico como anticolinérgicos: atropina, pseudoatropina, escopolamina, hioscina, hiosciamina, metil bromuro de anisotropina, entre otros. Una característica de estas moléculas es que la selectividad de sus efectos es variable, presentando a menudo reacciones adversas inconvenientes (Muñoz, 1992). Esto incentiva a investigar la química y farmacología de los alcaloides tipo tropano presentes en el género *Schizanthus* como una eventual fuente de novedosas estructuras con potencial acción selectiva (Hartmann y col., 1996).

Las plantas del género *Schizanthus*, pertenecientes a la familia Solanaceae, son endémicas de Chile, con excepción de *Schizanthus grahamii* cuya área de distribución alcanza también a Argentina (Coccuci, 1989). Existen más de 27 especies diferentes dentro del género *Schizanthus*, siendo conocidas más bien por sus características ornamentales que por sus propiedades químicas o su potencial aplicabilidad medicinal. Suelen ser conocidas por una serie de sinonimias comunes: “orquídea del hombre pobre”, “flor de pajarito”, “pajarito”, “mariposa”, etc. (Gambaro y col., 1983; Muñoz, 1992) (Fotos N° 1 y 2).

En 1979, en el Instituto de Cultivos de Plantas de la República Democrática Alemana en Halle, se informó del primer aislamiento de alcaloides tipo tropano provenientes de plantas del género *Schizanthus* (Muñoz, 1992). Los estudios químicos del género *Schizanthus* en Chile comenzaron con las investigaciones de Castillo y colaboradores a partir de los años 80 (San Martín y col., 1980; Gambaro y col., 1983). Se pudo inferir que el género acumula un amplio espectro de alcaloides derivados del tropano con estructuras únicas (San Martín y col., 1987; De la Fuente y col., 1988), con formación de mono y diésteres derivados principalmente de los ácidos angélico, tíglico, senecioico, itacónico y/o mesacónico; así como la síntesis de derivados higrina e higrolina (Gambaro y col., 1983). De esta forma los alcaloides tipo tropano han sido aislados de diferentes especies del género *Schizanthus* entre las que se encuentran, *S. hookerii* (San Martín y col., 1980; Gambaro y col., 1983), *S. grahamii* (San Martín y col., 1987), *S. litoralis* (Muñoz y col., 1996) y *S. pinnatus* (Griffin y Lin, 1999).

Trabajos en *Schizanthus grahamii* han permitido el aislamiento de una serie de bases diméricas de tropano: Schizanthina C 35, D 37 y E 38; 3 $\alpha$ -senecioiloxitropano 36 (San Martín y col., 1987); Higrina; Higrolina A; Higrolina B; Tropinona; Tropina; Pseudotropina; 3 $\alpha$ -acetoxitropano; 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxitropano; 5-(2-oxopropil)-higrina; 5-(2-hidroxi)-higrina; Cuscohigrina; 3 $\alpha$  senecioiloxi-7  $\beta$ -hidroxitropano; Shizanthina F, G, H e I (Muñoz, 1992). Los alcaloides de *Schizanthus grahamii* que se emplearon en este trabajo corresponden a dos alcaloides cuyos nombres son: 3 $\alpha$ -senecioiloxitropan 6 $\beta$ -ol y 3 $\alpha$ -mesaconilmetiloxitropan 6 $\beta$ -ol, extraídos y purificados a partir de las partes aéreas de la planta.

La variada gama de bases de tropano presentes en *Schizanthus grahamii*, permite suponer que algunas de estas estructuras tendrían actividad anticolinérgica o bien precursores que den origen a estructuras con actividad biológica relacionada (Gringauz, 1997). Lo anterior sumado a que la actividad anticolinérgica sobre los vasos sanguíneos inhibe por completo la vasodilatación periférica y la caída de la presión sanguínea producida por agentes agonistas colinérgicos como acetilcolina y carbacol (Hardman y col., 2001), hacen que la determinación de los efectos sobre la actividad contráctil vascular, de los alcaloides extraídos de *Schizanthus grahamii*, sea de especial importancia.

### 3.4. HIPÓTESIS.

Los alcaloides tipo tropano extraídos de *Schizanthus grahamii* tienen propiedades inhibitorias sobre la relajación de la musculatura lisa vascular inducida por carbacol en aorta de rata.

### 3.5. OBJETIVOS.

Los objetivos planteados en el presente trabajo fueron evaluar los alcaloides tipo tropano extraídos de *Schizanthus grahamii* sobre la actividad contráctil de aorta de rata:

- En ausencia de sustancias vasoactivas.
- Frente a la contracción inducida por noradrenalina.
- Frente a la relajación inducida por carbacol.



Foto N° 1: *Schizanthus grahamii*\*



Foto N° 2: *Schizanthus grahamii*\*\*

---

\*: Disponible en Internet: [http://www.thompson-morgan.com/seeds/us/product\\_7429\\_1.html](http://www.thompson-morgan.com/seeds/us/product_7429_1.html)

\*\* : Disponible en Internet: [http://www.anniesannuals.com/signs/S/Schizanthus\\_grahamii.htm](http://www.anniesannuals.com/signs/S/Schizanthus_grahamii.htm)

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 4.1. MATERIAL.

**4.1.1. Material biológico:** Se utilizaron 20 ratas machos normotensas, cepa Sprague Dawley entre 250 y 300 gramos de peso, provenientes del bioterio del Instituto de Farmacología de la Universidad Austral de Chile. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones ambientales controladas, con ciclos de luz-oscuridad alternados de 12 horas. La temperatura se mantuvo entre 18° y 22°C, y la alimentación ad-libitum con pellet estandarizado.

### 4.1.2. Material farmacológico:

- Carbacol \*
- Etanol \*
- Noradrenalina \*\*
- Sales para solución Krebs Henseleit (NaCl, KCL, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y glucosa) \*\*
- Alcaloides tipo tropano 3 $\alpha$ -senecioloxitropan 6 $\beta$ -ol y 3 $\alpha$ -mesaconilmetiloxitropan 6 $\beta$ -ol, extraídos de *Schizanthus grahamii*\*\*\* (Ver Figuras 1 y 2).
- Mezcla gaseosa con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>\*\*\*\*

### 4.1.3. Instrumentos:

- Baños de órgano aislado.
- Transductor de tensión Grass modelo FCO3C.
- Computador con software ACQ 4.0.
- Equipo de ultrasonido Doppler (parks medical electronics modelo 811-B).
- Material quirúrgico y de laboratorio.

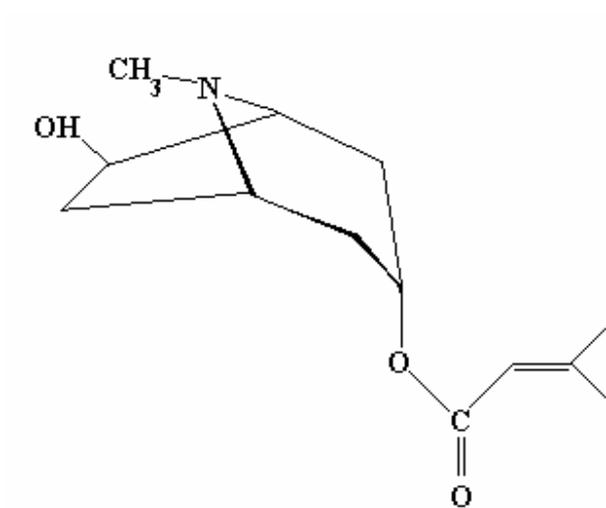
---

\* Laboratorio Sigma.

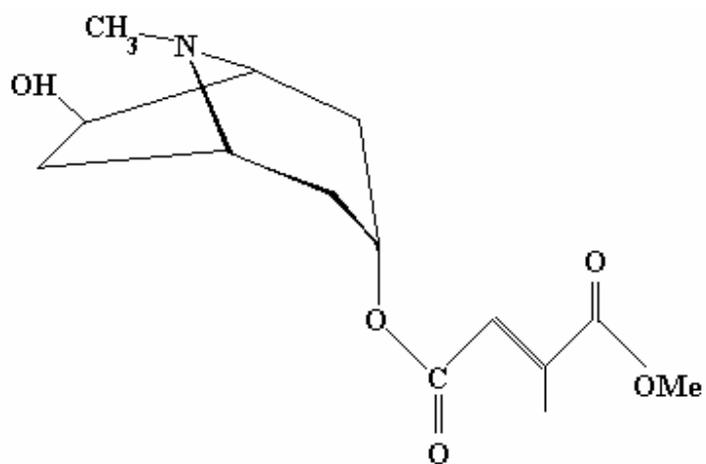
\*\* Laboratorio Merck.

\*\*\* Proporcionados por el Dr. Orlando Muñoz, Dpto. de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

\*\*\*\* AGA S.A.



**Figura N° 1: 3α-senecioloxitropan 6β-ol**



**Figura N° 2: 3α-mesaconilmetiloxitropan 6β-ol**

## 4.2. MÉTODOS.

**4.2.1. Obtención y preparación de la aorta de rata:** Se midió la presión sanguínea a las ratas con un equipo de ultrasonido Doppler, para determinar aquellas que eran normotensas. Posteriormente las ratas normotensas fueron sacrificadas por decapitación con guillotina y se les extrajo el segmento de aorta comprendido entre el arco aórtico y el diafragma.

El segmento de aorta fue depositado sobre una placa de petri que contenía una solución de Krebs Henseleit cuya composición es (en mM): NaCl 118,4; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 1,25; MgSO<sub>4</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 24,9; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 y glucosa 11,1. El segmento de aorta se limpió cuidadosamente de grasa y adherencias, para luego cortar anillos de 3 a 5 mm de largo.

**4.2.2. Valoración de la actividad de aorta aislada de rata:** Los anillos de aorta se montaron sobre dos pequeños ganchos metálicos, ubicados en el interior del baño de órgano aislado. Los ganchos metálicos estaban conectados a un transductor de tensión isométrico que registró los cambios de la actividad contráctil de la aorta para ser graficados por el software ACQ 4.0. El baño de órgano aislado contenía 3 ml de solución Krebs Henseleit a 37°C (+/- 0,5°C), siendo burbujeadado constantemente con una mezcla gaseosa de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>.

Los anillos de aorta, montados en los baños de órgano aislado, fueron estabilizados a 2 gramos de tensión durante 40 minutos, cambiando la solución de Krebs Henseleit cada 10 minutos.

Las bases utilizadas en la preparación y valoración de la actividad de aorta aislada, están de acuerdo a los protocolos descritos por Enna y col. (1998).

Los baños de órgano aislado han sido utilizados y validados en diferentes trabajos científicos dirigidos a valorar la actividad contráctil de aorta de ratas (Campos y col., 2000; Fauaz y col., 2000).

**4.2.3. Determinación de la viabilidad del tejido:** Con el objeto de determinar la viabilidad del tejido, transcurridos 40 minutos de estabilización, se contrajo la aorta de rata con noradrenalina ( $3 \times 10^{-7} \text{M}$ ) y a continuación se relajó con carbacol ( $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ). Luego se estabilizó nuevamente a 2 gramos durante 40 minutos, cambiando la solución de Krebs Henseleit cada 10 minutos. El procedimiento realizado para determinar la viabilidad del tejido ha sido validado por Campos y col. (2000).

**4.2.4. Series en estudio:** Una vez estabilizado y determinada la viabilidad del tejido, los anillos de aorta de rata fueron preincubados según la serie en estudio correspondiente.

SERIE CONTROL: Preincubada durante 10 minutos con etanol (0,5°).

SERIE EXPERIMENTAL 1: Preincubada durante 10 minutos con 0,03 mg/ml de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii* disueltos en etanol.

SERIE EXPERIMENTAL 2: Preincubada durante 10 minutos con 0,1 mg/ml de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii* disueltos en etanol.

#### 4.2.5. Evaluaciones realizadas en cada serie en estudio:

**4.2.5.1. Evaluación de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii* sobre la actividad contráctil de aorta de rata, en ausencia de sustancias vasoactivas:** Una vez estabilizado el tejido durante 40 minutos, se evaluó el efecto de las preincubaciones de las tres series en estudio durante 10 minutos, sobre la actividad contráctil de aorta de rata en ausencia de sustancias vasoactivas.

**4.2.5.2. Evaluación de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii* sobre la actividad contráctil de aorta de rata, contraída con noradrenalina:** Una vez estabilizado el tejido durante 40 minutos, se evaluó el efecto de las tres series en estudio sobre la actividad contráctil de aorta de rata, contraída con noradrenalina ( $3 \times 10^{-7} \text{M}$ ) durante 5 minutos.

**4.2.5.3. Evaluación de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii* sobre la actividad contráctil de aorta de rata, relajada con carbacol:** Una vez estabilizado el tejido durante 40 minutos, se evaluó el efecto de las tres series en estudio sobre la actividad contráctil de aorta de rata, precontraída con noradrenalina ( $3 \times 10^{-7} \text{M}$ ) y relajada con ocho concentraciones de carbacol ( $1 \times 10^{-4}$  a  $3 \times 10^{-8} \text{M}$ ), dando forma a tres curvas de dosis-respuesta.

**Cuadro N°1:** Evaluaciones realizadas en las tres series en estudio sobre la actividad contráctil de aorta de rata.

SERIES	EVALUACIÓN PREINCUBACIÓN	EVALUACIÓN CONTRACCIÓN	EVALUACIÓN RELAJACIÓN
Control	Etanol	Noradrenalina ( $3 \times 10^{-7} \text{M}$ )	Carbacol ( $1 \times 10^{-4}$ a $3 \times 10^{-8} \text{M}$ )
Experimental 1	<i>Schizanthus grahamii</i> 0,03 mg/ml	Noradrenalina ( $3 \times 10^{-7} \text{M}$ )	Carbacol ( $1 \times 10^{-4}$ a $3 \times 10^{-8} \text{M}$ )
Experimental 2	<i>Schizanthus grahamii</i> 0,1 mg/ml	Noradrenalina ( $3 \times 10^{-7} \text{M}$ )	Carbacol ( $1 \times 10^{-4}$ a $3 \times 10^{-8} \text{M}$ )

**4.2.6. Procedimiento estadístico:** Los resultados obtenidos se expresaron en valores promedios y sus errores típicos, efectuándose además pruebas inferenciales interserie paramétricas y no paramétricas. Se trabajó con un nivel de significación de 0,05; se consideró como significativo un  $p < 0,05$ .

A continuación se detalla la metodología estadística aplicada en el análisis de los resultados de este estudio:

- Prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov, la que se usó para comprobar la normalidad de los datos (Zar, 1999).

- Prueba de homocedasticidad de Bartlett, usada para comprobar que las varianzas entre las series sean homogéneas (Zar, 1999).

- Análisis de varianza paramétrico (Andeva) de una vía, cuyo objetivo es comparar los promedios de tres o más grupos de datos (Spiegel, 1991).

- Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, usada en los casos en que el Andeva paramétrico resultó significativo (Zar, 1999).

- Análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, el que se usó en los casos en que no se cumplen los requisitos de normalidad y homocedasticidad (Rosner, 2000).

- Prueba de comparación múltiple no paramétricas de Dunn, la que se aplicó en los casos en que la prueba de Kruskal-Wallis resultó significativa (Rosner, 2000).

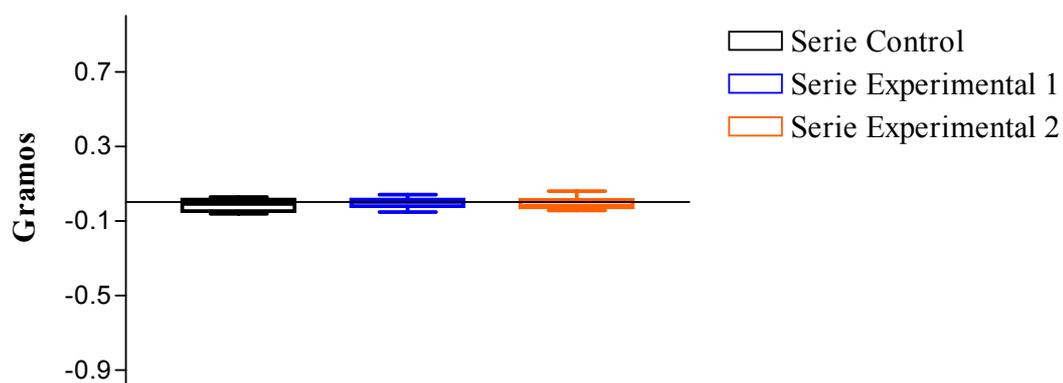
- Para las curvas de dosis respuesta sigmoideas se utilizó la siguiente fórmula:  
$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{-(\text{LogEC50} - X) \times \text{HillSlope}})$$

El análisis de los resultados se realizó usando el programa computacional estadístico Graph Pad Prism (versión 2.0).

## 5. RESULTADOS.

### 5.1. EVALUACIÓN DE ALCALOIDES TIPO TROPANO PRESENTES EN *Schizanthus grahamii* SOBRE LA ACTIVIDAD CONTRÁCTIL DE AORTA DE RATA, EN AUSENCIA DE SUSTANCIAS VASOACTIVAS.

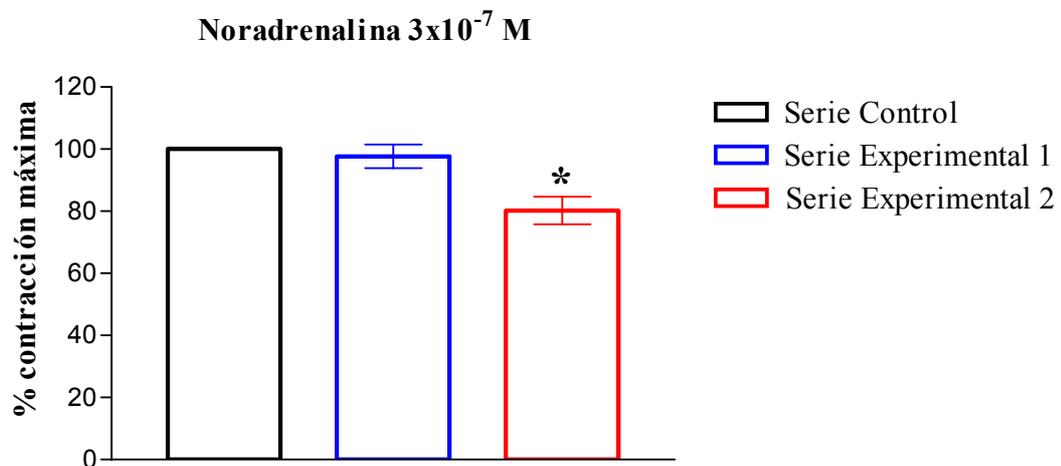
Al evaluar la serie control preincubada con etanol y las series experimentales 1 y 2 preincubadas con 0,03 y 0,1 mg/ml respectivamente, de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii*, se pudo determinar que no existió actividad sobre el tono de la musculatura lisa de aorta en ninguna de las series en estudio. De acuerdo a esto no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (Ver Gráfico N° 1, Anexos N° 1 y 2).



**Gráfico N° 1:** Variación de la actividad contráctil de aorta de rata, en la serie control preincubada con etanol y en las series experimentales 1 y 2 preincubadas con 0,03 y 0,1 mg/ml respectivamente, de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii*. Cada barra representa el promedio +/- error típico de un “n” de 8 animales.

## 5.2. EVALUACIÓN DE ALCALOIDES TIPO TROPANO PRESENTES EN *Schizanthus grahamii* SOBRE LA ACTIVIDAD CONTRÁCTIL DE AORTA DE RATA, CONTRAÍDA CON NORADRENALINA.

Al contraer con noradrenalina ( $3 \times 10^{-7} \text{M}$ ) la musculatura lisa de aorta de rata de la serie control preincubada con etanol y de las series experimentales 1 y 2 preincubadas con 0,03 y 0,1 mg/ml respectivamente, de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii*, se observó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la contracción de la serie experimental 2, respecto a la contracción de la serie control (Ver Gráfico N° 2, Figura N° 3, Anexos N° 3).



**Gráfico N° 2:** Porcentaje de contracción máxima inducida por noradrenalina ( $3 \times 10^{-7} \text{M}$ ), en la serie control preincubada con etanol y en las series experimentales 1 y 2, preincubadas con 0,03 y 0,1 mg/ml respectivamente, de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii*. Cada barra representa el promedio  $\pm$  error típico de un “n” de 8 animales. Asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.

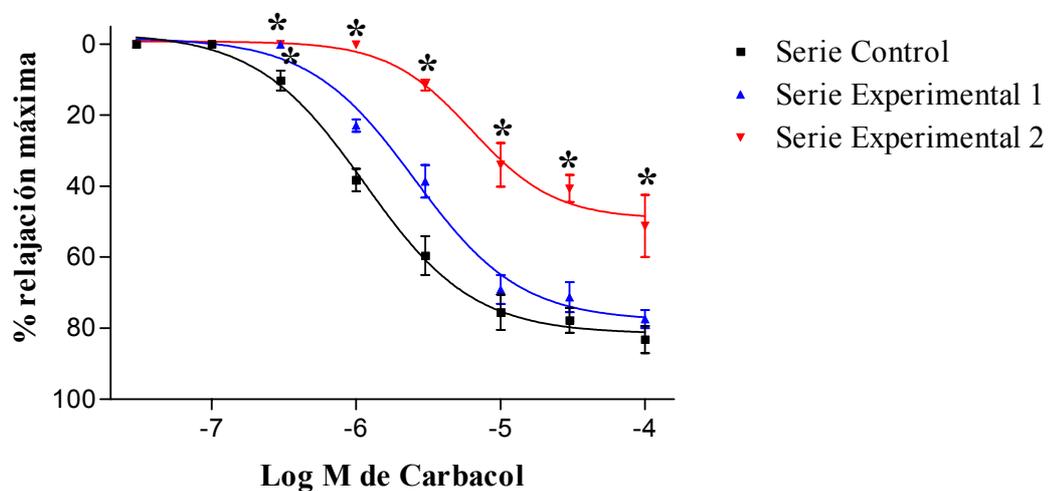
## 5.3. EVALUACIÓN DE ALCALOIDES TIPO TROPANO PRESENTES EN *Schizanthus grahamii* SOBRE LA ACTIVIDAD CONTRÁCTIL DE AORTA DE RATA, RELAJADA CON CARBACOL.

Al relajar la musculatura lisa de aorta de rata con ocho concentraciones de carbacol ( $1 \times 10^{-4}$  a  $3 \times 10^{-8} \text{M}$ ), en la serie control preincubada con etanol y en las series experimentales 1 y 2 preincubadas con 0,03 y 0,1 mg/ml respectivamente, de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii*, se pudo observar una menor relajación con un desplazamiento hacia la derecha de las curvas de dosis-respuesta de las series experimentales 1 y 2, respecto a la curva de dosis-respuesta de la serie control. El análisis estadístico mostró diferencias

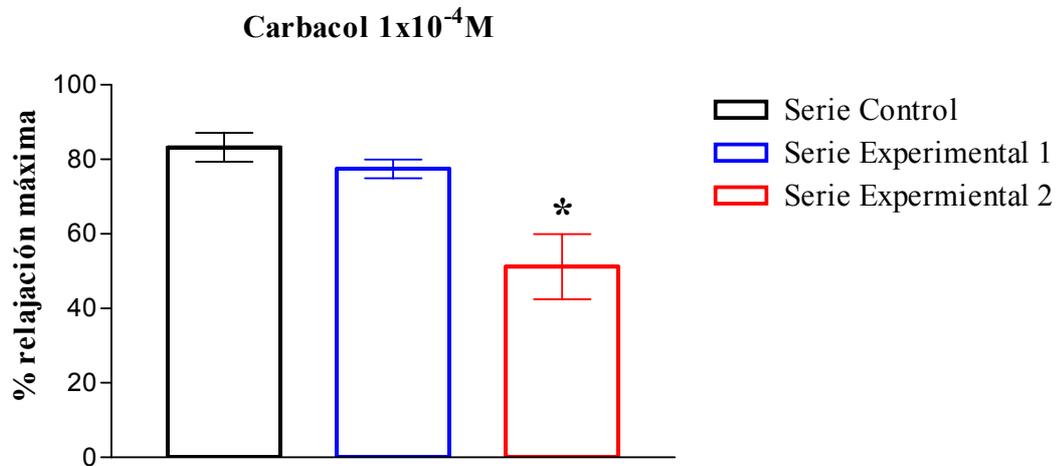
significativas ( $p < 0,05$ ) entre la serie experimental 2 y la serie control, en seis de las ocho concentraciones de carbacol utilizadas (Ver Gráfico N° 3, Figura N° 3).

En los gráficos N° 4, 5, 6 y 7, se observa la disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la relajación en la serie experimental 2, en relación al control. En el gráfico N° 8 se observa una inhibición significativa ( $p < 0,05$ ) de la relajación en la serie experimental 2. En el gráfico N° 9 la inhibición significativa se observa en ambas series experimentales (Ver Anexos N° 4 al 9).

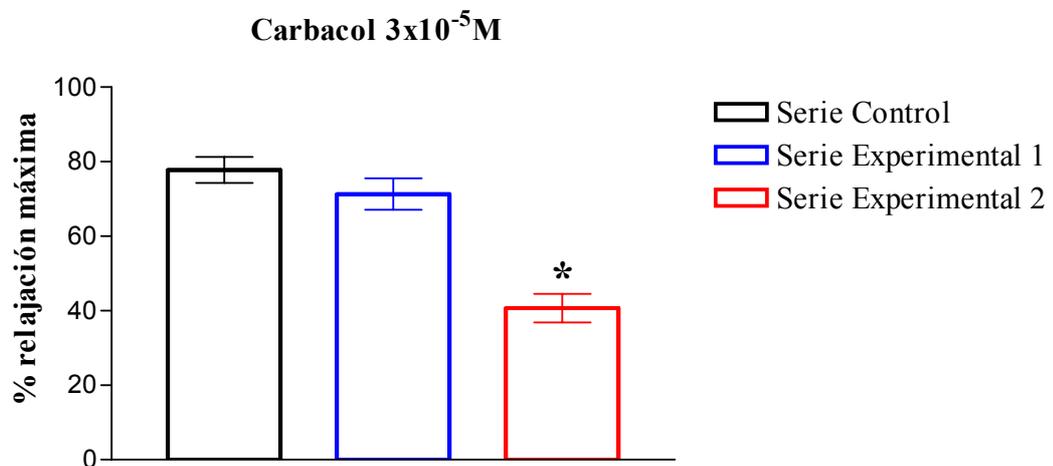
Los valores de  $EC_{50}$ , que corresponden a la concentración del fármaco por la cual se obtiene la mitad del efecto máximo, fueron para las series control y experimentales 1 y 2 de: 3.94, 3.59 y 3.20  $-\text{Log}_{10}$  respectivamente, existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre la serie control y ambas series experimentales (Ver gráfico N° 10).



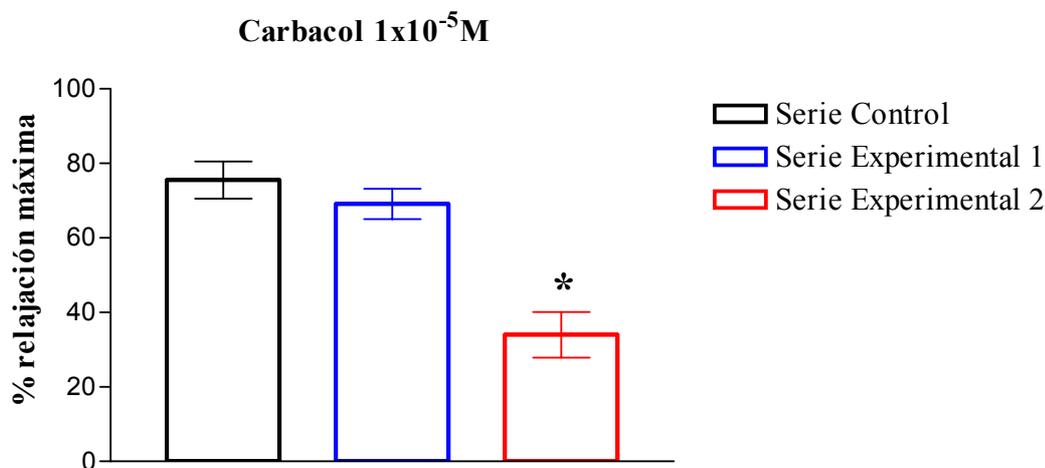
**Gráfico N° 3:** Curvas de dosis-respuesta inducidas por carbacol, en la serie control preincubada con etanol y en las series experimentales 1 y 2 preincubada con 0,03 y 0,1 mg/ml respectivamente, de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii*. Cada punto representa el promedio  $\pm$  error típico de un “n” de 6 animales. Asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.



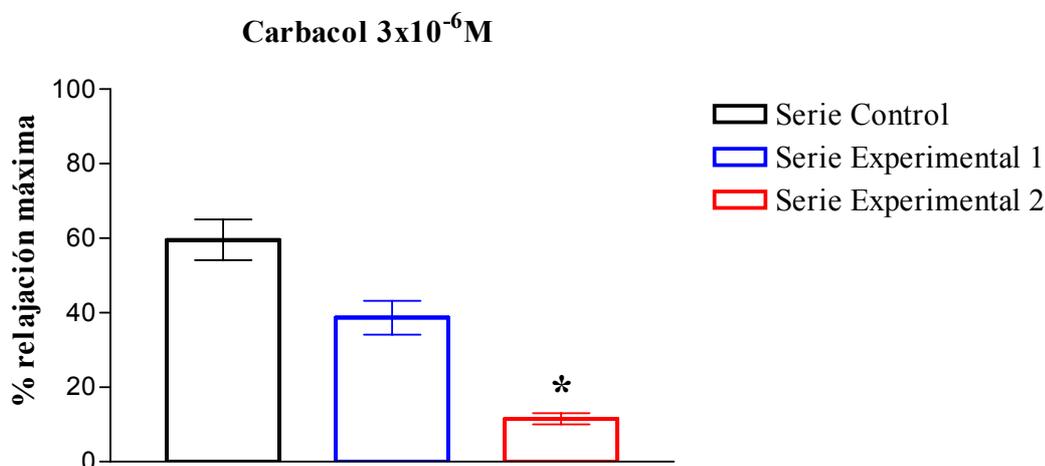
**Gráfico N° 4:** Porcentaje de relajación máxima inducida por carbacol ( $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ), en la serie control preincubada con etanol y en las series experimentales 1 y 2 preincubada con 0,03 y 0,1 mg/ml respectivamente, de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii*. Cada barra vertical representa el promedio  $\pm$  el error típico de un “n” de 6 animales. Asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.



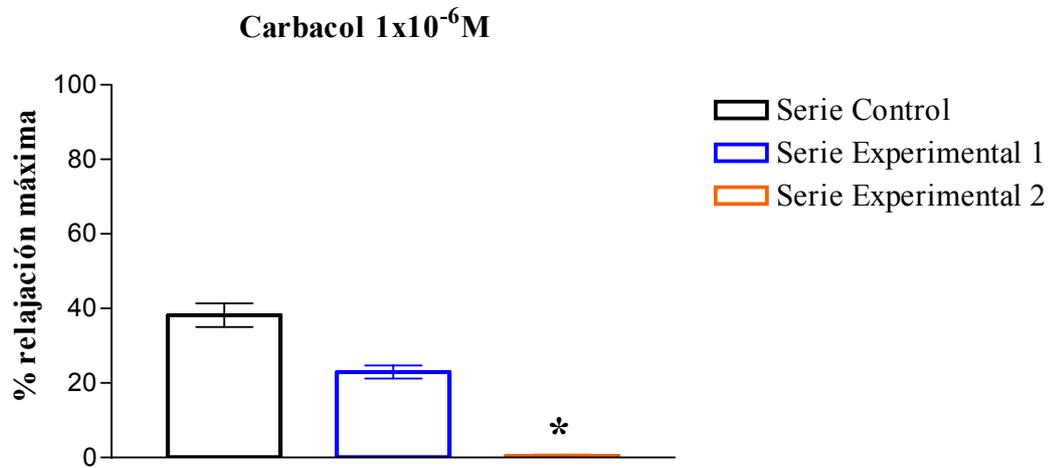
**Gráfico N° 5:** Porcentaje de relajación máxima inducida por carbacol ( $3 \times 10^{-5} \text{M}$ ), en la serie control preincubada con etanol y en las series experimentales 1 y 2 preincubada con 0,03 y 0,1 mg/ml respectivamente, de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii*. Cada barra vertical representa el promedio  $\pm$  el error típico de un “n” de 6 animales. Asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.



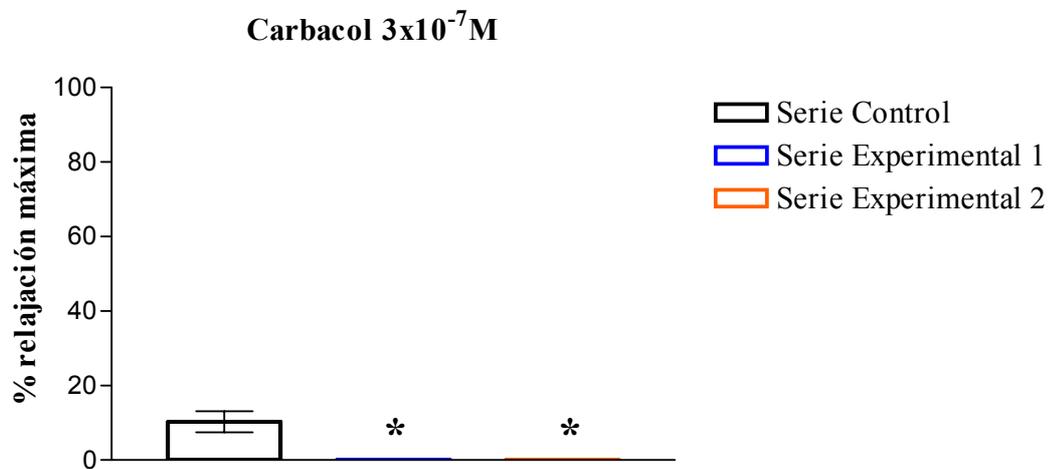
**Gráfico N° 6:** Porcentaje de relajación máxima inducida por carbacol ( $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ), en la serie control preincubada con etanol y en las series experimentales 1 y 2 preincubada con 0,03 y 0,1 mg/ml respectivamente, de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii*. Cada barra vertical representa el promedio  $\pm$  el error típico de un “n” de 6 animales. Asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.



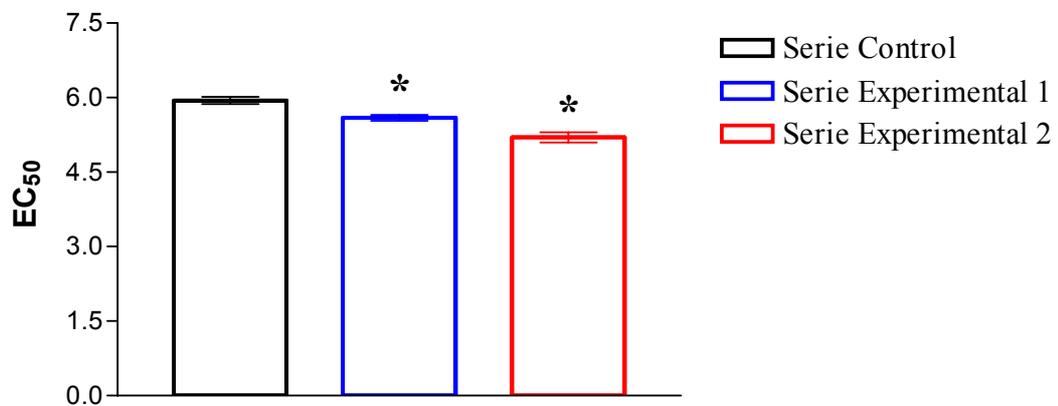
**Gráfico N° 7:** Porcentaje de relajación máxima inducida por carbacol ( $3 \times 10^{-6} \text{M}$ ), en la serie control preincubada con etanol y en las series experimentales 1 y 2 preincubada con 0,03 y 0,1 mg/ml respectivamente, de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii*. Cada barra vertical representa el promedio  $\pm$  el error típico de un “n” de 6 animales. Asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.



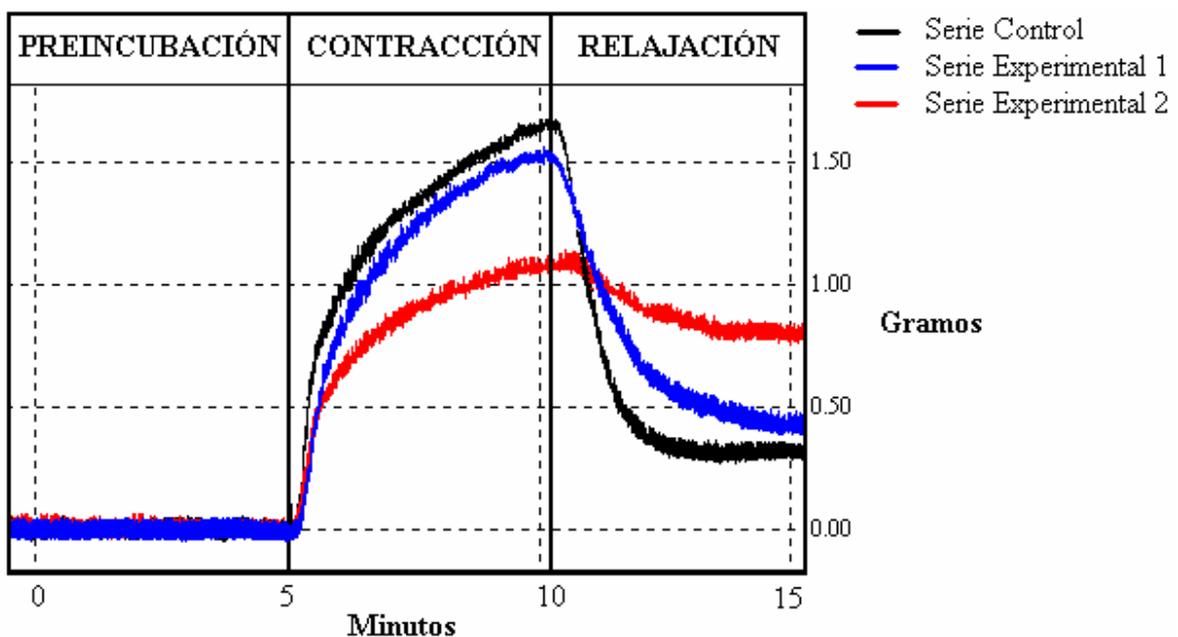
**Gráfico N° 8:** Porcentaje de relajación máxima inducida por carbacol ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ), en la serie control preincubada con etanol y en las series experimentales 1 y 2 preincubada con 0,03 y 0,1 mg/ml respectivamente, de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii*. Cada barra vertical representa el promedio  $\pm$  el error típico de un “n” de 6 animales. Asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.



**Gráfico N° 9:** Porcentaje de relajación máxima inducida por carbacol ( $3 \times 10^{-7} \text{M}$ ), en la serie control preincubada con etanol y en las series experimentales 1 y 2 preincubada con 0,03 y 0,1 mg/ml respectivamente, de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii*. Cada barra vertical representa el promedio  $\pm$  el error típico de un “n” de 6 animales. Asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.



**Gráfica N° 10:** EC<sub>50</sub> en aorta de rata relajada con carbacol, en la serie control preincubada con etanol y en las series experimentales 1 y 2 preincubada con 0,03 y 0,1 mg/ml respectivamente, de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii*. Cada barra vertical representa el promedio +/- el error típico de un “n” de 6 animales. Asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) respecto al control.



**Figura N° 3:** Ejemplo de un registro gráfico de la actividad contráctil de aorta de rata, contraída con noradrenalina ( $3 \times 10^{-7} M$ ) y relajada con carbacol ( $1 \times 10^{-5} M$ ), para la serie control preincubada con etanol y las series experimentales 1 y 2 preincubadas con 0,03 y 0,1 mg/ml respectivamente, de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii*.

## 6. DISCUSIÓN.

### 6.1. EVALUACIÓN DE ALCALOIDES TIPO TROPANO PRESENTES EN *Schizanthus grahamii* SOBRE LA ACTIVIDAD CONTRÁCTIL DE AORTA DE RATA, EN AUSENCIA DE SUSTANCIAS VASOACTIVAS.

La determinación de los efectos de alcaloides sobre la actividad contráctil de aorta de rata, en ausencia de sustancias vasoactivas, es una evaluación validada por trabajos anteriores dirigida a determinar la actividad de los alcaloides, previo a la evaluación frente a sustancias vasoactivas como noradrenalina y carbacol (Li y col., 1998).

Guerrero y col. (2002), valoraron la actividad de extractos de plantas disueltos en etanol sobre la actividad contráctil de aorta aislada de rata, utilizado etanol como control.

Los resultados de la evaluación de los alcaloides en estudio, en ausencia de sustancias vasoactivas, mostraron que no hubo actividad contráctil sobre aorta de rata en ninguna de las series en estudio. Esto coincide con los resultados obtenidos por Castillo (2002) y Mancilla (2002), en donde se valoró la actividad de alcaloides tipo tropano presentes en el género *Schizanthus* sobre la musculatura lisa de íleon de rata. En estos trabajos, los efectos observados para los alcaloides sólo se presentaron frente a la acción de agentes agonistas colinérgicos, como carbacol o acetilcolina, debido a sus posibles propiedades anticolinérgicas, sin describirse una actividad en ausencia de otras sustancias (Muñoz, 1992; Mancilla, 2002). Si bien, estos trabajos fueron realizados en tejidos diferentes, el íleon al igual que la aorta presenta receptores muscarínicos que desencadenan efectos sobre la musculatura lisa al ser activados por carbacol o acetilcolina (Tresguerres y col., 2000).

### 6.2. EVALUACIÓN DE ALCALOIDES TIPO TROPANO PRESENTES EN *Schizanthus grahamii* SOBRE LA ACTIVIDAD CONTRÁCTIL DE AORTA DE RATA, CONTRAÍDA CON NORADRENALINA.

Las catecolaminas son consideradas un importante factor de regulación del tono vascular. La noradrenalina es una catecolamina natural, siendo el neurotransmisor de las neuronas simpáticas posganglionares. Los receptores adrenérgicos son estructuras moleculares que reciben selectivamente la señal de adrenalina y noradrenalina, respondiendo a través de una respuesta celular específica (Flórez, 1997). En las arterias predominan receptores  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , y  $\beta_2$  adrenérgicos. La noradrenalina genera vasoconstricción sobre la aorta al activar receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , ubicados tanto en el endotelio como en la musculatura lisa vascular (Fauaz y col., 2000). A su vez, tanto el bloqueo de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos

como la activación de receptores  $\beta$  adrenérgicos lleva a una inhibición o disminución en la actividad de noradrenalina (Hardman y col., 1996).

La importancia de evaluar la actividad de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii*, sobre la contracción producida por noradrenalina, radica en que se han descrito alcaloides naturales que poseen la propiedad de modificar la actividad de noradrenalina, sobre la musculatura lisa de aorta de rata (Satake y col., 1992; Iturriaga., 2001).

Los resultados de la contracción inducida por noradrenalina ( $3 \times 10^{-7}M$ ), mostraron que la magnitud de la contracción de la serie experimental 2, preincubada con 0,1 mg/ml de alcaloides, fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) a la contracción obtenida en la serie control. Esto concuerda con estudios en los que se ha probado la capacidad de diferentes alcaloides para disminuir o inhibir la respuesta contráctil de noradrenalina, en aorta aislada de rata (Chen y col., 1994; Iturriaga 2001; Orallo y Alzueta 2001).

En diferentes publicaciones se ha determinado que atropina y escopolamina, además de sus conocidas propiedades anticolinérgicas, poseen la capacidad de relajar la musculatura lisa vascular y así inhibir o disminuir las contracciones inducidas por noradrenalina. Estas propiedades han sido observadas para atropina en aorta aislada de conejo y rata, en concentraciones más altas que las que generan el efecto anticolinérgico (Satake y col., 1992; Kwan y col., 2003). Estos estudios concordarían con los resultados obtenidos en el presente trabajo, considerando que los alcaloides presentes en *Schizanthus grahamii* al igual que atropina y escopolamina, son de tipo tropano al compartir una base molecular dada por un anillo tropánico. Estas similitudes hacen que posiblemente posean propiedades farmacológicas similares (Muñoz, 1992).

Los mecanismos más probables por los cuales los alcaloides tipo tropano extraídos de *Schizanthus grahamii* disminuyen la magnitud de la contracción inducida por noradrenalina podrían estar dados, tal como se describe para atropina, por inactivación directa de canales de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  dependientes tanto de voltaje como de receptores, y por estimulación de factores relajantes derivados de endotelio (Satake y col., 1992; Kwan y col., 2003). Esto no ha sido demostrado para los alcaloides en estudio, por lo que se deben considerar los mecanismos demostrados en otros alcaloides naturales por los cuales también es posible explicar la disminución en la magnitud de la contracción inducida por noradrenalina. Dentro de estos mecanismos se encuentra: el bloqueo de receptores  $\alpha$  adrenérgicos (Iturriaga, 2001); la estimulación de receptores  $\beta$  adrenérgicos (Satake y col., 1992); la estimulación directa de factores relajantes dependientes de endotelio como prostaciclina ( $PGI_2$ ) y óxido nítrico (Paredes y col., 1997). Es conveniente señalar que existen reactivos y protocolos que permiten determinar cada uno de los mecanismo mencionados (Enna y col., 1998; Campos y col., 2000; Kwan y col., 2003).

### 6.3. EVALUACIÓN DE ALCALOIDES TIPO TROPANO PRESENTES EN *Schizanthus grahamii* SOBRE LA ACTIVIDAD CONTRÁCTIL DE AORTA DE RATA, RELAJADA CON CARBACOL.

El carbacol es un fármaco agonista colinérgico de origen sintético, perteneciente al grupo de los ésteres de colina y ácido carbámico. La esterificación con ácido carbámico que posee carbacol le confiere una alta resistencia a la hidrólisis por colinesterasas, por lo que su acción es mucho más prolongada que la de acetilcolina. El carbacol es capaz de activar todos los subtipos de receptores muscarínicos, aunque se fija más fuertemente a los receptores M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> (Flórez, 1997).

Está bien establecido que los efectos de agonistas muscarínicos como carbacol y acetilcolina sobre el tono de la musculatura lisa de anillos de aorta con endotelio intacto, están dados por su acción sobre receptores muscarínicos, especialmente el subtipo M<sub>3</sub> ubicado a nivel endotelial. La activación de estos receptores M<sub>3</sub> lleva a una relajación endotelio dependiente producida principalmente por la liberación de factores relajantes derivados de endotelio como óxido nítrico (Neelam y col., 1991). Esto ocurre normalmente en ratas normotensas a diferencia de lo que sucede en ratas hipertensas donde la activación de receptores M<sub>3</sub> por parte de agentes agonistas colinérgicos como carbacol o acetilcolina, en dosis de  $3 \times 10^{-7}$  a  $3 \times 10^{-5}$  M, producen contracción de la aorta aislada de rata a través de la liberación de factores constrictores derivados de endotelio (Boulanger y col., 1994).

La actividad farmacológica más estudiada para los alcaloides tipo tropano pertenecientes a la familia Solanaceae, como atropina y escopolamina, corresponde a su acción anticolinérgica al bloquear receptores muscarínicos (Muñoz, 1992). Existen trabajos en donde se ha determinado la capacidad de los alcaloides tipo tropano presentes en plantas del género *Schizanthus*, de inhibir la acción de agentes colinérgicos en íleon de rata (Castillo, 2002; Mancilla, 2002).

La evaluación del efecto de los alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii*, sobre la relajación inducida por carbacol, mostró una disminución e inhibición significativa ( $p < 0,05$ ) de la relajación, con un claro desplazamiento hacia la derecha de la curva de dosis-respuesta de la serie experimental 2, en comparación a la curva de dosis-respuesta de la serie control. Considerando los valores de EC<sub>50</sub> y la forma de las curvas de dosis-respuesta obtenidas, se demuestra que es necesario aplicar una dosis de mayor concentración de carbacol al ir aumentando la concentración del alcaloide para obtener el 50% del efecto máximo, determinado así una relación entre la concentración del alcaloide y su efecto inhibitorio sobre la relajación inducida por carbacol (Hardman y col., 2001).

En el supuesto, que el efecto de los alcaloides en estudio este dado por un antagonismo colinérgico, este podría ser de tipo competitivo si se consideran las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) de las EC<sub>50</sub> obtenidas entre la serie control y ambas series experimentales. Sin embargo, la forma de las curvas de dosis-respuesta resultantes son propias de un antagonismo de tipo no competitivo (Flórez, 1997; Hardman y col., 2001). Para

determinar claramente el tipo de antagonismo que podría estar presente es necesario realizar estudios de unión a receptores específicos (Enna y col., 1998).

Estudios realizados con alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus hookeri*, *Schizanthus litoralis* y *Schizanthus grahamii*, demostraron la capacidad de estos alcaloides de inhibir o disminuir el efecto de agonistas colinérgicos como carbacol y acetilcolina sobre el tono de la musculatura lisa de íleon aislado de rata (Castillo, 2002; Mancilla, 2002;), lo que concuerda con los resultados obtenidos.

Los resultados de las curvas de dosis-respuesta y sus respectivos valores de EC<sub>50</sub> obtenidos en el presente trabajo, concuerdan con lo observado por Mancilla (2002) en íleon aislado de rata, en donde al aplicar alcaloides de tipo tropano extraídos de *Schizanthus grahamii*, previo a la aplicación de dosis acumulativas de carbacol, observó un desplazamiento de la curva dosis-respuesta hacia la derecha y una inhibición de la contracción máxima del íleon, para las concentraciones de 0,001 y 0,01 mg/ml de alcaloides. Todos los valores de EC<sub>50</sub> obtenidos por Mancilla (2002) presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al control.

Los efectos inhibitorios sobre la relajación inducida por carbacol, demostrados en el presente trabajo para los alcaloides tipo tropano extraídos de *Schizanthus grahamii*, podrían estar dados por propiedades anticolinérgicas. Esto basado en la capacidad de diferentes alcaloides tipo tropano para unirse a receptores colinérgicos, tanto muscarínicos como nicotínicos (Schmeller y col., 1995), y a las propiedades anticolinérgicas descritas para estos alcaloides, como es el caso de atropina y escopolamina (Flórez, 1997).

Sin embargo, aunque las propiedades anticolinérgicas aparecen como uno de los mecanismos más probables para explicar el efecto de los alcaloides presentes en *Schizanthus grahamii* frente a la relajación inducida por carbacol, no es posible asegurar la existencia de dichas propiedades. Esto dado a que es necesario comprobar efectivamente si los alcaloides tipo tropano empleados en el presente estudio se unen a receptores colinérgicos o bien están operando a través de otros mecanismos.

Para llegar a determinar claramente a que nivel operan los alcaloides tipo tropano extraídos de *Schizanthus grahamii*, se deben considerar los diferentes mecanismos por los cuales estos alcaloides pueden provocar una disminución o inhibición de la relajación inducida por carbacol. Estos mecanismos están dados por: propiedades anticolinérgicas, dadas por un bloqueo de receptores muscarínicos (Mancilla, 2002); antagonismo sobre receptores  $\beta$  adrenérgicos (Flórez, 1997); inhibición directa de los factores relajantes derivados de endotelio (Grieve y col., 1998); actividad sobre canales de Ca<sup>2+</sup> (Flórez, 1997). Además, en el caso de tratarse de receptores, se deben considerar estudios de marcaje de agonistas y antagonistas específicos (Schmeller y col., 1995; Enna y col., 1998).

Los efectos sobre la contracción y relajación en aorta de rata descritos en el presente trabajo para los alcaloides tipo tropano extraídos de *Schizanthus grahamii*, contribuyen al conocimiento de la farmacología de estos alcaloides a nivel vascular e incentivan la

realización de nuevos estudios dirigidos a determinar los mecanismos de acción específicos por los cuales se producen estos efectos, como también las investigaciones orientadas al posible uso de estos alcaloides en la farmacoterapia de medicina humana y veterinaria.

#### 6.4. CONCLUSIONES.

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo al evaluar los alcaloides tipo tropano:  $3\alpha$ -senecioloxitropan  $6\beta$ -ol y  $3\alpha$ -mesaconilmetiloxitropan  $6\beta$ -ol, presentes en *Schizanthus grahamii*, sobre la actividad contráctil de aorta de rata, se concluye que estos alcaloides:

- No generan actividad contráctil en ausencia de sustancias vasoactivas.
- Producen una disminución en la magnitud de la contracción inducida por noradrenalina.
- Producen una disminución o inhibición de la relajación inducida por carbacol.

De acuerdo a los resultados obtenidos se acepta la hipótesis planteada: “los alcaloides tipo tropano extraídos de *Schizanthus grahamii* tienen propiedades inhibitorias sobre la relajación de la musculatura lisa vascular inducida por carbacol en aorta de rata”.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

- BOULANGER, C.M., K.J. MORRISON, P.M. VANHOUTTE. 1994. Mediation by M<sub>3</sub> muscarinic receptors of both endothelium-dependent contraction and relaxation to acetylcholine in the aorta of spontaneously hypertensive rat. *Br. J. Pharmacol.* 112: 519-524.
- BRACHET, A., O. MUÑOZ, M. GUPTA, J.L. VEUTHEY, P.H. CHRISTEN. 1997. Alkaloids of *Erithroxylum lucidum* Stem-Bark. *Phytochemistry.* 46: 1439-1442.
- CAMPOS, M.G., M.V. OROPEZA, T. VILLANUEVA, M.I. AGUILAR, G. DELGADO, H.A PONCE. 2000. Xanthorrhizol induces endothelium-independent relaxation of rat thoracic aorta. *Life. Sci.* 67: 327-333.
- CASTILLO, C.A. 2002. Evaluación del efecto inhibitorio del tono muscular de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus hookeri* sobre íleon de rata. Memoria de Título, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- CHEN. W.Y., F.N. KO, Y.C. WU, S.T. LU, TENG. C.M. 1994. Vasorelaxing effect in rat thoracic aorta caused by laurotetanine isolated from *Litsea cubeba* Persoon. *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 380-382.
- COCCUCI, A. 1989. El mecanismo floral de *Schizanthus Kurtziana*. 20: 113-132.
- CUNNINGHAM, J. 1999. Fisiología Veterinaria. 2ª ed., McGraw-Hill interamericana. Ciudad de México. México.
- DE LA FUENTE, G., M. REINA, O. MUÑOZ, A. SAN MARTIN, P.J. GIRAULT. 1988. Tropane alkaloids from *Schizanthus pinnatus*. *Heterocycles.* 27: 1887-1897.
- EGLIN, R.M., H.S. SHARATH, N. WATSON. 1996. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol. Rev.* 48: 531-556.
- ENNA, S.J., M. WILLIAMS, J.W. FERKANY, T. KENAKIN, R.D. PORSOLT, J.P. SULLIVAN. 1998. Current Protocols in Pharmacology. Volumen 1. Current Protocols. United States of America.
- FAUAZ, G., T. FERES, A. BORGES, T. PAIVA. 2000. Alpha-2 adrenoceptors are present in rat aorta smooth muscle cells, and their action is mediated by ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Br. J. Pharmacol.* 131: 788-794.
- FLÓREZ. J. 1997. Farmacología humana. 3ª ed., Masson. Barcelona. España.

- FURCHGOTT, R.F., ZAWADZKI, J.V. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288: 373-376.
- GAMBARO, V., C. LABBE, M. CASTILLO. 1983. Angeloyl, tigloyl and seneciroyl oxitropane alkaloids from *Schizanthus hoockeri*. *Phytochemistry*. 22: 1838-1839.
- GANONG, W. 1998. Fisiología Médica. 16ª ed., El manual moderno. Ciudad de México. México.
- GRIEVE, D.J., M.A. AVELLA, K.M. BOTHAM, J. ELLIOTT. 1998. Effects of chylomicrons and chylomicron remnants on endothelium-dependent relaxation of rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 348: 181-190.
- GRIFFIN W.J., D.G. LIN. 1999 Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry*. 53: 623-636.
- GRINGAUZ, A. 1997. Introduction to medical chemistry. Wiley-VCH Inc, New York. United States of America.
- GUERRERO, M.F., P. PUEBLA, R. CARRON, M.L. MARTIN, L. ARTEAGA, L.S. ROMAN. 2002. Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 80: 37-42.
- HARDMAN, J., L. LIMBIRD, A. GOODMAN. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª ed., McGraw-Hill interamericana. Ciudad de México. México.
- HARDMAN, J., L. LIMBIRD, A. GOODMAN. 2001. The pharmacological basis of therapeutics. 10<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill. New York. United States of America.
- HARTMANN, R., A. SAN MARTIN, O. MUÑOZ, BREITMAIER. 1996. Grahamine an unusual tropane alkaloids from *Schizanthus grahamii*. *Angewandte. Chemie*. 29: 385-386.
- HULME, E.C., N.J. BIRDSALL, N.J. BUCKLEY. 1990. Muscarinic receptor subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 573-633.
- ITURRIAGA, P. 2001. Análogos simplificados de alcaloides bisbencilisoquinolínicos como posibles relajantes musculares. Tesis de Doctorado. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Santiago, Chile.
- KWAN, C.Y., W.B. ZHANG, T.K. KWAN, Y. SAKAI. 2003. In vitro relaxation of vascular smooth muscle by atropine: involvement of K<sup>+</sup> channels and endothelium. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* 368: 1-9.

- LI, W., B.T. ALTURA, B.M. ALTURA. 1998. Differential effects of methanol on rat aortic smooth muscle. *Alcohol*. 16: 221-229.
- MANCILLA, C.A. 2002. Evaluación del efecto inhibitorio del tono muscular de alcaloides tipo tropano presentes en plantas del género *Schizanthus* sobre íleon de rata. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- MUÑOZ, O. 1992. Química de la flora de Chile Solanaceae. Departamento técnico de investigación. Universidad de Chile, Santiago, Chile, pp. 189-212.
- MUÑOZ, O., M. PIOVANO, J. GAMBARINO, V. HELLWING, E. BREIRMAIER. 1996. Tropane alkaloids from *Schizanthus litoralis*. *Phytochemistry*. 43: 709-713.
- NEELAM, J., G. LAMBRECHT, E. MUTSCHLER, R. TACKE, K.U. MALIK. 1991. Pharmacological characterization of the vascular muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258: 842-850.
- ORALLO, F., A.F. ALZUETA. 2001. Preliminary study of the vasorelaxant effects of nantenine, an alkaloids isolated from *Platycapnos spicata*, in rat aorta. *Planta. Med.* 67: 800-806.
- PAREDES, M.C., P.V. TORRES, J.C. DIAZ, D. MASCHER, M.A. JUAREZ. 1997. Effects of dietary *Spirulina maxima* on endothelium dependent vasomotor responses of rat aortic rings. *Life. Sci.* 61: 211-219.
- ROSNER, B. 2000. Fundamentals of Biotatistics. 5<sup>th</sup> ed., Duxbury. New York.
- SAKMANN, B. 1992. Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. *Science*. 256: 503-512.
- SAN MARTIN, A., C. LABBE, O. MUÑOZ, M. CASTILLO, M. REINA, G. DE LA FUENTE, A.G. GONZALEZ. 1987. New tropane alkaloids from *Schizanthus grahamii*. *Phytochemistry*. 26: 819-822.
- SAN MARTIN, A., J. ROVIROSA, V. GAMBARO, M. CASTILLO. 1980. Tropane alkaloids from *Schizanthus hookeri*. *Phytochemistry*. 19: 2007-2009.
- SATAKE, N., S. KIYOTO, S. SHIBATA, V. GANDHI, D.J. JONES, M. MORIKAWA. 1992. Possible mechanisms of inhibition with atropine against noradrenaline-induced contraction in the rabbit aorta. *Br. J. Pharmacol.* 107: 553-558.
- SCHMELLER, T., F. SPORER, M. SAUERWEIN, M. WINK. 1995. Binding of tropane alkaloids to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmazie*. 50: 493-495.
- SPIEGEL, M. 1991. Estadística. 2<sup>a</sup> ed., McGraw-Hill Interamericana. Madrid.

TRESGUERRES, J.F., E. AGUILAR, M.V. CACHOFEIRO, D. CARDINALI, P. GIL, V. LAHERA, J.A. MARTÍNEZ, F. MORA, R. RODRÍGUEZ, M. ROMANO, J. TAMARGO, P. ZARCO. 2000. Fisiología humana. 2ª ed., McGraw-Hill Interamericana. Madrid. España.

ZAR, H. 1999. Bioestatistical analysis. 4<sup>th</sup> ed., Plentice-Hall International Inc. New Jersey.

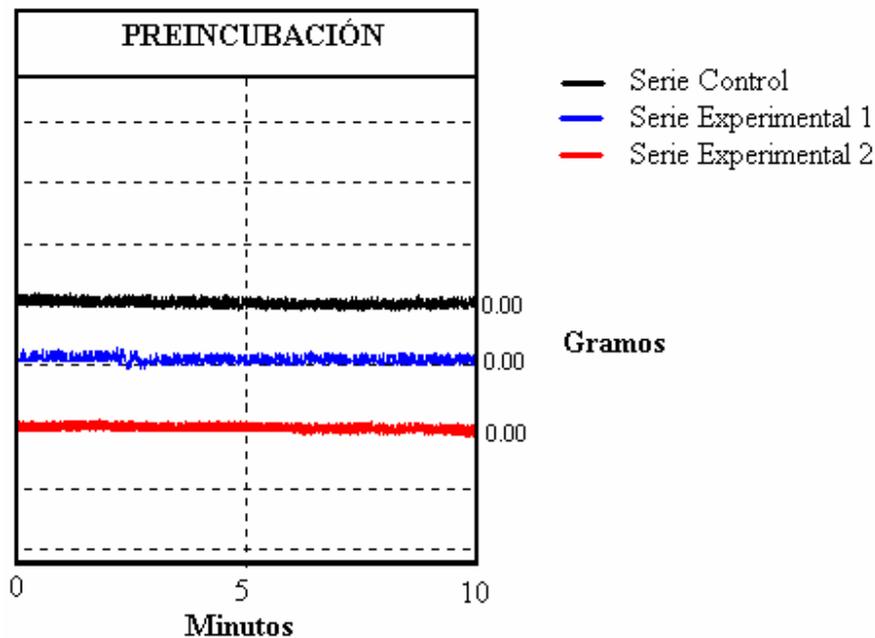
## 8. ANEXOS.

### ANEXO N° 1:

**Tabla N° 1:** Promedio de las variaciones del tono (VT) de la musculatura lisa de aorta y su error estándar (EE) para las preincubaciones realizadas en las series en estudio en ausencia de sustancias vasoactivas.

SERIE	VT (gramos)	EE
Control (etanol)	-0,015	0,01
Experimental 1 ( <i>S. grahamii</i> 0,03 mg/ml)	-0,003	0,01
Experimental 2 ( <i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	0,007	0,01

### ANEXO N° 2:



**Figura N° 1:** Ejemplo del registro gráfico de la actividad contráctil de aorta de rata, expresada en gramos, para la serie control preincubada con etanol y las series experimentales 1 y 2 preincubadas con 0,03 y 0,1 mg/ml respectivamente, de alcaloides tipo tropano presentes en *Schizanthus grahamii*, en ausencia de sustancias vasoactivas.

**ANEXO N° 3:**

**Tabla N° 2:** Porcentaje de la contracción máxima promedio (%CM) y su error estándar (EE) para las series en estudio, con una concentración de noradrenalina de  $3 \times 10^{-7}$  M.

SERIE	%CM	EE
Control (etanol)	100,00	0,00
Experimental 1 ( <i>S. grahamii</i> 0,03 mg/ml)	97,64	3,77
Experimental 2 ( <i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	80,17	4,45

**ANEXO N° 4:**

**Tabla N° 3:** Porcentaje de la relajación máxima promedio (%RM) y su error estándar (EE) para las series en estudio, con una concentración de carbacol de  $1 \times 10^{-4}$  M.

SERIE	%RM	EE
Control (etanol)	83,23	3,86
Experimental 1 ( <i>S. grahamii</i> 0,03 mg/ml)	77,46	2,51
Experimental 2 ( <i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	51,21	8,77

**ANEXO N° 5:**

**Tabla N° 4:** Porcentaje de la relajación máxima promedio (%RM) y su error estándar (EE) para las series en estudio, con una concentración de carbacol de  $3 \times 10^{-5}$  M.

SERIE	%RM	EE
Control (etanol)	77,78	3,50
Experimental 1 ( <i>S. grahamii</i> 0,03 mg/ml)	71,32	4,23
Experimental 2 ( <i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	40,69	3,81

**ANEXO N° 6:**

**Tabla N° 5:** Porcentaje de la relajación máxima promedio (%RM) y su error estándar (EE) para las series en estudio, con una concentración de carbacol de  $1 \times 10^{-5}$  M.

SERIE	%RM	EE
Control (etanol)	75,54	5,01
Experimental 1 ( <i>S. grahamii</i> 0,03 mg/ml)	69,12	4,05
Experimental 2 ( <i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	34,01	6,14

**ANEXO N° 7:**

**Tabla N° 6:** Porcentaje de la relajación máxima promedio (%RM) y su error estándar (EE) para las series en estudio, con una concentración de carbacol de  $3 \times 10^{-6}$  M.

SERIE	%RM	EE
Control (etanol)	59,58	5,46
Experimental 1 ( <i>S. grahamii</i> 0,03 mg/ml)	38,67	4,57
Experimental 2 ( <i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	11,54	1,52

**ANEXO N° 8:**

**Tabla N° 7:** Porcentaje de la relajación máxima promedio (%RM) y su error estándar (EE) para las series en estudio, con una concentración de carbacol de  $1 \times 10^{-6}$  M.

SERIE	%RM	EE
Control (etanol)	38,23	3,14
Experimental 1 ( <i>S. grahamii</i> 0,03 mg/ml)	22,97	1,77
Experimental 2 ( <i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	0,43	0,32

**ANEXO N° 9:**

**Tabla N° 8:** Porcentaje de la relajación máxima promedio (%RM) y su error estándar (EE) para las series en estudio, con una concentración de carbacol de  $3 \times 10^{-7}$  M.

<b>SERIE</b>	<b>%RM</b>	<b>EE</b>
Control (etanol)	10,26	2,82
Experimental 1 ( <i>S. grahamii</i> 0,03 mg/ml)	0,07	0,07
Experimental 2 ( <i>S. grahamii</i> 0,1 mg/ml)	0,0	0,00

## 9. AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer en forma muy sincera a todas aquellas personas que contribuyeron a la realización de este trabajo, en especial:

- Dr. Frédérick Ahumada, profesor patrocinante por su excelente disposición, orientación y apoyo.

- Dra. Viviana Bustos, profesor copatrocinante, por su orientación, apoyo constante y fundamental en el desarrollo de esta tesis.

- Dr. Orlando Muñoz, profesor colaborador, por proporcionar los alcaloides utilizados en este trabajo, junto a importante información relacionada.

- Dr. Medardo Fernández, por la ayuda fundamental prestada para el desarrollo de este trabajo.

- Dr. Luis Améstica, por su excelente disposición y gran ayuda en la comprensión de la parte estadística y revisión de este trabajo.

- Dr. Rafael Burgos, por su excelente disposición para atender mis preguntas y la revisión crítica de este trabajo.

- Dr. Marcos Moreira, por su valiosa ayuda y consejos entregados en la revisión de este trabajo.

- Dr. Juan Hancke, por su excelente disposición y consejos entregados para este trabajo.

- Sra. Nuri Sánchez, por su ayuda en la preparación de las soluciones.

- Dr. Jorge Santamarina y Sr. Carlos Püschel, por su ayuda en el montaje de los baños de órgano aislado.

- Srta. Juanita Vargas, por su ayuda y colaboración.

- Sra. Yolanda Liberona, por su excelente disposición y grata compañía.

- Sr. Darío Salazar, por su ayuda en el manejo de las ratas.

- Compañeros tesisistas del Instituto de Farmacología, por su apoyo y grata compañía.