

EVALUACIÓN DE LOS FLAVONOIDES DE MATRICARIA CHAMOMILLA "MANZANILLA" SOBRE ÍLEON AISLADO DE CAVIA PORCELLUS.

EVALUATION OF THE FLAVONOIDS FROM MATRICARIA CHAMOMILLA "MANZANILLA" OVER SMOOTH MUSCLE OF ISOLATED ILEUM OF CAVIA PORCELLUS.

Kevin Cosavalente Burgos¹, Vilma Guardia Casas¹, Iván Miguel Quispe Díaz², Segundo Ruiz Reyes², Edmundo Venegas Casanova², Armando Cuéllar Cuéllar³.

RESUMEN

La evaluación del efecto de los flavonoides totales de las flores tubulares de *Matricaria chamomilla* sobre la frecuencia y amplitud de las contracciones de la musculatura lisa de íleon aislado de *Cavia porcellus* inducida por los espasmógenos acetilcolina e histamina se realizó a diferentes dosis (0.05; 0.1; 0.2; 0.4:0.8; 1.6 ug/mL) y se comparó con los controles positivos, N-butil bromuro de hioscina y clorfenamina. Se determinó que la concentración de flavonoides totales expresados como quercetina fue de 0.27g/ 100g de droga seca y que estos a su vez poseen efecto antiespasmódico en íleon aislado de *Cavia porcellus*, ya que disminuyen la amplitud y frecuencia de las contracciones inducidas por acetilcolina e histamina, determinando así que poseen similar efecto antiespasmódico que el N-butil bromuro de hioscina y la clorfenamina.

PALABRAS CLAVE: *Matricaria chamomilla* "manzanilla", flavonoides totales, efecto antiespasmódico.

ABSTRACT

The evaluation of the effect of total flavonoids, from tubular flowers of **Matricaria chamomilla**, on the frequency and amplitude of contractions of the smooth muscle of isolated ileum of **Cavia porcellus** induced by spasmogens acetyl choline and histamine, was performed at different doses (0.05; 0.1 ; 0.2; 0.4: 0.8; 1.6 ug / mL) and was compared with positive controls: Hyoscine N-butyl bromide and chlorpheniramine. The concentration of total flavonoids expressed in quercetin was 0.27g / 100g of dry drug and have antispasmodic effect on isolated ileum of *Cavia porcellus*, decreasing the amplitude and frequency of contractions induced by acetylcholine and histamine, determining that possess a similar spasmolytic effect than hyoscine N-butyl bromide, and chlorpheniramine.

Keywords: *Matricaria chamomilla*, total flavonoids, spasmolytic effect.

* Químico Farmacéutico.

** Profesor de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

***Profesor Titular Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana-Cuba.

Contacto: steve_2004_20@hotmail.com

INTRODUCCION

Matricaria chamomilla es una hierba anual o perenne de hasta 60 cm de alto, aromática, con flores dispuestas en cabezuelas solitarias o agrupadas en el extremo de las ramas que pertenece a la familia Astereaceae (Compuestas).

En sus flores contiene flavonoides que se usan en la conservación de grasas o jugos de frutas debido a las propiedades antioxidantes de algunas polihidroxi flavonas, para trastornos del sistema respiratorio, como quelante de metales y otras muchas propiedades beneficiosas para la salud humana^{1,2,3,4}

En el Perú crece en las tres regiones naturales (costa, sierra y selva), preferentemente entre 500-3000 m.s.n.m; aunque se han reportado cultivos hasta cerca de los 4000 m.s.n.m y en la costa a los 40-50-60 m.s.n.m. Florece a partir de abril y continua hasta la primavera⁵.

En medicina tradicional las flores son usadas en infusión como antiespasmódica y sedante; además posee propiedades calmantes, tónicas, digestivas, febrífugas, anti neurálgicas, carminativas. Esta comúnmente indicada para dolores abdominales, cólicos intestinales, hiper-meteorismo, afecciones nerviosas, cistitis, reumatismo, inflamaciones bucales, furúnculos, abscesos, eczemas, conjuntivitis, hemorroides y enfermedades infecciosas^{5,6}.

Hay dos derivados principales de la flor de manzanilla: El aceite esencial y el extracto hidroalcohólico, que tienen usos medicinales, alimenticios y cosméticos. El extracto hidroalcohólico se usa como antiinflamatorio, antipirético, antiespasmódico, ansiolítico, vulnerario, desodorante y antibacteriano⁷.

En Cuba, Morón F8 en su trabajo: Actividad espasmolítica del extracto fluido de Matricaria recutita (Manzanilla) se encuentra en el órgano aislado, concluyendo que el extracto fluido al 30% de Matricaria recutita presentó efecto antiespasmódico y acción similar a la papaverina en los modelos estudiados.

En el Perú también se usa como espasmo lítica por lo que se decidió evaluar en la presente investigación dicho efecto y como responsables del mismo los flavonoides totales obtenidos de las flores de la planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal.

La especie de estudio Matricaria Chamomilla "manzanilla" fue recolectada a finales del año 2014 de la Provincia de Otuzco, Departamento de La Libertad, en cantidad suficiente para la investigación y depositada una muestra en el Herbario Truxillensis de la Universidad Nacional de Trujillo.

Una muestra de Matricaria chamomilla se llevó al Herbario Truxillensis de la Universidad Nacional de Trujillo para su identificación Taxonómica.

Procesamiento del material vegetal.

Las inflorescencias se secaron en estufa a 40°C por un periodo de 48 horas. Posteriormente se prepara un extracto fluido con alcohol de 70°GL el cual se destina para preparar una fracción rica en los flavonoides de la planta.

Obtención y purificación de Flavonoides

100 mL del extracto fluido se colocó en un balón de 250 ml y se reflujo durante dos horas con 100 mL de ácido sulfúrico al 10%. Se concentró el extracto hidrolizado a un tercio del volumen inicial y se llevó a refrigeración (2-8°C). Se filtra al vacío, los residuos sólidos de los flavonoides totales se lavan con suficiente agua destilada y se secan en estufa a 40°C durante 2 horas. Los cristales obtenidos se recrystalizaron en agua.

Evaluación de la Actividad Espasmolítica⁹, 10.

Se preparó una solución de flavonoides totales de las flores de *Matricaria chamomilla* "manzanilla" de concentración de 300ug/mL en etanol de 96°GL.

Aislamiento del íleon de *Cavia porcellus*.

Los animales se privaron de alimentos 24 horas antes del experimento y se siguieron los lineamientos éticos para el manejo y sacrificio de animales de experimentación según la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA).

El sacrificio de los mismos se realizó mediante dislocamiento cervical (AVMA). Posteriormente se abrió la cavidad abdominal mediante incisión longitudinal para extraer un segmento de íleon terminal de 10 cm de longitud, que se colocó en una placa Petri

donde se lavó con solución Tyrode a pH 7.4 temperada a 37°C, eliminándose el contenido intestinal remanente. Se cortaron tres segmentos de 3 cm y cada extremo del segmento se fijó al equipo de órgano aislado con hilo de seda N°6/0, sin ocluir la luz intestinal.

Determinación de la amplitud y frecuencia de contracción frente a Acetilcolina¹¹.

A. Grupo Control

Se dejó estabilizar las muestras de íleon, por un tiempo de 20 minutos y luego se añadió a cada cámara de órgano aislado 0.1mL de acetilcolina 6x10⁻³M y en la mayor amplitud de la contracción se adicionó solución de etanol al 5% v/v a cada órgano aislado, se registró el tono de la musculatura lisa intestinal por 3 minutos, luego se realizó el lavado de las cámaras (2 veces) y se estabilizó la muestra por 10 minutos.

B. Grupo Experimental

Se añadió a cada cámara de órgano aislado 0.1mL de acetilcolina 6x10⁻³M, y en la mayor amplitud de la contracción se adicionó 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28, 2.56 mL de la solución madre de flavonoides totales de las flores de *Matricaria Chamomilla*, obteniéndose las concentraciones en el baño de órgano aislado (25 mL) de 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 ug/mL respectivamente para cada grupo experimental, se registró la actividad espontánea de las contracciones de la musculatura lisa intestinal por 3 minutos, luego se realizó el lavado de las cámaras (2 veces) y se estabilizó la muestra por 10 minutos.

C. Control Positivo

Se añadió a cada cámara de órgano aislado

Determinación de la amplitud y frecuencia de contracción frente a Histamina 11.

A. Grupo Control

Se dejó estabilizar las muestras de íleon, por un tiempo de 20 minutos y luego se añadió a cada cámara de órgano aislado 0.1mL de acetilcolina $6 \times 10^{-3}M$ y en la mayor amplitud de la contracción se adicionó solución de etanol al 5% v/v a cada órgano aislado, se registró el tono de la musculatura lisa intestinal por 3 minutos, luego se realizó el lavado de las cámaras (2 veces) y se estabilizó la muestra por 10 minutos.

B. Grupo Experimental

Se añadió a cada cámara de órgano aislado 0.1mL de acetilcolina $6 \times 10^{-3}M$, y en la mayor amplitud de la contracción se adicionó 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28, 2.56 mL de la solución madre de flavonoides totales de las flores de *Matricaria Chamomilla*, obteniéndose las concentraciones en el baño de órgano aislado (25 mL) de 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 $\mu g/mL$ respectivamente para cada grupo

experimental, se registró la actividad espontánea de las contracciones.

C. Control Positivo

Se añadió a cada cámara de órgano aislado 0.1mL de histamina $8.9 \times 10^{-3}M$, en la mayor amplitud se adicionó 0.1 mL clorfenamina $2.55 \times 10^{-5}M$; obteniéndose la concentración en el baño de órgano aislado (25 mL) de 40 mg/mL, se registró el tono de la musculatura lisa intestinal por 3 minutos, luego se realizó el lavado de las cámaras (2 veces) y se estabilizó la muestra por 10 minutos.

Análisis estadístico.

Los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA), con una probabilidad del 95%, como el resultado presentó $p < 0.05$ se aplicó la prueba Post Hoc; Test de Tukey 12.

RESULTADOS

Tabla 1: Análisis de varianza del efecto de las diferentes concentraciones de flavonoides totales de las flores tubulares de *Matricaria chamomilla* sobre la amplitud de las contracciones inducidas por acetilcolina en íleon aislado de *Cavia porcellus*.

gl	Media cuadrática	F	Sig.
7	.009	11,129	.000
24	.001		
31			

Tabla 2: Test de Tukey del efecto de las diferentes concentraciones de flavonoides totales de las flores tubulares de *Matricaria chamomilla* sobre la amplitud de las contracciones inducidas por acetilcolina en íleon aislado de *Cavia porcellus*.

TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 0.05 ug/mL	4	.0710	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 0.4 ug/mL	4	.0770	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 0.1 ug/mL	4	.0825	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 1.6 ug/mL	4	.1008	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 0.2 ug/mL	4	.1025	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 0.8 ug/mL	4	.1045	
N-butil bromuro hiosina 1/00	4	.1142	
Control	4		.2235
Sig.		.439	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4.000.

Tabla 3: Análisis de varianza del efecto de las diferentes concentraciones de flavonoides totales de las flores tubulares de *Matricaria chamomilla* sobre la frecuencia de las contracciones inducidas por acetilcolina en íleon aislado de *Cavia porcellus*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4688.219	7	669.746	95.536	.000
Dentro de grupos	168.250	24	7.010		
Total	4856.469	31			

Tabla 4: Test de Tukey del efecto de las diferentes concentraciones de flavonoides totales de las flores tubulares de *Matricaria chamomilla* sobre la frecuencia de las contracciones inducidas por acetilcolina en íleon aislado de *Cavia porcellus*.

TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 1.6 ug/mL	4	8.5000	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 0.8 ug/mL	4	9.2500	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 0.05 ug/mL	4	10.0000	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 0.4 ug/mL	4	10.0000	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 0.1 ug/mL	4	11.5000	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 0.2 ug/mL	4	11.7500	
N-butil bromuro hiosina 1/00	4	14.2500	
Control	4		47.0000
Sig.		.083	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4.000.

Gráfico 1: Efecto de las diferentes concentraciones de flavonoides totales de las flores de *Matricaria chamomilla* sobre la amplitud de las contracciones inducidas por acetilcolina en íleon aislado de *Cavia porcellus*.

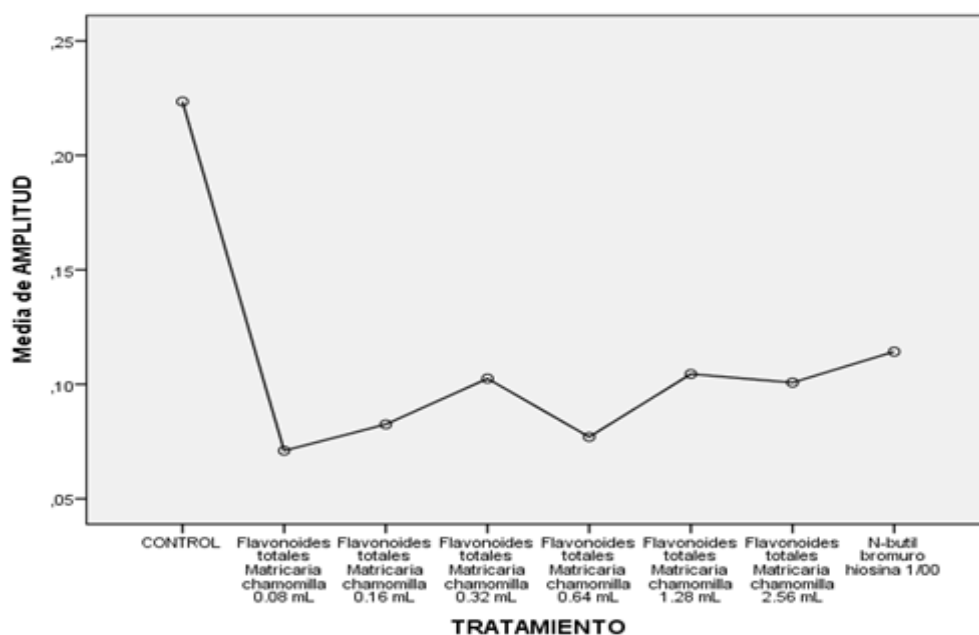


Gráfico 2: Efecto de las diferentes concentraciones de flavonoides totales de las flores de Matricaria chamomilla sobre la frecuencia de las contracciones inducidas por acetilcolina en íleon aislado de Cavia porcellus.

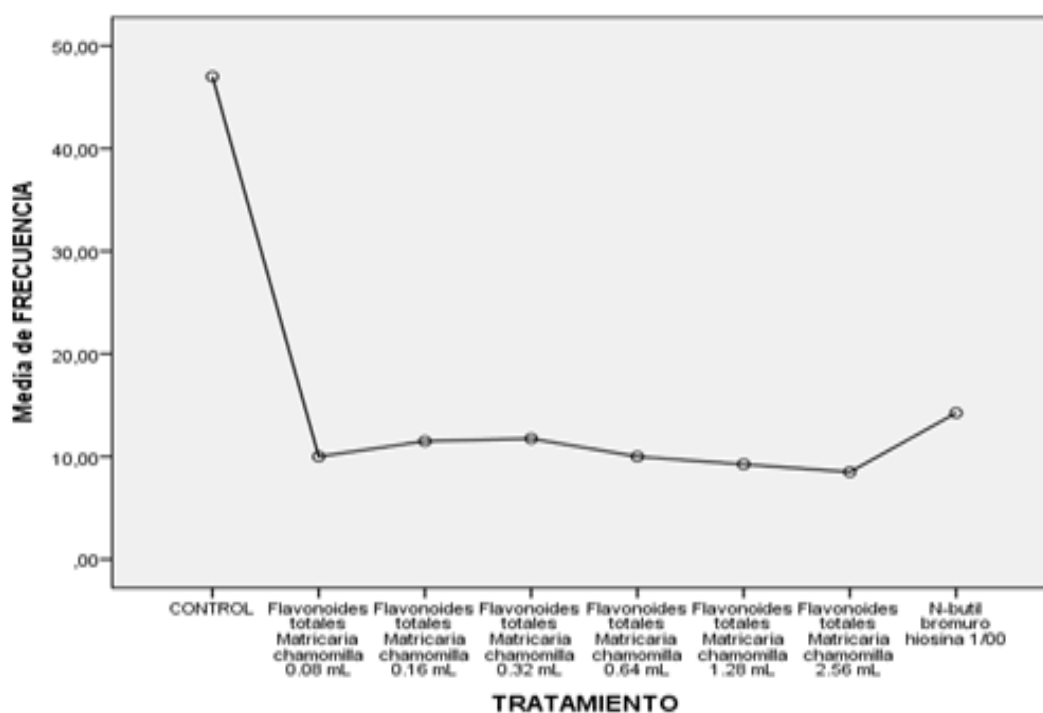


Tabla 5: Análisis de varianza del efecto de las diferentes concentraciones de flavonoides totales de las flores tubulares de Matricaria chamomilla sobre la amplitud de las contracciones inducidas por histamina en íleon aislado de Cavia porcellus.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.031	7	.004	6.444	.000
Dentro de grupos	.017	24	.001		
Total	.048	31			

Tabla 6: Test de Tukey del efecto de las diferentes concentraciones de flavonoides totales de las flores tubulares de *Matricaria chamomilla* sobre la amplitud de las contracciones inducidas por histamina en íleon aislado de *Cavia porcellus*.

TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Clorfenamina 1/00 0.1 mL	4	.0675	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 0.4 ug/mL	4	.0845	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 0.1 ug/mL	4	.0865	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 1.6 ug/mL	4	.0943	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 0.8 ug/mL	4	.0953	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 0.2 ug/mL	4	.0970	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 0.05 ug/mL	4	.1023	
Control Positivo	4		.1795
Sig.		.588	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4.000.

Tabla 7: Análisis de varianza del efecto de las diferentes concentraciones de flavonoides totales de las flores tubulares de *Matricaria chamomilla* sobre la frecuencia de las contracciones inducidas por histamina en íleon aislado de *Cavia porcellus*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4449.469	7	635.638	134.705	.000
Dentro de grupos	113.250	24	4.719		
Total	4562.719	31			

Tabla 8: Test de Tukey del efecto de las diferentes concentraciones de flavonoides totales de las flores tubulares de *Matricaria chamomilla* sobre la frecuencia de las contracciones inducidas por histamina en íleon aislado de *Cavia porcellus*.

TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 0.8 ug/mL	4	10.0000	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 0.1 ug/mL	4	10.7500	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 0.2 ug/mL	4	10.7500	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 1.6 ug/mL	4	11.0000	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 0.05 ug/mL	4	12.2500	
Clorfenamina 1/00 0.1 mL	4	12.5000	
Flavonoides totales <i>Matricaria chamomilla</i> 0.4 ug/mL	4	13.0000	
Control Positivo	4		47.0000
Sig.		.531	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4.000.

Gráfico 3: Efecto de las diferentes concentraciones de flavonoides totales de las flores de *Matricaria chamomilla* sobre la amplitud de las contracciones inducidas por histamina en íleon aislado de *Cavia porcellus*.

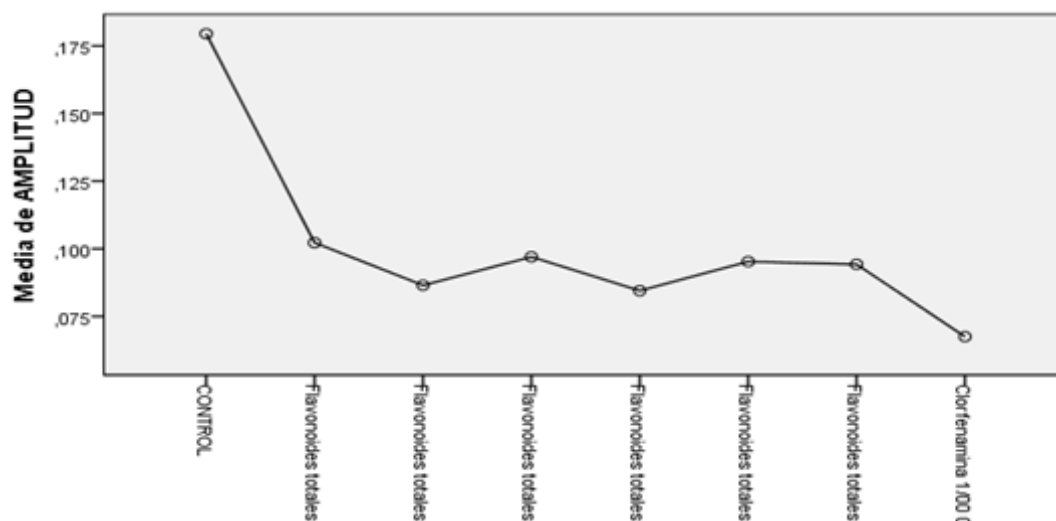
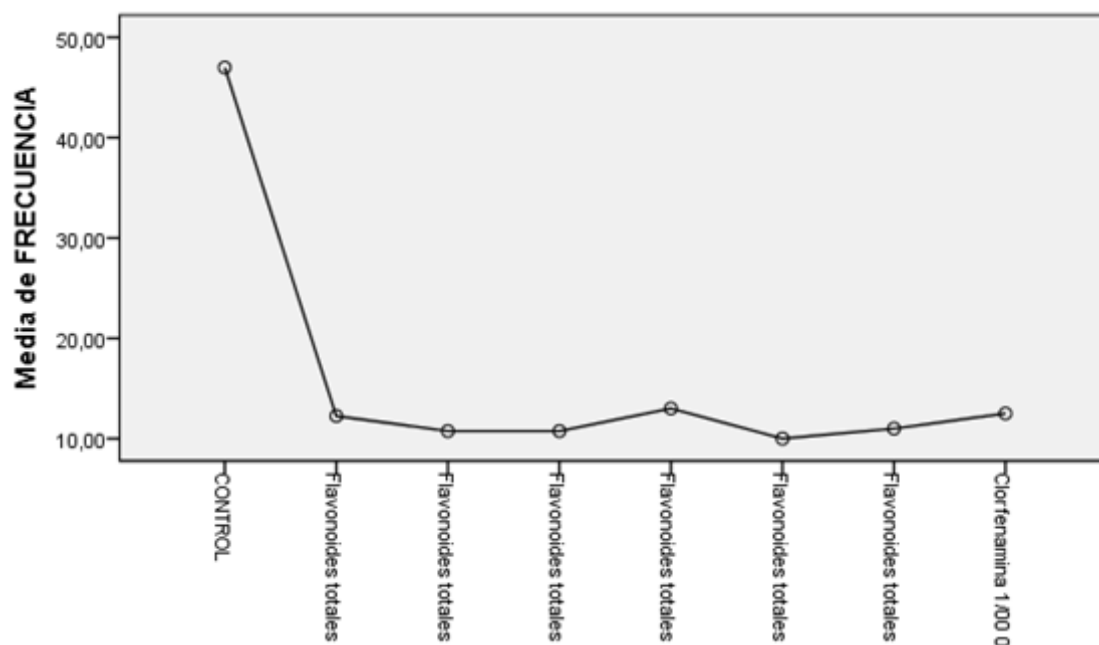


Gráfico 4: Efecto de las diferentes concentraciones de flavonoides totales de las flores tubulares de *Matricaria chamomilla* sobre la frecuencia de las contracciones inducidas por histamina en íleon aislado de *Cavia porcellus*.



DISCUSIÓN

En el presente trabajo se cuantificó los flavonoides totales en el extracto de las flores de *Matricaria chamomilla* obteniendo una concentración de 0.27g por cada 100g de droga seca para poder dosificar correctamente en las evaluaciones realizadas.

En relación al análisis de varianza del efecto de las diferentes concentraciones de flavonoides totales de las flores de *Matricaria chamomilla* sobre la amplitud y frecuencia de las contracciones inducidas por acetilcolina en íleon aislado de *Cavia porcellus* respectivamente, (Tablas 1 y 3), se evidenció que existe diferencia estadísticamente significativa con un valor para ambos parámetros de ($p=0.000$), lo que llevó a desarrollar el análisis Tukey (Tablas 2 y 4) las cuales mostraron para ambas variables dos grupos claramente definidos, a la vez se sub-

agruparon los 6 grupos de tratamiento (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 y 1.6 $\mu\text{g/mL}$ de flavonoides totales de las flores de *Matricaria chamomilla*) con el control positivo (N-butil bromuro de hioscina) y excluyendo al grupo control, poniendo de manifiesto la similitud del efecto antiespasmódico de los flavonoides totales y el N-butil bromuro de hioscina.

Existen diferentes tipos de estados patológicos y toxicológicos que producen hipertonicidad de la musculatura lisa intestinal por lo cual en la actualidad se han desarrollado diferentes tipos de drogas con capacidad de regular este tipo de alteraciones fisiológicas como la atropina y el N-butil bromuro de hioscina.⁸

En el análisis de varianza del efecto de las diferentes concentraciones de flavonoides totales de las flores de *Matricaria chamomilla* sobre la amplitud y frecuencia de las contracciones inducidas por histamina en

en íleon aislado de *Cavia porcellus* respectivamente, (Tablas 5 y 7) se evidenció que existe diferencia estadísticamente significativa con un valor ($p=0.000$), lo que llevó al desarrollo del análisis Tukey (Tablas 6 y 8) en las cuales se evidencia para ambas variables dos grupos claramente definidos, las que sub-agrupan los 6 grupos de tratamiento (0.05; 0.1; 0.2, 0.4, 0.8 y 1.6 $\mu\text{g/mL}$ de flavonoides totales de las flores tubulares de *Matricaria chamomilla*) con el control positivo (clorfenamina) y excluyen al grupo Control, poniendo de manifiesto la similitud del efecto antiespasmódico de los flavonoides totales y la clorfenamina.

El efecto antiespasmódico de los flavonoides totales de las flores tubulares de *Matricaria chamomilla* se determinó en función de dos variables; la amplitud, que representa la altura máxima de una contracción, y la frecuencia, que corresponde al número de contracciones por unidad de tiempo, encontrándose así que los flavonoides totales de las flores de *Matricaria chamomilla* reducen tanto la amplitud como la frecuencia de las contracciones de la musculatura lisa intestinal, inducidas por acetilcolina e histamina.

Estos resultados validan el efecto antiespasmódico que poseen las flores de *Matricaria chamomilla*, sustentando su farmacodinamia en el poder de los flavonoides totales, entre ellos su componente mayoritario la apigenina para inhibir la actividad de la cAMP-PDE lo cual origina la disminución de la

degradación de AMPc que como consecuencia produce un aumento de AMPc intracelular, y la activación de sus proteincinasas específicas como la proteincinasa A, que producen la fosforilación de ciertas proteínas para causar la apertura de

los canales de potasio y el cierre de los canales de calcio lo cual redundará finalmente en la relajación de la musculatura lisa intestinal.^{13, 14}

Se puede concluir por tanto que: Los flavonoides totales a diferentes concentraciones de las flores de *Matricaria chamomilla* "manzanilla" disminuyen la amplitud y frecuencia de las contracciones inducidas tanto por la acetilcolina como por la histamina en íleon aislado de *Cavia porcellus* y muestran experimentalmente similar efecto antiespasmódico que el N-butil bromuro de hioscina y la clorfenamina respecto a la amplitud y frecuencia de contracción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lock O. Investigación Fitoquímica. 2a ed. Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. 1994. pp: 111-127
2. Cuellar A. Farmacognosia y Productos Naturales. 2a ed. La Habana-Cuba: Feliz Valera. 2012. pp: 162-166; 170-171; 261-280.
3. Martínez A. Flavonoides. Colombia. 2005. [Fecha de acceso 29 enero 2012]. Disponible en : <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>
4. Kuklinski C. Farmacognosia. Ed. Omega, S.A. Barcelona, España. 2000. págs. 120-130.
5. Mostacero J. Plantas medicinales del Perú. 1ª ed. Ed. Instituto pacífico S.A.C. Perú. 2011. págs. 383 – 384.
6. Mostacero J. Fanerógamas del Perú. 1ª ed. Ed. Concytec. Perú. 2009. vol. I pág. 886
7. Meneses J. Optimización Del Proceso De Extracción De Flavonoides De Flor De Manzanilla (*Matricaria recutita* L.). Agrocienza. 2008. 42:425-433.

8. Morón F, Furones J, Pinedo Z. Actividad espasmolítica del extracto fluido de Matricaria recutita (manzanilla) en órganos aislados. Rev Cubana Plant Med [revista en la Internet]. 1996 Abr [citado 2014 Jun 21]; 1(1):Disponible

en:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-00100005&lng=es.

9. Gracia A, Martínez M, Morón F. Efecto espasmolítico del aceite de Piper auritum en el músculo liso intestinal. Rev Cubana Plant Med [revista en la Internet]. 2001. Abril [citado 2014 Jun 21]; 6(1): 12-15. Disponible

en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-01000100003&lng=es.

10. Plasencia E, Portilla D, Quispe I. EFECTO DEL INFUSO DE HOJAS SECAS DE Psoralea glandulosa SOBRE ÍLEON AISLADO DE Cavia porcellus TIPO ONDULADO ERIZADO. Revista Farmaciencia. 2013. 1(2).

11. Benjamín L. Actividad antiespasmódica de extractos de plantas medicinales en preparaciones de íleon de cobayo (tesis doctoral). México. UNAM. 2005.

12. Devora J. Probabilidad estadística para ingeniería y ciencias. 7º ed. Cengage Learning Editores. Santa Fe. 2008. p 288-291

13. Maschi O, Dal E y col. Inhibition of Human cAMP-Phosphodiesterase as a Mechanism of the Spasmolytic Effect of Matricaria recutita L. J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 5015–5020

14. Vereau M. Fisiología del músculo liso. [en línea]. Perú. 2014 [citado el 21/01/14] Disponible en: <http://es.slideshare.net/paolobarrientossalazar/musculo-liso-41019586>.

CORRESPONDENCIA

Autor: Kevin Cosavalente burgos

Correo: steve_2004_20@hotmail.com