



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**EFFECTO ANTIESPASMÓDICO IN VITRO DE UN EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Clinopodium weberbaueri***

EN DUODENO DE *Rattus rattus*

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL GRADO
ACADÉMICO DE BACHILLER EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA

AUTOR:

AGUSTIN ORLANDO LLAMA MILLA

ASESOR:

Mgr. LIZ ELVA ZEVALLOS ESCOBAR

CHIMBOTE – PERÚ

2018

TITULO

**EFFECTO ANTIESPASMÓDICO IN VITRO DE UN EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Clinopodium weberbaueri*
EN DUODENO DE *Rattus rattus***

JURADO EVALUADOR DE LA INVESTIGACION

.....

Dr. Jorge Luis Díaz Ortega

PRESIDENTE

.....

Mgr. Teodoro Walter Ramírez Romero

MIEMBRO

.....

Mgr. Edison Vásquez Corales

MIEMBRO

.....

Mgr. Liz Elva Zevallos Escobar

ASESOR

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera profesional, por fortalecerme en los momentos de debilidad y por brindarme una existencia llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad, tranquilidad y buena salud.

A mi asesora Mgtr. Q.F. Liz Zevallos Escobar, por su asesoría, orientación y paciencia permanente en todo el trayecto del desarrollo del presente trabajo de investigación.

Le doy gracias a mis padres Demetrio y Marcelina por su constante apoyo, los valores inculcados y haberme dado la oportunidad de formarme en una excelente educación durante el transcurso de mi vida.

A mis hermanas y hermano por formar parte de mi vida y por mantener y representar la unidad familiar. A Sara, Charo y Dante por ser un ejemplo de lucha constante tanto en lo laboral, profesional y sobre todo en la humanidad y por contribuir de una u otra manera alcanzar mi sueño anhelado de poder concluir con éxito mi carrera profesional.

A ti Sra. Maria Yacila por tu espíritu de humanidad y bondad que sin condición alguna formo parte de esta investigación con sus buenos consejos y aportes que no son necesario mencionar entre estas líneas porque usted fue de las personas que daba sin necesidad de presunción alguna y que por circunstancias de la vida hoy no se encuentra entre nosotros y que desde el cielo sigue derramando su bendición a toda su familia y amistades, sobre todo sobre su hija Clara Yi que sigue su ejemplo y continua su obra

DEDICATORIA

El presente informe de investigación lo dedico a mis padres por ser los ejes principales y los pilares más importantes en mi vida, quienes me demostraron su afecto, apoyo y cariño brindándome consejos y comprensión, quienes me demostraron la perseverancia en la vida para alcanzar un objetivo y demostrarme que la unión hace posible conseguir y superar grandes retos que parecen inalcanzable.

A mis hermanas y hermano por brindarme sus buenos deseos y motivarme día a día y compartir tanta alegría en los momentos más difíciles que me ayudaron a superar dificultades y obstáculos que se presentaban en el trayecto de mi carrera y del cual no estaba obviada esta investigación.

Por ello y muchos aspectos y razones esta dedicatoria es para ustedes porque de alguna u otra manera formaron parte y contribuyeron a mi formación y con ello a la investigación y por ende al informe de la misma.

EPÍGRAFE

“El arte de la medicina consiste en entretener al paciente mientras la naturaleza cura la enfermedad.”

JEAN AROUET

RESUMEN

Introducción: La *Clinopodium weberbaueri* es una planta oriunda de las regiones interandinas del Perú, popularmente utilizada para calmar dolores gastrointestinales, dolores de cabeza y cólicos menstruales. **Objetivo:** Este estudio tuvo por objetivo “Determinar el efecto antiespasmódico in vitro de un extracto hidroalcohólico de hojas de *Clinopodium weberbaueri* en duodeno de *Rattus rattus*”. **Metodología:** se utilizó 1 espécimen de *Rattus rattus*, quienes estuvieron privados de alimento 24 h. antes del experimento, el sacrificio se realizó con sobredosis de Ketamina 0.46ml/kg de peso del espécimen, se extrajo el duodeno, el mismo que fue lavado y fijado en el equipo de órgano aislado; para la administración de espasmogeno, se dividieron tres secciones de duodeno, la primera sección se le administro 0.2ml, a la segunda sección 0.3ml, a la tercera sección 0.5ml de extracto hidroalcohólico de *Clinopodium weberbaueri* al 20%, tras la inducción de 1 ml de Acetilcolina, luego se tomaron las lecturas de amplitud correspondiente a través del equipo y el programa de cámara de órgano aislado. **Conclusión:** El extracto hidroalcohólico de *Clinopodium weberbaueri* redujo la amplitud de la contracción a una amplitud de 0.2cm, 0.5cm y 1.5cm, respecto al nivel basal siendo de 1.5cm. estas diferencias de amplitud muestran que el extracto hidroalcohólico de *Clinopodium weberbaueri* tiene efecto antiespasmogeno.

Palabras claves: Amplitud, Antiespasmódico, Duodeno, extracto.

ABSTRACT

Introduction: *Clinopodium weberbaueri* is a plant that occurs in the inter-Andean regions of Peru, popularly used to soothe gastrointestinal aches, headaches and menstrual cramps. **Objective:** This study aimed to "Determine the antispasmodic effect in vitro of a hydroalcoholic extract of *Clinopodium weberbaueri* leaves in *Rattus rattus* duodenum". **Methodology:** 1 specimen of *Rattus rattus* who was deprived of food 24 hours before the experiment, the slaughter was made with overdose of Ketamine 0.46ml/kg weight of the specimen, the duodenum was extracted, the same that was washed and fixed in the equipment of ketamine 0.46ml/kg weight of the specimen, the duodenum was extracted, the same that was washed and fixed in the equipment of isolated organ; for the administration of spasmogen, three sections of duodenum were divided, the first section was administered 0.2ml, the second section 0.3ml, the third section 0.5ml of hydroalcoholic extract *Clinopodium weberbaueri* at 20%, after the induction of 1 ml of Acetylcholine, then the corresponding amplitude readings were taken through the equipment and the isolated organ camera program. **Conclusion:** The hydroalcoholic extract of *Clinopodium weberbaueri* reduced the amplitude of the shrinkage to an amplitude of 0.2cm, 0.5cm and 1.5cm, compared to the basal level being 1.5cm. these differences in amplitude show that the hydroalcoholic extract of *Clinopodium weberbaueri* has an antispasmodic effect.

Keywords: Amplitude, Antispasmodic, Duodenum, extract.

ÍNDICE

TITULO.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iv
DEDICATORIA.....	v
EPÍGRAFE.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	3
2.1. Antecedentes.....	3
2.2. Bases teóricas.....	5
2.2.1. <i>Clinopodium weberbaueri</i>	5
2.2.1.1. Descripción botánica.....	5
2.2.1.2. Estudio taxonómico.....	6
2.2.1.3. Biodiversidad de la familia lamiaceae.....	6
2.2.1.4. Distribución geográfica.....	7
2.2.1.5. Antecedentes etnobotánicos.....	7
2.2.2. Espasmos.....	7
2.2.2.1. Actividad antiespasmogena.....	8
2.2.2.2. Mecanismo de la contracción muscular según el fundamento químico molecular.....	8
2.2.2.3. Acetilcolina.....	9
2.2.2.4. Mecanismo de contracción por acción de Acetilcolina.....	9
2.2.2.5. Mecanismo de la relajación muscular.....	10
2.2.3. <i>Rattus rattus</i> Var albinus o ratas de laboratorio.....	11
2.2.3.1. Ubicación del duodeno de <i>Rattus rattus</i>	12
III. HIPÓTESIS.....	13
IV. METODOLOGÍA.....	14

4.1. Diseño del estudio	14
4.1.1. Tipo de estudio	14
4.1.2. Nivel de investigación.....	14
4.1.3. Preparación de la muestra vegetal	15
4.1.3.1. Recolección de la muestra.....	15
4.1.3.2. Selección de la muestra vegetal.....	15
4.1.3.3. Lavado de la muestra vegetal	15
4.1.3.4. Secado de la muestra vegetal	15
4.1.3.5. Pulverización de la muestra vegetal.....	15
4.1.4. Metodología experimental.....	16
4.1.4.1. Preparación del extracto hidroalcohólico de <i>Clinopodium weberbaueri</i>	16
4.1.5. Análisis fitoquímico del extracto hidroalcohólico de <i>Clinopodium weberbaueri</i>	17
4.1.5.1. Reacción de caracterización para la determinación de Flavonoides	17
4.1.6. Preparación de concentración de extracto hidroalcohólico de <i>Clinopodium weberbaueri</i>	17
4.1.6.1. Concentración de extracto Hidroalcohólico de <i>Clinopodium weberbaueri</i> al 20%.....	17
4.1.7. Preparación de la solución de Tyrode.....	18
4.1.8. Preparación de sobredosis de Ketamina según el peso del espécimen	18
4.1.9. Preparación del duodeno de <i>Rattus rattus</i>	18
4.1.10. Determinación de la amplitud frente a espasmogeno.....	19
4.2. Población y muestra	19
4.2.1. Población vegetal.....	19
4.2.2. Población biológica.....	19
4.2.3. Muestra vegetal.....	19
4.2.4. Muestra biológica.....	19
4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores.....	19
4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	20
4.5. Plan de análisis.....	21
4.6. Matriz de consistencia.....	22
4.7. Principios éticos.....	23

V. RESULTADOS	24
5.1. Resultados	24
5.2. Análisis de resultados	27
VI. CONCLUSIÓN.....	30
ASPECTOS COMPLEMENTARIOS.....	30
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	31
ANEXO.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- Desarrollo de los procedimientos para alcanzar los objetivos.....	14
FIGURA 2.- Representación gráfica lineal de los niveles de contracción y relajación del duodeno de <i>Rattus rattus</i>	24
FIGURA 3.- Amplitud de la relajación del duodeno por acción del extracto hidroalcohólico de <i>Clinopodium weberbaueri</i> (E.H.C.w.) en comparación con la amplitud de contracción provocada por acetilcolina	25
FIGURA 4.- Amplitud de relajación del duodeno por acción del E.H.C.w. en comparación con la amplitud de contracción provocada por acetilcolina.....	25
FIGURA 5.- Amplitud de relajación del duodeno en comparación con la amplitud basal.....	26
FIGURA 6.- Amplitud de relajación del duodeno por acción del E.H.Cw. En comparación con la amplitud basal.....	26

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.- Taxonomía – <i>Clinopodium weberbaueri</i>	6
TABLA 2.- Identificación de flavonoides a través de la reacción con FeCl_3	17
TABLA 3.- Esquema De los procedimientos para la determinación de amplitud frente a espasmogeno.....	19
TABLA 4.- Definición de operacionilización de variables e indicadores.....	20
TABLA 5.- Matriz de consistencia.....	22
TABLA 6.- Determinación de amplitud y disminución de la concentración.....	24

I.- INTRODUCCIÓN:

La *Clinopodium weberbaueri* (cangalle) es una planta arbustiva y aromática que pertenece a la familia Lamiaceae, se distribuye ampliamente en los valles interandinos y zonas tropicales del Perú ¹. El uso tradicional e empírico de los componentes en su conjunto (tallos, hojas y partes floridas) le atribuye efectividad ante dolores gastrointestinales. Estudios realizados sobre el género *Clinopodium*, evidencian tener diferentes metabolitos secundarios, entre ellos, un alto contenido de flavonoides^{2,3} que ejercen actividad frente a problemas de contracciones involuntarias en determinadas fibras musculares o conocidas de otra forma como espasmos⁴ que son producidas por esfuerzos prolongados, movimientos bruscos o sometimiento a un intenso frío, como en el caso de espasmos gastrointestinales que se presentan con intensos dolores abdominales.⁵

Según las investigaciones de Plasencia *et al* realizadas en el Perú en el año 2013, refiere que la consulta más frecuente en pediatría está relacionada a dolores del tipo cólico abdominal y que estos a su vez están vinculadas a espasmos gastrointestinales, tal es así, que el porcentaje de consulta general en pediatría fue de 2 a 4%, en consulta de gastroenterología infantil de 7 a 25% y en servicios de urgencia fue 10% ⁶. Los espasmos gástricos empeoran por la noche al bajar la temperatura, producto de ello los dolores y cólicos gastrointestinales son más intensos, es así como Fabrocini describe las complicaciones de los espasmos gástricos en su libro publicado en el año 2016 ⁷. Una de las grandes regiones del Perú es la región sierra, en donde la temperatura baja en tiempo de invierno y en ocasiones a lo más extremo, si se toma en cuenta lo descrito por Fabrocini, las complicaciones de espasmos gástricos fueron entonces un problema

para los habitantes de esta región en tiempos de invierno y lo será también en los posteriores si no se llegaran a tomar la prevención correspondiente.

Para aliviar los dolores de espasmos, el personal de salud, recomiendan ciertos antiespasmódicos, grupo farmacológico que tiene como fármacos principales a la atropina, Hioscina y la Escopolamina cuyo mecanismo farmacológico, es la actividad como antagonista competitivo; también existen medicinas naturales con potenciales propiedades terapéuticas que de forma empírica son utilizadas por los pobladores para aliviar diversos dolores de espasmos ⁶.

Debido a los antecedentes presentados y a otros estudios relacionados con los problemas que ocasionan los espasmos, despertó el interés del presente estudio el cual estaba orientado en demostrar el efecto antiespasmódico del extracto hidroalcohólico de la *Clinopodium weberbaueri* tras la inducción de la acetilcolina en el duodeno de *Rattus rattus*.

Objetivos:

Objetivo general:

- ✓ Determinar el efecto antiespasmódico in vitro de un extracto Hidroalcohólico de hojas de *Clinopodium weberbaueri*; en duodeno de *Rattus rattus*.

Objetivo específico:

- ✓ Determinar la amplitud de contracción tras la inducción de acetilcolina.
- ✓ Determinar la amplitud de relajación a través del efecto antiespasmódico.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA:

2.1. Antecedentes:

En la búsqueda de antecedentes con actividad antiespasmódica, hasta la actualidad no se hallaron evidencias de estudios científicos con la especie *Clinopodium weberbaueri* que compruebe tal actividad; pero existen reportes de estudios vinculados al lugar de procedencia, el nombre común y uso medicinal en su forma tradicional que refieren tener actividad antiespasmódica, así mismo, se hallaron evidencias de estudios sobre la familia de esta especie donde demuestran tener el efecto antiespasmódica.

Los reportes más actuales sobre *Clinopodium weberbaueri* esta lo registrado por Sotelo ¹ *et al* en el año 2014, donde refiere que la especie *Clinopodium weberbaueri* (Mansf.) Grovaerts, tiene como Sinónimo a *Satureja weberbaueri* Mansf., según los registros para el área del norte del Perú, así mismo manifiestan que esta especie pertenece a la familia Lamiaceae; el nombre común para la *Clinopodium weberbaueri* según el registro de los autores, es Orégano cangle para el norte y Runtuhuayra para el sur del Perú.

En Trujillo, Mostacero ⁸ en el año 2005, realizó un estudio sobre Características edafoclimáticas y fitogeográficas de las plantas medicinales del dominio andino noroccidental del Perú, durante 1976 al 2004, donde el objetivo principal fue conocer el hábitat, nicho ecológico y las asociaciones vegetales a las que pertenecen las diferentes especies de plantas medicinales propias o nativas del Perú; la metodología que siguió para alcanzar el objetivo fue a través de una amplia revisión y análisis de información bibliográfica existente sobre las especies de plantas medicinales del Perú; donde en una de sus conclusiones indican que los datos fenológicos y etnomedicinales

de las 163 especies estudiadas detallan las épocas de floración, fructificación y propagación; así como las partes del vegetal utilizadas, formas de preparación y usos etnomedicinales; entre las que se encuentra la *Satureja weberbaueri* (sinónimo de *Clinopodium weberbaueri*) representado con su nombre común Orégano de gentil y con efectos antiespasmódicos según el uso tradicional.

Galán y Sánchez ⁹ en su libro Principios de botánica farmacéutica publicado en el año 2013 en Perú, refieren que la *Satureja weberbaueri* (sinonimia de *Clinopodium weberbaueri*) tienen como nombre común Orégano cangle y Orégano de gentil que se distribuye por el departamento de Cajamarca, la libertad y Ancash, sus componentes de la planta son utilizadas de forma tradicional en infusiones o cocción y se bebe como te para aliviar o disminuir dolores de estómagos.

Teniendo conocimiento que la *Clinopodium weberbaueri* pertenece a la familia lamiaceae, otra especie que pertenece a esta familia es la *Satureja brevicalyx* Epling y la *Melissa officinalis* L. especies de los que se han reportado estudios científicos sobre la actividad antiespasmódica ^{10,11}.

Un estudio realizado por Sare y Varas ¹⁰ en el año 2015 sobre las características fisicoquímicas y efecto del aceite esencial de las hojas de *Satureja Brevicalyx* Epling sobre íleon aislado de *Cavia porcellus*. Cuyo objetivo fue determinar las características fisicoquímicas y el efecto del aceite esencial de hojas de *Satureja brevicalyx* al 0,5%, 1%, 2,5% y 5% sobre íleon aislado de *Cavia porcellus* bajo el método experimental de “órgano aislado”. Donde se utilizaron diferentes concentraciones, las cuales fueron de 0,5%, 1%, 2,5% y 5%; y como agente contracturante utilizaron acetilcolina, donde llegaron a la conclusión que a concentración del 5% del aceite esencial de *S. brevicalyx*

reduce la amplitud y frecuencia de las contracciones del musculo liso del íleon de *Cavia porcellus*, dándole el efecto antiespasmódico.

Ruiz ¹¹ et al realizaron un estudio en el 2004 en Cuba sobre la actividad espasmolítica de una tintura de *Melissa officinalis L.* en modelos experimentales, el objetivo de esta investigación fue validar la propiedad espasmolítica de la *Melissa officinalis L.*, descrita por la medicina popular, para lograr el propósito de este estudio, al primer in vitro, evaluaron la respuesta de la *Melissa officinalis* en íleon aislado de *cobayo*, frente a las contracciones inducidas por diferentes espasmógenos, se realizó un segundo experimento in vivo en la cual evaluaron la actividad del tránsito intestinal en ratones y a un tercero aplicaron un modelo de diarreas en ratas, aplicaron etanol a todos los modelos como menstruo, y papaverina como control positivo, el resultado del experimento fue la acción antiespasmódica efectiva de la *Melissa officinalis L.*, especie que pertenece a la familia de las Lamiaceae.

2.2.-Bases teóricas:

2.2.1. *Clinopodium weberbaueri* (cangalle)

2.2.1.1-Descripción botánica:

La *Clinopodium weberbaueri* es una especie que pertenece a la familia lamiaceae, planta arbustiva rigurosamente erecta con presencia de ramas delgada y puberulenta de hojas oblongo – elípticas y reducidas en los extremos, de 1.5 a 2 cm de largo por 7 a 9 de ancho de haz verde oscuro y envés verde claro, de flor bilabiada, pedicelos de 10 a 12 en las axilas alrededor de 1 mm de largo de corola morada y fruto tetraquenio¹².

2.2.1.2.-Estudio taxonómico:

El material vegetal en estudio fue identificado científicamente el 7 de julio del 2017 por el *Herbarium Truxillense* (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo y fue inscrita bajo el código N° 59171; el nombre de la familia y la especie del material vegetal en estudio proporcionado por el *Herbarium Tuxillense* (HUT) nos permitieron revisar otro fuente de estudio de investigación que proporcionaron la similitud del estudio taxonómico de la especie brindada por *Herbarium Truxillense*, en donde se puede consignar en la siguiente tabla¹².

Tabla N° 01: Taxonomía – <i>Clinopodium weberbaueri</i>	
CLASE:	Equisetopsida C.
SUBCLASE:	Magnoliidae
SUPERORDEN:	Asteraceae
ORDEN:	Lamiales
FAMILIA:	Lamiaceae
TRIBU:	Mentheae
GENERO:	<i>Clinopodium L.</i>
ESPECIE:	<i>Clinopodium weberbaueri</i> (Mansf.) Govaerts
NOMBRE COMÚN:	Cangalle, Orégano cangle, Runtuhuayra.

2.2.1.3.-Biodiversidad de la familia Lamiaceae:

La familia actualmente siendo Lamiaceae ha presentado 21 géneros y 190 especies hasta el año 2006, siendo en su mayoría arbustos y hierbas, considerándose también especies endémicas de las regiones altoandinas

del Perú, entre las que se encuentran la especie *Clinopodium weberbaueri*².

2.2.1.4.-Distribución geográfica:

La *Clinopodium weberbaueri* es una especie ampliamente diverso en los valles y regiones altoandinas del Perú de clima relativamente templado con variación según la estación y entre altitudes de 1500 a 3600 m.s.n.m; reportes de estudios describen la existencia de *Clinopodium weberbaueri* en los departamentos de Ancash, Cajamarca, la Libertad y Apurímac; la especie vegetal se desarrolla en suelos rocosos, piedras areniscas y calizas, terrenos negros que se encuentran en forma de pendientes o laderas^{10,12}.

2.2.1.5.-Antecedentes etnobotánico:

Siendo la *Clinopodium weberbaueri* recolectada en el distrito de Huandoval de la provincia de Pallasca del departamento de Ancash, pobladores del distrito en mención, manifiestan su uso tradicional y empírico frente a dolores gastrointestinales, dolores de cabeza, cólicos menstruales, problemas de resfriados, así mismo manifiestan que en altas concentraciones pueden ser abortivas.

2.2.2.-Espasmos:

El espasmo es una contracción involuntaria de determinadas fibras musculares que puede provocar un aumento de la tensión muscular como también un acortamiento que no pueden eliminarse de forma voluntaria y están acompañado de dolor leve o intenso, puede darse por falta de oxigenación de

los músculos o por la pérdida de líquidos y sales minerales que son de vital importancia para el buen funcionamiento del musculo, o puede darse también como consecuencia de un esfuerzo prolongado, movimientos bruscos o por sometimiento a un intenso frío⁵.

2.2.2.1.-Actividad antiespasmódica:

Es la función efectiva que cumple una o varias sustancias químicas o naturales frente a problemas de espasmos reduciendo la contracción y aliviando el dolor del músculo afectado causado por un aumento de Acetilcolina, las sustancias que actúan como antagonista competitivo impide la despolarización de la célula muscular y por consiguiente a su posterior contracción¹³.

2.2.2.2.-Mecanismo de la contracción muscular según el fundamento químico molecular:

Según el fundamento químico molecular de la contracción, cuando los impulsos nerviosos llegan a la estructura de una fibra muscular se propagan por su sarcolema y avanzan hacia el interior a través de sus túbulos-T; ello aumenta la permeabilidad y provoca la liberación de los iones de calcio (Ca^+) de los sacos de la retícula sarcoplásmica en el sarcoplasma; en la fibra muscular en reposo, los miofilamentos de la actina y miosina están inhibidos de interactuar debido a la presencia de una proteína denominada troponina; sin embargo, cuando son liberados, los iones de calcio se unen a la troponina e inhiben su acción; esto se da porque con dos cargas positivas, los iones de calcio son

atraídos hacia las cargas negativas de los miofilamentos de actina y de los puentes cruzados de miosina; este proceso genera un enlace electrostático entre los miofilamentos de actina y miosina; de forma específica los puentes cruzados de miosina se unen a los miofilamentos de actina; entonces los puentes se destruyen y los miofilamentos de actinas son empujados hacia el centro del sarcomero y a continuación el musculo se contrae y se genera la tensión. La fuente inmediata de energía para la contracción muscular es el componente adenosina trifosfato (ATF); por lo tanto, es evidente que los músculos están total y absolutamente subordinados a los impulsos nerviosos para su activación; esto quiere decir que sin impulso nerviosos no puede generarse tensión¹⁴.

2.2.2.3.-Acetilcolina:

La acetilcolina es un neurotransmisor constituido por la unión de la colina y acetato, se almacena en vesículas presinápticas de las terminaciones sináptica; la acetilcolina se libera cuando el potencial del nervio (PAN) se propaga hasta la terminal sináptica y que por exocitosis se libera el neurotransmisor al espacio sináptico para interaccionar con sus receptores postsinapticos localizados en las estructuras efectoras; por otra parte, la acetilcolina es considerada también como un transmisor de los impulsos nerviosos ¹⁵.

2.2.2.4.-Mecanismo de contracción por acción de la acetilcolina:

Al producirse un impulso nervioso, la acetilcolina es liberada desde la terminación presináptica para unirse a los receptores nicotínicos postsinápticos, dando lugar a la apertura de los canales iónicos, donde el sodio y el calcio entra al interior de la célula y dejando salir al potasio, generándose de esta manera la despolarización y produciéndose la contracción muscular; cabe indicar que los receptores nicotínicos se encuentran fundamentalmente en la placa motora tanto a nivel presináptico como a nivel postsináptico (aumentan la liberación de acetilcolina frente a potentes estímulos, actúan como retroalimentación positiva) y son los responsables de la despolarización y contracción muscular¹⁶.

2.2.2.5.-Mecanismo de la relajación muscular:

Si la contracción muscular es producida por la activación de la troponina a través de los iones de calcio permitiendo esto la unión de actina y miosina, la relajación muscular depende de la disminución y el bombeo rápido de los iones de calcio (Ca^+) desde el citoplasma hacia el retículo sarcoplásmico, al salir los iones de calcio (Ca^+) producirá que la tropomiosina regrese a su estado anterior tapando el lugar de unión de la actina y por ende la miosina no tendrá a donde unirse y posteriormente se llevara a cabo la relajación muscular¹⁷.

Gal¹⁸ et al en el año 2001 en su libro bases de la fisiología publicado en España refieren lo siguiente, para que se produzca una relajación

muscular los niveles de calcio (Ca^+) citoplasmático tiene que volver a ser bajos, quien se encarga de retirar los iones de Ca^+ del citoplasma es la bomba de Ca^+ -ATPasa que se encuentra en el retículo sarcoplasmico, la disminución de los iones de Ca^+ citoplasmático restablece la configuración inhibidora de la troponina y tanto los filamentos gruesos como los filamentos finos vuelven a su estado de reposo causando de esta manera la relajación muscular.

2.2.3.-*Rattus rattus* var. albinus o ratas de laboratorio.

Los *Rattus rattus* de la variedad albina, son utilizadas ampliamente en experimentos de estudios científicos las cuales dentro de esta variedad podemos encontrar entre ellas a los *Rattus rattus Sprague dawley* y *wistar* que son ratas híbridas albinas que provienen de las cepas de la especie *Rattus nevergicus* y son de mayor utilización en experimentos; estas especies son de cabezas largas de una alta tasa de reproducción, cuyo temperamento calmado son de fácil manejo para el científico y los técnicos de laboratorio¹⁹.

Existen diversas técnicas y maniobras para poder coger los *Rattus rattus* de laboratorio, si bien estas pueden ser dóciles siempre se debe de tener la precaución y el conocimiento respectivo para poder cogerla y maniobrarla en los trabajos; las primeras maniobras consiste coger a la rata con la mano hábil por el tórax de forma envolvente pero colocando la los dedos de la mano y a la vez sujetando los diferentes lugares estratégicos que pueda impedir que el animal mueva la cabeza y sus patas delanteras, en caso de las ratas de mayor tamaño se sugiere cogerla con ambas manos, con la mano libre se da apoyo a

los cuartos traseros del animal y con la otra mano se coge las extremidades posteriores y la parte de la cola esto permitirá la inmovilización de las ratas²⁰.

2.2.3.1.-Ubicación del duodeno de *Rattus rattus*:

El duodeno del *Rattus rattus* es la parte del intestino delgado situada en la parte final del estómago y está sujeto por el mesoduodeno cuyo origen es la derecha de la raíz del mesenterio, el pliegue duodenocólico se extiende entre la parte ascendente del duodeno y la hoja derecha del mesocolon descendente²¹

III.- HIPÓTESIS:

La *Clinopodium weberbaueri* pertenece a la familia lamiaceae, esta familia de especie vegetal contiene flavonoide entre sus metabolitos secundarios y si los flavonoides tienen actividad antiespasmódica, entonces la *Clinopodium weberbaueri* también tiene efecto antiespasmódico sobre el duodeno de *Rattus rattus*.

IV.- METODOLOGÍA:

4.1.-Diseño del estudio:

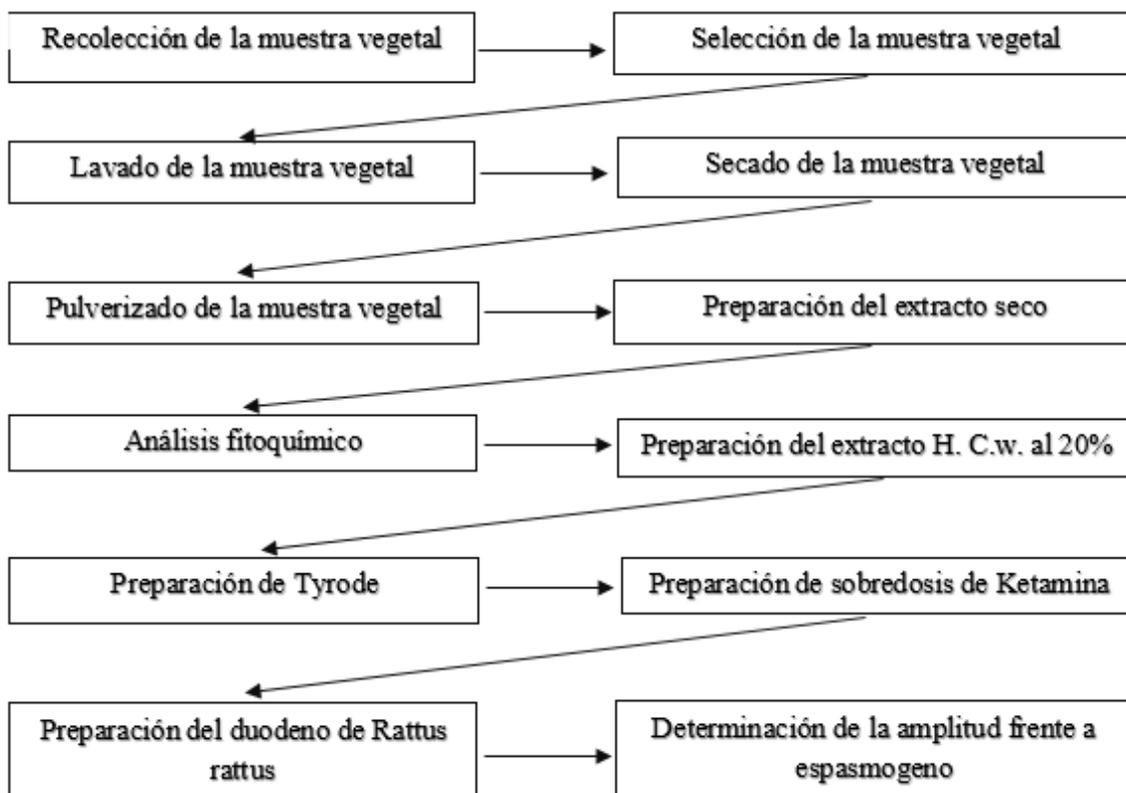
4.1.1.-Tipo de estudio:

La determinación del efecto antiespasmódico del extracto hidroalcohólico de *Clinopodium weberbaueri* al 80% fue un estudio del tipo experimental, ya que permitió analizar el efecto producido por la variable independiente del extracto hidroalcohólico sobre la variable dependiente del efecto antiespasmódico en duodeno in vitro de *Rattus rattus*²².

4.1.2.-Nivel de investigación:

El nivel del estudio fue de enfoque cuantitativo.

Figura 01: Desarrolló de los procedimientos para alcanzar el objetivo.



4.1.3.- Preparación de la muestra vegetal^{23, 24, 25}:

4.1.3.1.-Recolección de la muestra vegetal:

La muestra vegetal fue recolectada en el distrito de Huandoval de la provincia de Pallasca del departamento de Ancash; a horas entre 1:00 pm a 3:00 pm, (se evitó recoger muestras húmedas debido al mes lluvioso en esta provincia) del mes de abril del 2018.

4.1.3.2.-Selección de la muestra vegetal:

Se realizó la selección de la muestra vegetal en el laboratorio de la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote. Este proceso se hizo con el fin de separar las hojas que no se encontraban en condiciones favorables para el proceso de obtención del extracto seco.

4.1.3.3.-Lavado de las hojas de la muestra vegetal:

La muestra vegetal se lavó con agua potable para eliminar impurezas como tierra y polvo de las hojas y posteriormente se enjuago con agua destilada.

4.1.3.4.-Secado de la muestra vegetal:

Se llevó la muestra vegetal a una estufa para el secado respectivo siendo la temperatura de 50°C

4.1.3.5.-Pulverización de la muestra vegetal:

Para la pulverización respectiva de la muestra vegetal se utilizó el molino de aspas, una vez pulverizada la muestra, se introdujo a un frasco ámbar y se conservó para su posterior proceso.

4.1.4.-Metodología experimental:

4.1.4.1.-Preparación del extracto seco²⁴:

- a). Se pesó 100g de hojas de *Clinopodium weberbaueri* pulverizada y se agregó en un frasco ámbar de boca ancha.
- b). Luego se preparó 500ml litro de alcohol de 80°

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$80^\circ \times 500ml = 96^\circ \times V2$$

$$V2 = \frac{80^\circ \times 500ml}{96^\circ} = \frac{40,000^\circ/ml}{96^\circ} 416.66ml$$

416.66 se tomará de alcohol de 96°

- c). Una vez obtenido el alcohol de 80°, se agregó al frasco ámbar que contenía los 100 g de muestra vegetal pulverizada y se dejó macerar por 7 días previa refrigeración.
- d). Después de los 7 días se retiró la muestra del frasco ámbar y se procedió al filtrado por medio de la bomba de filtrado al vacío.
- e). Luego de haber terminado con el filtrado, se realizó la obtención del extracto seco; para ello, se llevó la muestra filtrada al equipo rota vapor; la finalidad de este proceso fue destilar el alcohol y evaporar el agua, quedarnos con el extracto puro.
- f). El extracto obtenido se guardó en un recipiente porta muestra el cual fue tapado y forrado con papel aluminio, previa rotulación con el código respectivo.

4.1.5.-Análisis fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *Clinopodium weberbaueri*:

4.1.5.1.-Reacción de caracterización para la determinación de flavonoides^{25, 26}.

a). Reacción de FeCl_3 .

Se cogió una alícuota del extracto seco de *Clinopodium weberbaueri* y se diluyó en 5ml de etanol, a esta solución se le agregó unas gotas de FeCl_3 , y se obtuvo como resultado positivo para flavonoides una coloración azul verdoso.

Tabla 02: Identificación de flavonoides a través de la reacción con FeCl_3			
Dilución	Mas	Resultado	Estimación: cruces en base 4
Alícuota de E. Cw. en 5 ml de etanol	4gotas de FeCl_3	Color azul verdoso	++++

4.1.6.-Preparación de concentración de extracto Hidroalcohólico de *Clinopodium weberbaueri*:

4.1.6.1.- Concentración de extracto Hidroalcohólico de C. w. al 20%

$$1\text{ml } C.w. \text{ --- } 1\text{ml} \text{ --- } 100\%$$

$$X \text{ --- } 1\text{ml} \text{ --- } 20\%$$

$$X = 0.2\text{ml } C.w$$

0.2ml de C.w. estuvo contenido en 1 ml de H₂O destilada

4.1.7.-Preparación de la solución Tyrode^{27, 28}.

En un recipiente que contiene H₂O destilada se añadirán las siguientes sustancias.

Cloruro de sodio (NaCl)	_____	8.0g
Cloruro de potasio (KCl)	_____	0.20g
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	_____	0.1g
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	_____	0.20g
Bifosfato de sodio (NaH ₂ PO ₄)	_____	0.05g
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	_____	1.0g
Glucosa	_____	1.0
H ₂ O destilada	_____	completar hasta 1L.

4.1.8.-Preparación de sobredosis de Ketamina según el peso del espécimen (para el sacrificio del espécimen).

$$80mg \text{ de Ketamina} \times 0.291 \text{ mg (peso del especimen 1)} = 23.28mg$$

$$50mg \text{ _____} 1ml$$

$$23.28mg \text{ _____} X$$

$$X = 0.46ml$$

4.1.9.-Preparación del duodeno de *Rattus rattus*:

El espécimen fue sacrificado mediante una inyección intraperitoneal con Ketamina a sobredosis de 0.46ml más la inhalación de Cloroformo; posteriormente se abrió la cavidad abdominal y se extrajo la porción del duodeno, esto fue seccionado en tres partes iguales, estas partes a su vez fueron

colocadas en una placa Petri para su posterior lavado con solución de Tyrode y que luego fue fijado en el equipo de órgano aislado²⁹.

4.1.10.-Determinación de la amplitud frente a espasmógeno:

Se dejó estabilizar las tres muestras de duodeno del espécimen en la cámara de órgano aislado (uno en cada cámara) por 10 minutos, luego se añadió a cada cámara de órgano aislado 0.25ml de Acetilcolina Diluida (0.25ml = 5gotas) y se registró el tono por 3 minutos, luego se aplicó volúmenes de 0.2, 0.3 y 0.5ml del extracto Hidroalcohólico de *Clinopodium weberbaueri* al 20% (0.2ml = 4 gotas, 0.3ml = 6 gotas, 0.5ml = 10 gotas), con un intervalo de dosis de 3 minutos; posteriormente se aplicó el último volumen y se registró el tono por 10 minutos, y luego se realizó el lavado de la cámara de órgano aislado por 2 veces con solución de Tyrode; finalizando el procedimiento se realizó el análisis de los resultados obtenidos.

Tabla 03: Esquema de los procedimientos para la determinación de la amplitud frente a espasmógeno.

Nº de Especimen	Secciones de duodeno	Introducir a la C.O.A. y estabilizar X 10 minutos	Añadir Acetilcolina diluida	Registrar el tono	Aplicar diferente volumen del E.H.C.w. al 20% = Intervalo de volúmenes= 3 min	Registrar el tono	Lavado de C.O.A con Tyrode.
Esp. 1	Sec. 1	✓	1 ml	Por 3 min.	0.2ml	Por 10 min.	Por 2 veces
	Sec. 2	✓	1 ml	Por 3 min.	0.3ml	Por 10 min.	Por 2 veces
	Sec. 3	✓	1 ml	Por 3 min.	0.5ml	Por 10 min.	Por 2 veces

C.O.A.= Cámara de órgano aislado, E.H.C.w. = Extracto Hidroalcohólico de *Clinopodium weberbaueri*.

4.2.- Población y muestra:

4.2.1.-Población vegetal:

Conjunto de hojas de *Clinopodium weberbaueri*.

4.2.2.-Población biológica:

Rattus rattus – 1 espécimen

4.2.3.-Muestra vegetal:

Se emplearon 1 kg de hojas frescas de *Clinopodium weberbaueri*.

4.2.4.- Muestra Biológica:

Tres secciones de duodeno de *Rattus rattus*.

4.3.- Definición y operacionalización de variables e indicadores:

Tabla 04: Definición y operacionalización de variables e indicadores			
Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores
Dependiente	Efecto antiespasmódico	Relajación del musculo liso intestinal	-Amplitud -Frecuencia
Independiente	Extracto hidroalcohólico	Concentración de <i>Clinopodium weberbaueri</i> al 20%	Dosis de extracto de <i>Clinopodium weberbaueri</i> .

4.4.- Técnicas e instrumentos de recolección de datos:

Para este estudio se utilizó la técnica de observación directa, registro, dosis – respuesta que se observaron en la evaluación del efecto antiespasmódico del extracto

hidroalcohólico de las Hojas de *Clinopodium weberbaueri*; los datos obtenidos fueron registrados en fichas de recolección de datos³⁰.

4.5.- Plan de análisis:

Los resultados del análisis se muestran a través de las tablas y gráficos de barra, donde se evidencian los niveles de amplitud hallados tanto para la contracción y relajación³¹.

4.6.- Matriz de consistencia:

Tabla N° 05: Matriz de consistencia

Título del estudio: EFECTO ANTIESPASMÓDICO IN VITRO DE UN EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE <i>Clinopodium weberbaueri</i> EN DUODENO DE <i>Rattus rattus</i> .							
Objetivos	Hipótesis	VARIABLES	Definición operacional	Indicadores	Diseño de estudio	Método de estudio	Población y muestra
“Determinar el efecto antiespasmódico in vitro de un extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Clinopodium weberbaueri</i> ; en duodeno de <i>Rattus rattus</i> ”	El extracto hidroalcohólico de <i>Clinopodium weberbaueri</i> tiene efecto antiespasmódico sobre el duodeno de <i>Rattus rattus</i>	Dependiente: Efecto antiespasmódico sobre el musculo liso intestinal.	Relajación del musculo liso intestinal	-Amplitud -Frecuencia	Tipo de estudio: Experimental	1.- Obtención del extracto hidroalcohólico de <i>Clinopodium weberbaueri</i> . 2.- Inducción de extracto de <i>Clinopodium weberbaueri</i> al 20% 3.Determinacion del efecto antiespasmódico del extracto hidroalcohólico de <i>Clinopodium weberbaueri</i>	Población: 1 espécimen de <i>Rattus rattus</i>
		Independiente: Concentración del extracto hidroalcohólico de <i>Clinopodium weberbaueri</i> .	Concentración de <i>Clinopodium weberbaueri</i> al 20%	Dosis de <i>Clinopodium weberbaueri</i>			Nivel de estudio: Cuantitativo

4.7.- Principios éticos:

Teniendo en cuenta la Declaración de Helsinki, se promovió la recuperación del conocimiento tradicional sobre el uso de las plantas medicinales, no solo para preservar su legado cultural, sino también para registrar información relevante y demostrar científicamente sus efectos terapéuticos que servirán como nuevas fuentes de medicamentos y otros beneficios para la humanidad. En el caso del manejo de animales de experimentación se realizará con respeto de su bienestar de acuerdo a los propósitos de la investigación, promoviendo su adecuada utilización³².

V. RESULTADOS:

5.1 Resultados:

Tabla 6: Determinación de la amplitud y disminución de la concentración

Amplitud y disminución de la contracción		
	Amp. En cm	Nivel sobre el basal
Basal	1.5 cm	
Contracción con Ach. – 1ml	3 cm	Sobre el nivel del basal
E.Cw. al 20% - 0.2ml	1.3 cm	Por debajo del basal
E.Cw. al 20% - 0.3ml	1 cm	Por debajo del basal
E.Cw. al 20% - 0.5ml	0cm	Por debajo del basal

Figura 2: Representación gráfica lineal de los niveles de amplitud contracción y relajación del duodeno de *Rattus rattus*.

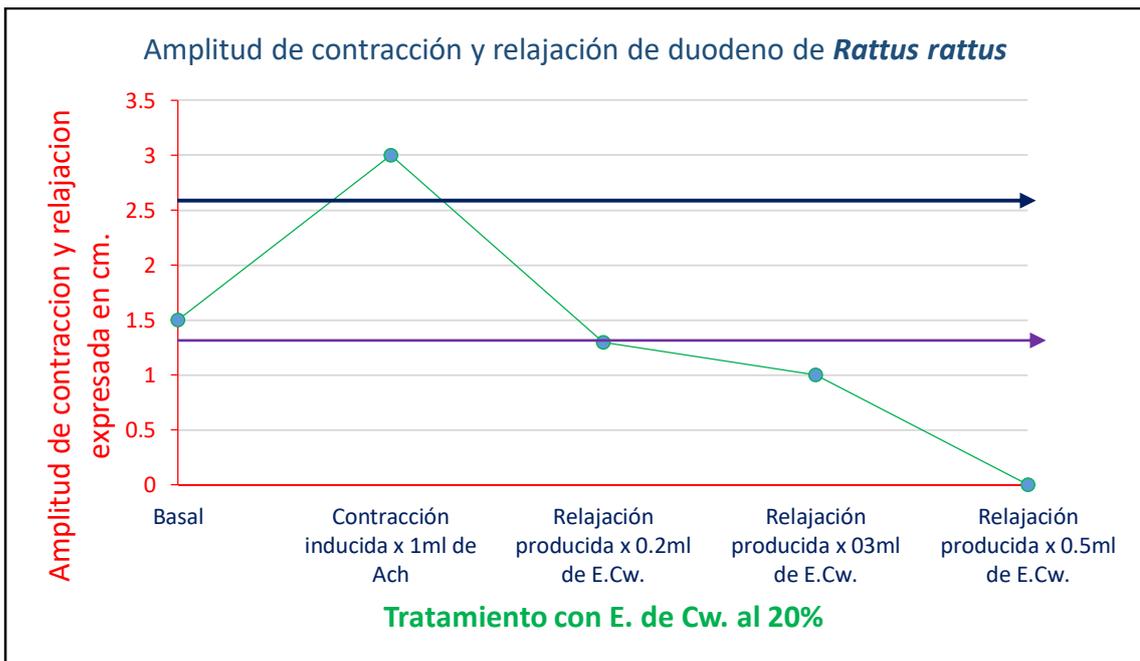
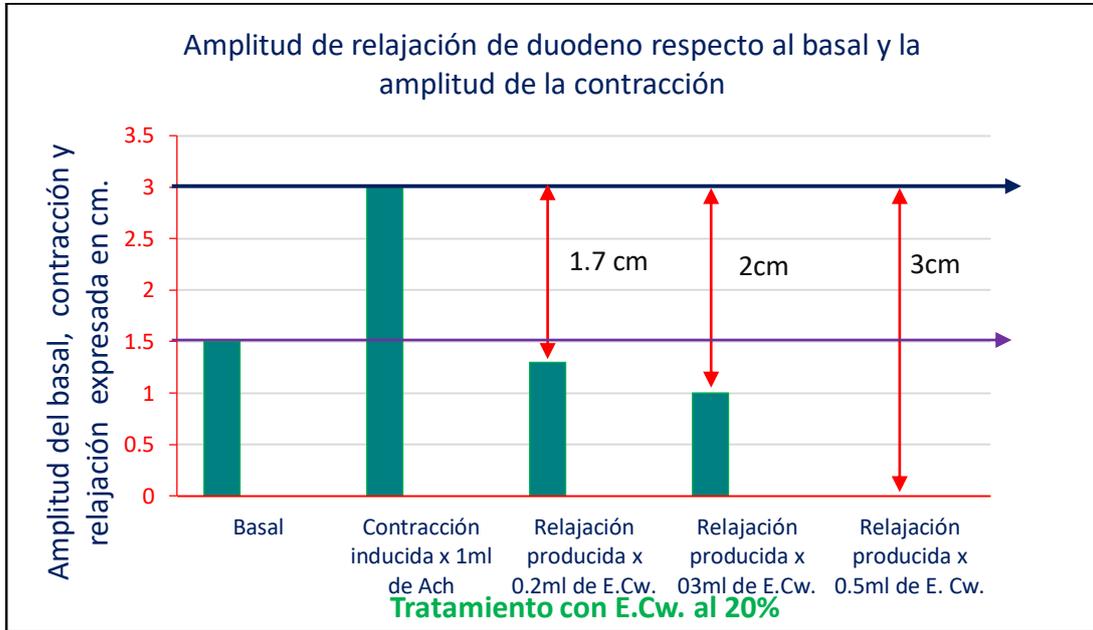


Figura 3: Amplitud de relajación del duodeno por acción del extracto hidroalcohólico de hojas de *Clinopodium weberbaueri* en comparación con la amplitud de contracción provocada por acetilcolina.



Las determinaciones de las medidas están dadas por la resta entre el pico de la contracción provocada por acetilcolina y el punto de referencia alcanzado por los distintos volúmenes del E. H. *Clinopodium weberbaueri* al 20%.

Figura 4. Amplitud de relajación del duodeno por acción del E.H.C.w. En comparación con el nivel de la amplitud de contracción provocada por acetilcolina.

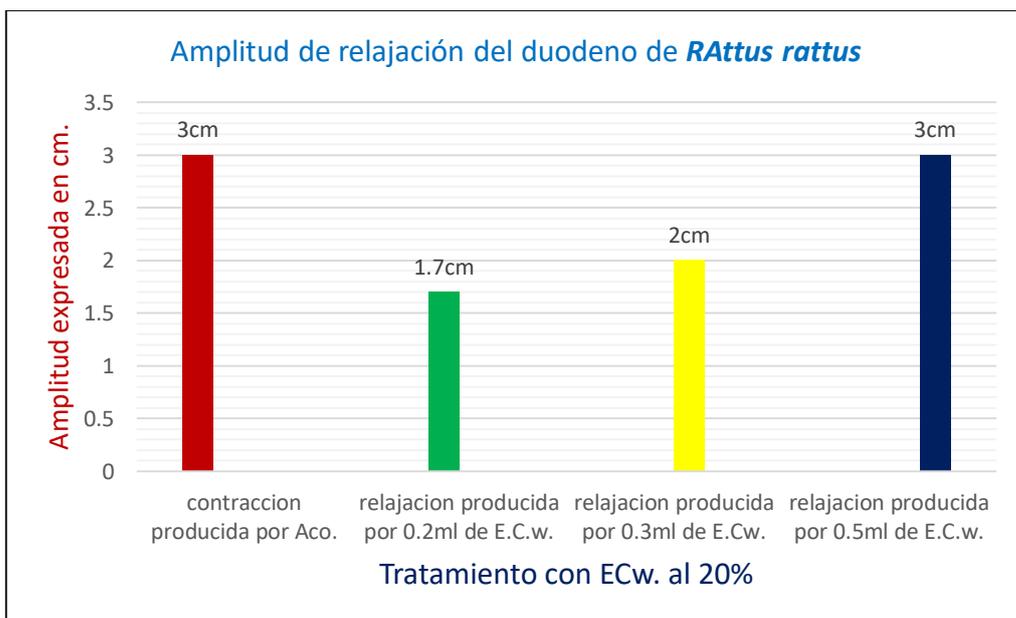
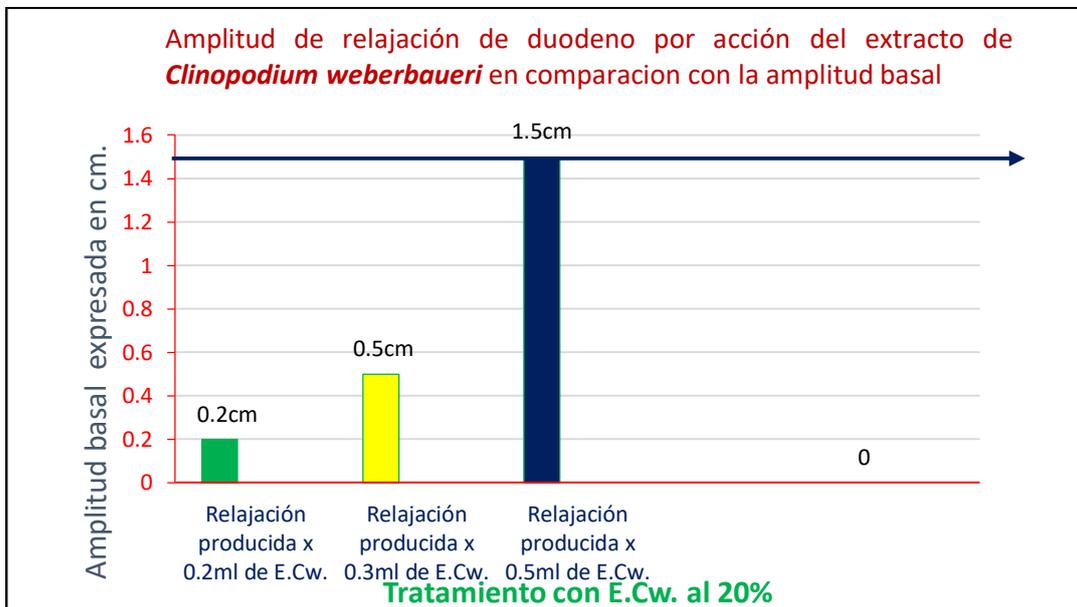


Figura 5: Amplitud de la relajación del duodeno en comparación con la amplitud basal



Figura 6: Amplitud de relajación del duodeno por acción del extracto hidroalcohólico del de las hojas de *Clinopodium weberbaueri* en comparación con la amplitud basal.



Las medidas de la amplitud para esta representación están en relación de la resta entre el nivel basal menos el nivel de referencia alcanzado por las distintas dosis.

5.2 Análisis de resultados:

Siendo la *Clinopodium weberbaueri* una especie vegetal que pertenece a la familia Lamiaceae según la descripción taxonómica realizada por el *Herbarium Truxillense* (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo, y que dicha familia de esta especie vegetal posee entre sus metabolitos secundarios un alto contenido de flavonoides según lo referido por Sierra et al³³ en el año 2013; los flavonoides poseen diversos efectos medicinales y entre lo que menciona López en su estudio del año 2002, el efecto antiespasmódico³⁴. Por ello, a partir de los hallazgos encontrados en este estudio, aceptamos la hipótesis, que establece que el extracto hidroalcohólico de *Clinopodium weberbaueri* tiene efecto antiespasmódico, estos resultados guardan relación según los autores mencionados respecto a la familia lamiaceae y a la actividad de los flavonoides.

Teniendo referencia que la *Satureja brebicalyx* pertenece a la familia lamiaceae, un estudio realizado por Yapuchura³ en el año 2010 respecto a esta especie, determino a través de sus resultados hallados mediante el análisis fitoquímico, que existe 16.0 mg de flavonoides por gramo de muestra de *Satureja brebicalyx*. La evidencia de la existencia de flavonoide en la familia lamiaceae al cual pertenece la *Satureja brebicalyx* y demostrado por Yapuchura contrasta con el resultado hallado en este estudio tras la realización de la prueba de reacción con el tricloruro férrico para la muestra de *Clinopodium weberbaueri* hallándose como resultado positivo a esta reacción, una coloración azul verdoso tal como se muestra en la tabla 02; ambas evidencias comprueban y confirman la existencia de flavonoide en la familia lamiaceae.

Tras la inducción de Acetilcolina a la muestra de duodeno de *Rattus rattus*, se hallaron resultados de contracción muscular, mostrando una amplitud de 3cm tal como se muestra en la figura 2 ; esta evidencia de contracción muscular se relaciona con diversas fuentes de información respecto a la acción de la Acetilcolina, así mismo, se puede confirmar con lo descrito por Carrasco y Ayuso¹⁶ donde refieren que la acetilcolina al ser liberada desde las terminaciones presinápticas se une con el receptor nicotínico postsinápticos, ocasionando la apertura de canales iónicos donde el sodio y el calcio se introducen en la célula a través de los canales y desplazando al potasio hacia el exterior de la célula y por consiguiente produciéndose la despolarización y con ello provocando la contracción muscular.

Referente a la efectividad del extracto de *Clinopodium weberbaueri* a una concentración de 20%, muestra en los resultados obtenidos en este estudio, una disminución en la amplitud de la contracción muscular, tal como se muestra en la figura 2, 3 y 4 , la efectividad de *Clinopodium weberbaueri* a una concentración de 20% respecto a la disminución de la contracción muscular, es contrastable con el resultado mostrado por Ruiz et al¹¹ en el estudio realizado para la Actividad espasmolítica de una tintura de *Melissa officinalis* L. en modelos experimentales, que también demuestra efectividad de la disminución de la contracción muscular a una concentración de 20% para *Melissa officinalis*; la *Clinopodium weberbaueri* y la *Melissa officinalis* pertenecen a la familia lamiaceae y esto sigue reafirmando que dicha especie posee efecto frente a espasmos, con ello la *Clinopodium weberbaueri* va tomando mayor fuerza de credibilidad en cuanto a su efecto antiespasmódico.

Los resultados hallados tras las diferentes volúmenes con extracto de *Clinopodium weberbaueri* mostraron diferencias en la reducción de la amplitud respecto a

contracción muscular inducida por la Acetilcolina, siendo esto para el volumen de 0.2ml de extracto al 20%, alcanzo una reducción de la amplitud de 0.2cm, para el volumen de 0.3ml de la misma concentración del extracto, se halló una disminución de la amplitud de la contracción de 0.5cm, y para el volumen de 0.5ml de la misma concentración del extracto, alcanzo una reducción de la amplitud de 1.5cm, las tres disminuciones por debajo el estado basal, tales resultados se evidencian en la figura 5 y 6.

La razón de mayor probabilidad del efecto antiespasmódico del extracto de *Clinopodium weberbaueri*, puede deberse al contenido de flavonoides que posee entre sus metabolitos secundarios, la manera de sustentar esta probabilidad es mediante lo descrito por Santos et al³⁵ donde en el estudio realizado en el año 2015 sobre Diferentes mecanismos de acción de la genisteína y quercetina en las contracciones espontáneas del duodeno de conejo, demuestra que la genisteina y quercetina (flavonoides) redujeron la amplitud de contracciones espontáneas en el musculo liso del duodeno de conejo, así demuestran que los flavonoides tanto genisteína y quercetina relajan los músculos lisos intestinales precontraídos. Por otra parte, Vanaclocha y Cañigueral³⁶, describen que los flavonoides poseen actividad antiespasmódica y precisan que el flavonoide liquiritósido presente en la raíz de regaliz es la brinda la actividad antiespasmódica.

Si bien no se sabe qué tipo de flavonoide le confiere la actividad antiespasmódica a la *Clinopodium weberbaueri*, esta especie vegetal ya evidencia una alta probabilidad que demuestra que el efecto antiespasmódico se debe a la actividad de los flavonoides contenido entre sus metabolitos secundarios.

VI. CONCLUSIONES:

Mediante el desarrollo de este estudio se pudo determinar la presencia de flavonoides en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium weberbaueri*, para lograr este propósito se hizo la identificación correspondiente con la reacción de tricloruro férrico, obteniendo como resultado una coloración azul verdoso y con una estimación de 4 cruces en base 4.

Se logró determinar la amplitud de relajación a través del efecto del extracto hidroalcohólico de *Clinopodium weberbaueri* a una concentración de 20% a diferentes volúmenes, siendo el nivel de relajación con una amplitud de 0.2cm para el volumen de 2ml, de 0.5cm para el volumen de 0.3ml y de 1.5cm para el volumen de 0.5ml, las tres amplitudes se encuentran por debajo del nivel basal.

Se concluye en este estudio, demostrando con evidencia, el efecto antiespasmódico que tiene el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium weberbaueri* sobre el duodeno de *Rattus rattus*.

Aspectos complementarios:

Como aspecto complementario a través de los resultados hallados en este estudio, se recomienda a los futuros investigadores, no tomar en cuenta los tres minutos de registro del tono luego de la inducción de Acetilcolina, debido a las dificultades que presenta sobre la disminución de relajación de manera acelerada al estado basal siendo la disminución en menos de 1 minuto, se recomienda aplicar la dosis del extracto vegetal en segundos de haber inducido la Acetilcolina para mejores resultados.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA:

1.- Sotelo M. Torres L. Vergara S. Nuevo registro de *Clinopodium weberbaueri* (mansf.) grovaerts “runtuwayra” para la provincia de Andahuaylas. Perú. Rev. Investig. Le Cordon Bleu. [Internet]. 2014 [Citado el 14 de May. Del 2018] 1(2): 57-61. Disponible en:

<http://revistas.ulcb.edu.pe/index.php/REVISTAULCB/article/view/15/13>

2.- Rodríguez M. Lamiaceae endémicas del Perú. Rev. Perú. Biol. [Internet]. 2006 Dic. [Citado el 24 de May. De 2018]. 13(2): 371 - 379. Disponible en:

<http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVrevistas/biologia/v13n2/pdf/a65.pdf>

3.- Yapuchura R. Estudio de los componentes antioxidantes de las hojas de Muña (*Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb.) e Inca muña (*Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze) [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Agraria la Molina; 2010. Disponible en:

<http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1700/TAL%2015-124-TM.pdf?sequence=1>

4.- Fonnegra R, Jiménez S, plantas medicinales aprobadas en Colombia [texto en línea]. Medellín; Universidad de Antioquia; 2007 Ene. [Citado el 24 de May. Del 2018]. Disponible en:

<https://books.google.com.pe/books?id=K8eI-7ZeFpsC&pg=PA193&lpg=PA193&dq=flavonoide+de+la+familia+lamiaceae+es+antiespasmodica&source=bl&ots=6Et5x8ySdA&sig=CEUWoAzw->

[Dv1_mVfDjUFoF1Guh0&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjFqruonqDbAhUjxVkKHcmFDdIQ6AEIPzAC#v=onepage&q=flavonoide%20de%20la%20familia%20lamiaceae%20es%20antiespasmodica&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=Dv1_mVfDjUFoF1Guh0&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjFqruonqDbAhUjxVkKHcmFDdIQ6AEIPzAC#v=onepage&q=flavonoide%20de%20la%20familia%20lamiaceae%20es%20antiespasmodica&f=false)

5.- Andrade C, Clifford P. Masajes basados en resultados [Texto en línea]. Barcelona: Paidotribo; 2004. [Citado el 24 de May. Del 2018]. Disponible en:

<https://books.google.com.pe/books?id=AW6URdU234MC&pg=PA73&dq=definicion+de+espasmos&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi87fbLsKDbAhVEwFkKHS57BUQ6AEIMDAC#v=onepage&q=definicion%20de%20espasmos&f=false>

6.- Placencia E. Portilla D. Quispe I. Efecto del infuso de hojas secas de *Psoralea Glandulosa* Sobre ñeón de *Cavia porcellus* tipo ondulado erizado Rev. Farmaciencia [Internet]. 2013 [Citado el 27 de May. Del 2018]. 1(2). 74 – 83. Disponible en:

<http://www.revistas.unitru.edu.pe/index.php/farmabioq/article/view/470/442>

7.- Fabrocini V. El gran libro de la Homeopatía – todos los remedios para los recién nacidos, niños, jóvenes, adultos y ancianos [Texto en línea]. Barcelona: De Vicchi; 2016 [Citado el 28 de May. Del 2018]. Disponible en:

<https://books.google.com.pe/books?id=0oprDQAAQBAJ&pg=PT111&dq=espasmos+gastrointestinal+producidos+por+frio&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiowsaa0qfbAhUkwVkkHUrfCzsQ6AEINjAD#v=onepage&q=espasmos%20gastrointestinal%20producidos%20por%20frio&f=false>

8.- Mostacero J. Características edafoclimáticas y fitogeográficas de las plantas medicinales del dominio andino noroccidental del Perú, durante 1976 al 2004. [Tesis

doctoral]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2005 [Citado el 1 de Jun. Del 2018]. Disponible en:

<http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/5997/Tesis%20Doctorado%20-%20Jos%C3%A9%20Mostacero%20Le%C3%B3n.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

9.- Galán A. Sánchez I. Principios de botánica farmacéutica [texto en internet]. Cajamarca: Upagu; 2013 [Citado el 1 de Jun. Del 2018]. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/290434406_Principios_de_Botanica_Farmacutica

10.- Sare O, Varas S. Características fisicoquímicas y efecto del aceite esencial de las hojas de *Satureja brevicalyx* Epling sobre íleon aislado de *Cavia Porcellus* [Tesis]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2015. [Citado el 2 de Jun. Del 2018]. Disponible en:

<http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/1562/Sare%20Salvador%2c%20Osmer%20Eduar.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

11.- Ruiz A, De la Paz J, García A, Sebasco C, Carranza A, Pereira E. Actividad espasmolítica de una tintura de *Melissa officinalis* L. en modelos experimentales. Rev Cubana Plant Med [Internet]. 2004; [Citado el 2 de Jun. De 2018]. 9 (3). Disponible en:

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

12.- Sotelo M. Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Clinopodium weberbaueri* (Mansf.) Govaerts "Runtuwayra", frente a la supervivencia de cepas de

Escherichia coli ATCC 25922 y *Salmonella typhi*. [Tesis]. Andahuaylas: Universidad Nacional José María Arguedas Facultad de Ingeniería; 2014. [Citado del 17 de jun. De 2018]. Disponible desde:

<http://repositorio.unajma.edu.pe/bitstream/handle/123456789/203/10-2014-EPIA-Sotelo%20Ca%C3%B1ari-Actividad%20antibacteriana%20runtuhuayra.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

13.- Serrano L. Actividad antiespasmódica de extractos de plantas medicinales en preparaciones de ñeón de *cobayo* [Tesis doctoral]; México: Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Medicina; 2005. [Citado el 14 de jul. Del 2018]. Disponible desde:

<http://eprints.uanl.mx/1677/1/1080126698.PDF>

14.-Alter M. los estiramientos y bases científicas y desarrollo de ejercicios [Texto en línea]. Barcelona: Paidotribo; 2004. [Citado el 14 de Jul. Del 2018]; Disponible en:

https://books.google.com.pe/books?id=ltyN_JdeF1EC&pg=PA25&dq=mecanismo+de+la+contraccion+muscular&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiCsOTBhJfVAhWH2yYKHcdNDoIQ6AEIKDAB#v=onepage&q=mecanismo%20de%20la%20contraccion%20muscular&f=false

15.- Mendoza N. Farmacología medica [Texto en internet]. México: Editorial Medica Panamericana; 2008 [Citado el 17 de Jul. del 2018]. Disponible en:

<https://books.google.com.pe/books?id=EUBNE4Y0v9sC&pg=PA263&dq=que+es+la+acetilcolina&hl=es->

[419&sa=X&ved=0ahUKEwiEpviJvKzcAhVRq1kKHe8FCygQ6AEIJjAA#v=onepage&q=que%20es%20la%20acetilcolina&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=Qj7_CKcoZDIC&pg=PA305&dq=mecanismo+de+contraccion+por+acetilcolina&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiEpviJvKzcAhVRq1kKHe8FCygQ6AEIJjAA#v=onepage&q=que%20es%20la%20acetilcolina&f=false)

16.-Carrasco M, Ayuso F. Fundamento básico de anestesia y reanimación en medicina de urgencias, emergencias y catástrofe. [Texto en internet]. Madrid: Arám; 2006. [Citado el 17 de jul. del 2018]. Disponible en:

[https://books.google.com.pe/books?id=Qj7_CKcoZDIC&pg=PA305&dq=mecanismo+de+contraccion+por+acetilcolina&hl=es-](https://books.google.com.pe/books?id=Qj7_CKcoZDIC&pg=PA305&dq=mecanismo+de+contraccion+por+acetilcolina&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiP9NOyuazcAhXDk1kKHWa9BhEQ6AEILzAC#v=onepage&q=mecanismo%20de%20contraccion%20por%20acetilcolina&f=false)

[419&sa=X&ved=0ahUKEwiP9NOyuazcAhXDk1kKHWa9BhEQ6AEILzAC#v=onepage&q=mecanismo%20de%20contraccion%20por%20acetilcolina&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=Qj7_CKcoZDIC&pg=PA305&dq=mecanismo+de+contraccion+por+acetilcolina&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiP9NOyuazcAhXDk1kKHWa9BhEQ6AEILzAC#v=onepage&q=mecanismo%20de%20contraccion%20por%20acetilcolina&f=false)

17.- Berg J, Tymoczko J, Stryer L. Bioquímica [Texto en línea]. Barcelona: Reverte; 2008. [Citado el 17 de Jul. del 2018]; Disponible en:

<https://books.google.com.pe/books?id=HRr4MNH2YssC&pg=PA355&dq=bioquimica+de+la+relajacion+muscular&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjnmfPBjpfVAhVHOCYKHUNeD8gQ6AEIITAA#v=onepage&q=bioquimica%20de%20la%20relajacion%20muscular&f=false>

18.- Gal B, López M, Martín A, et al. Bases de la Fisiología [Texto en línea]. España: Tebar; 2001. [Citado el 17 de Jul. De 2018]. Disponible desde:

<https://books.google.com.pe/books?id=GpNkL8SiYW8C&pg=PA69&dq=relajacion+de+muscular&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjagLOGkZfVAhVM7CYKHAYBDqkQ6AEIPjAF#v=onepage&q=relajacion+de+muscular&f=false>

19.- Saiz L, Garcia J, Compaire C. animales de laboratorio – Producción, manejo y control sanitario [texto en línea]. Madrid; 1983. Instituto nacional de investigaciones agrarias José Abascal. [Citado el 18 de Jul. del 2018]. Disponible en:

<https://books.google.com.pe/books?id=Jx68pDxBYAAC&pg=PA99&dq=ratas+sprague+dawley+laboratorio+caracteristicas&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi5uYTC86TVAhXFQIYKHRk3DFcQ6AEIKDAB#v=onepage&q=ratas%20sprague%20dawley%20laboratorio%20caracteristicas&f=false>

20.- Maurelle A, Herrero E, Ricca M. Recomendaciones para manipulación y sujeción de ratas y ratones de laboratorio. Rev. Spei Domus [Internet]. 2013; Nov. [Citado el 18 de Jul. del 2018]. 9(19): 39-47. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/304557307_Recomendaciones_para_manipulacion_y_sujecion_de_ratas_y_ratones_de_laboratorio

21.- Möller R, Vazquez N, Teliz D, Méndez V. Digestive Peritoneum in Wistar Rat (Rattus norvegicus). Int. J. Morphol. [Internet]. 2013 Mar [citado 18 Jul del 2018] ; 31(1): 128-130. Disponible en:

<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022013000100020>

22.- Hernández R. Fernández C, Baptista P, Metodología de la investigación 4ta. Ed. [Texto en línea]. México: Mc Graw –Hill; 2006 [Citado el 18 de Jul. Del 2018].

Disponible en:

http://files.especializacion-tig.webnode.com/200000775-097910b6c0/sampieri-et-al-metodologia-de-la-investigacion-4ta-edicion-sampieri-2006_ocr.pdf

23.-Arnelas I, Invernón V, González M, López E. Juan A. Alcaraz D. Manual de laboratorio de Botánica. El herbario. Recolección, procesamiento e identificación de plantas vasculares. Reduca (Biología). Serie Botánica [Internet]. 2012 [Citado el 19 de Jul. Del 2018]. 5 (2): 15-24. Disponible en:

http://www.uco.es/botanica/recursos-innovacion/Manual_Herbario.pdf

24.- Carrión A, García C. Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica [Tesis]. Cuenca: Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca; 2010 [Citado el 19 de Jul. del 2018]. Disponible en:

<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2483/1/tq1005.pdf>

25.- Colina A. Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de “Muehlenbeckia hastulata (J.E.Sm) I.M. Johnst” de la zona de Yucay (Cusco) [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2016 [Citado el 19 de jul. del 2018]. Disponible en:

http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/7121/Colina_ra.pdf?sequence=1&isAllowed=y

26.- Rengifo R. Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propóleos. Art. Rev. Farmaciencia. [Internet]. 2013, Dic. [Citado el 19 de Jul. del 2018]. 1(2): 51-56. Disponible en:

<http://www.revistas.unitru.edu.pe/index.php/farmabioq/article/view/462/418>

27.- Rodríguez J, Martínez F, Riera P, et al. Manual de clases prácticas de fisiología animal. [Texto en línea]. Murcia: Universidad de Murcia, 1993. [Citado el 19 de Jul. del 2018]. Disponible en:

<https://books.google.com.pe/books?id=IY2b0gxFz28C&printsec=frontcover&dq=Manual+de+Clases+Practicas+de+Fisiologia+Animal&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiOs vCgm6PcAhVHs1kKHTHIBf8Q6AEIJjAA#v=onepage&q=tyrode&f=false>

28.- Pérez V, Vela A. Efecto del aceite esencial de *Aloysia triphylla* en íleon aislado de *Cavia porcellus* [Tesis]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo. [Citado el 19 de Jul. del 2018]. Disponible en:

<http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/3733/Perez%20Robles%2c%20Veronica%20Nohely.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

29.- Canales C, Cubias R, Pérez L. Determinación del efecto antiespasmódico que poseen las hojas de *Ambrosia cumanensis* (altamisa), *Psidium guajaba* (guayabo), *Aloe vera* (sábila) sobre el músculo liso aislado en animales de experimentación. [Tesis]. San Salvador: Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de el Salvador; 2004 [Citado el 20 de jul. del 2018]. Disponible en:

<http://ri.ues.edu.sv/5543/1/10129078.pdf>

30.- Orellana D; Sánchez M. Técnicas de recolección de datos en entornos virtuales más usadas en la investigación cualitativa. Rev. de Investigación Educativa [Internet]. 2006. [Citado el 20 de Jul. del 2018]. 24 (1): 205-222. Disponible en:

<http://www.redalyc.org/pdf/2833/283321886011.pdf>

- 31.- Rius F, Barón F. Bioestadística. España. Paraninfo. 2008.
- 32.- Klimovsky E, Saidon P, Nudelman L, Bignone I. Declaración de Helsinki sus vicisitudes en los últimos cinco años. Art. Rev. Medicina (B. Aires) [Internet]. 2002 Ago. [Citado el 20 de Jul. del 2018]. 62: 365-370. Disponible en:
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802002000400014
- 33.-Sierra R, González V, Marrero D, Rodríguez E, Lamiaceae: una revisión sobre sus efectos neurofarmacológicos y su presencia en Cuba. Rev. CENIC. Ciencias biológicas. [Internet]. 2013 [Citado el 20 de Jul. del 2018]. 44 (1). Disponible en:
<https://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB13-12.pdf>
- 34.- López M. Flavonoides. Art. Rev. Offarm [Internet]. 2002 [Citado el 20 de Jul. del 2018]. 21(4). 108-113. Disponible en:
<http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-flavonoides-13028951>
- 35.- Santos D, Grasa L, Gonzalo S, Valero M, Castro M, Arruebo M, et al. Diferentes mecanismos de acción de la genisteína y quercetina en las contracciones espontáneas del duodeno de conejo. Rev. esp. enferm. dig. [Internet]. 2015 Jul [citado 20 de Jul del 2018] ;107(7): 413-416. Disponible en:
[http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082015000700004&lng=es.](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082015000700004&lng=es)
- 36.- Vanachola B, Cañigüeral S, Fitoterapia Vademécum de prescripción. [Texto en internet]; Barcelona: Masson; 2003 [Citado el 20 de Jul. del 2018]. Disponible en:

https://books.google.com.pe/books?id=K3V4p5Pj_dAC&pg=PA32&dq=tipos+de+flavonoides+y+sus+actividades+antiespasmodica&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiQoNaWqaXcAhWqzlkKHXYeB4kQ6AEIKzAB#v=onepage&q=tipos%20de%20flavonoides%20y%20sus%20actividades%20antiespasmodica&f=false

ANEXOS:

ANEXO 1.- Estudio taxonómico e inscripción del material vegetal



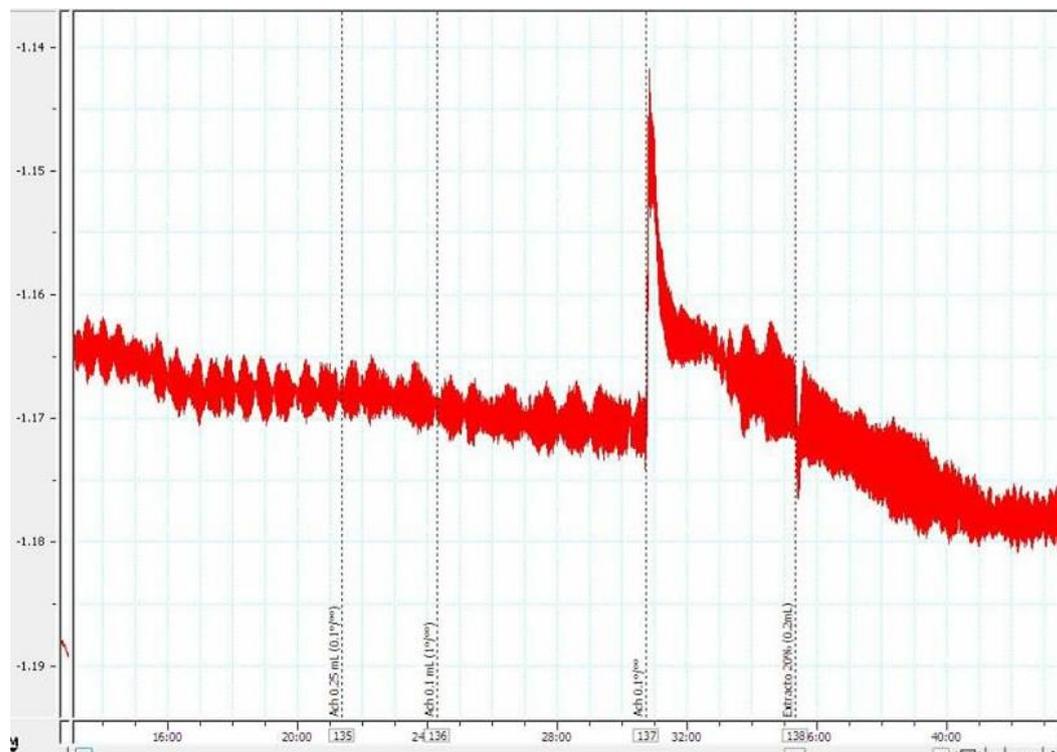
ANEXO 2.- Extracción del duodeno de *Rattus rattus*



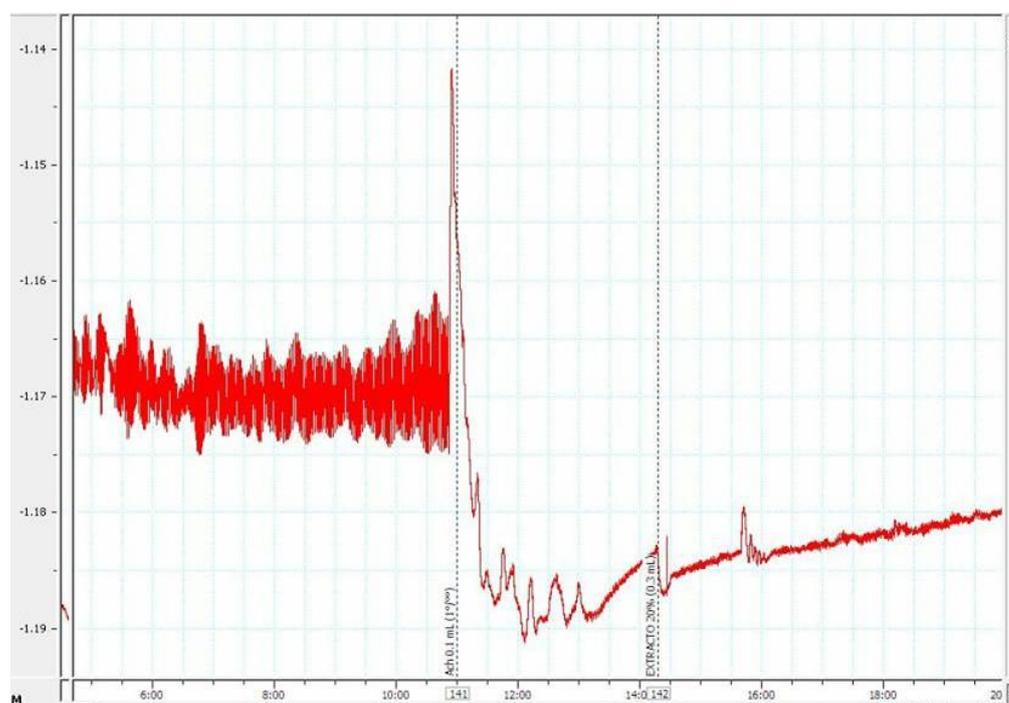
ANEXO 3.- Secciones de duodeno de *Rattus rattus*



ANEXO 4.- Determinación de la amplitud de la reducción de la contracción a dosis de 0.2ml de extracto hidroalcohólico de *Clinopium weberbaueri* al 20%



ANEXO 5. Determinación de la amplitud de la reducción de la contracción a dosis de 0.3ml de extracto hidroalcohólico de *Clinopium weberbaueri* al 20%



ANEXO 6.- Determinación de la amplitud de la reducción de la contracción a dosis de 0.5ml de extracto hidroalcohólico de *Clinopium weberbaueri* al 20%

