



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS  
METANÓLICOS DE *Justicia chlorostachya* Y *Plectranthus amboinicus*  
MEDIANTE ENSAYOS *in vitro* DE INHIBICIÓN DE  
HIALURONIDASA Y VENENO DE COBRA (*Naja naja*)**

Trabajo de titulación previo a la obtención de grado académico de:

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTOR: DIEGO ALEXANDER MONGE PISCO**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2015**



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS  
METANÓLICOS DE *Justicia chlorostachya* Y *Plectranthus amboinicus*  
MEDIANTE ENSAYOS *in vitro* DE INHIBICIÓN DE  
HIALURONIDASA Y VENENO DE COBRA (*Naja naja*)**

Trabajo de titulación previo a la obtención de grado académico de:

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTOR: DIEGO ALEXANDER MONGE PISCO**

**TUTOR: BQF. DIEGO RENATO VINUEZA TAPIA M.SC.**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2015**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: "ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Justicia chlorostachya* Y *Plectranthus amboinicus* MEDIANTE ENSAYOS *in vitro* DE INHIBICIÓN DE HIALURONIDASA Y VENENO DE COBRA (*Naja naja*).", de responsabilidad del señor egresado Diego Alexander Monge Pisco, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Diego Renato Vinueza Tapia M. Sc. -----

**DIRECTOR DE TESIS**

Leda. Karen Acosta León M. Sc. -----

**MIEMBRO DE TRIBUNAL**

**DOCUMENTALISTA** -----

**SISBIB ESPOCH**

**NOTA DE TESIS ESCRITA** -----

Yo, (Diego Alexander Monge Pisco), soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados  
expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la  
ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

-----  
**DIEGO ALEXANDER MONGE PISCO**

## DEDICATORIA

Dedico este presente Trabajo de Titulación al ser creador el cual ha depositado en mi existencia, su fortaleza y sabiduría, permitiéndome llegar a alcanzar las metas, objetivos y propósitos planteados en este proyecto de investigación.

A mis progenitores, por ser quienes han forjado en mí un espíritu luchador, con humildad y responsabilidad; a mi esposa e hijo por estar en cada instante y apoyándome en los momentos más difíciles en esta investigación; a mis hermanos por brindarme su apoyo incondicional; a mis suegros y familiares allegados por su colaboración en todo momento.

A mis amigos y compañeros por ser un soporte hasta el final.

Diego

## **A G R A D E C I M I E N T O**

Quiero agradecer en primera instancia al Dios Todopoderoso por darme la vida y haberme proporcionado la satisfacción de culminar mi carrera universitaria.

A nuestra casa de estudios Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por los saberes adquiridos.

A mi familia por ayudarme en cada instante de lucha en el desarrollo de mi carrera estudiantil, a mi esposa por ser un eje fundamental incondicional y a todos quienes de alguna manera han aportado un granito de arena en esta investigación.

Igualmente es gratificante el apoyo del B Q F. Diego Vinueza y Lcda. Karen Acosta por su cooperación y asesoramiento en la elaboración de este trabajo de investigación.

Diego

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	xi
<b>SUMMARY</b> .....	xii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO I</b> .....	3
1. <b>MARCO TEÓRICO</b> .....	3
1.1. <b>Diabetes</b> .....	3
1.1.1. <b>Complicaciones Crónicas</b> .....	3
1.1.1.1. <i>Retinopatías</i> .....	3
1.1.1.2. <i>Pie diabético</i> .....	4
1.1.1.3. <i>Hipertensión</i> .....	4
1.2. <b>Cicatrización</b> .....	5
1.2.1. <b>Procesos de cicatrización</b> .....	5
1.2.1.1. <i>Hemostasia - Fase aguda</i> .....	5
1.2.1.2. <i>Fase inflamatoria</i> .....	5
1.2.1.3. <i>Proliferativa o de Granulación</i> .....	6
1.2.1.4. <i>Fase de Epitelización</i> .....	6
1.2.1.5. <i>Fase de remodelación o de contracción</i> .....	6
1.3. <b>Cicatrización en pie diabético</b> .....	6
1.4. <i>Justicia chlorostachya</i> .....	7
1.4.1. <b>Composición Química y Actividad Farmacológica</b> .....	8
1.5. <i>Plectranthus amboinicus</i> .....	8
1.5.1. <b>Composición Química y Actividad Farmacológica</b> .....	9
1.6. <b>Hialuronidasa (EC 3.2.1.35)</b> .....	9
1.7. <b>Veneno de cobra (Naja naja)</b> .....	10
<b>CAPÍTULO II</b> .....	12
2. <b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	12
2.1. <b>Parte Experimental</b> .....	12
2.1.1. <i>Sitio de investigación</i> .....	12
2.1.2. <i>Materia prima</i> .....	12
2.1.3. <i>Materiales, equipos y reactivos</i> .....	12
2.1.3.1. <i>Materiales</i> .....	12
2.1.3.2. <i>Equipos</i> .....	13
2.1.3.3. <i>Reactivos</i> .....	13
2.2. <b>Técnicas</b> .....	14

2.2.1.	<i>Control de calidad de la materia prima</i> .....	14
2.2.1.1.	<i>Determinación de humedad</i> .....	14
2.4.1.2.	<i>Determinación de cenizas totales</i> .....	15
2.2.2.	<i>Ensayo fitoquímico</i> .....	16
2.2.2.1.	<i>Ensayo de Dragendorff</i> .....	16
2.2.2.2.	<i>Ensayo de Mayer</i> .....	16
2.2.2.3.	<i>Ensayo de Wagner</i> .....	17
2.2.2.4.	<i>Ensayo de Lieberman- Buchard</i> .....	17
2.2.2.5.	<i>Ensayo de Baljet</i> .....	17
2.2.2.6.	<i>Ensayo de Sudán III</i> .....	17
2.2.2.7.	<i>Ensayo de Borntrager</i> .....	17
2.2.2.8.	<i>Ensayo de catequina</i> .....	17
2.2.2.9.	<i>Ensayo de saponinas</i> .....	18
2.2.2.10.	<i>Ensayo de cloruro férrico</i> .....	18
2.2.2.11.	<i>Ensayo de Shinoda</i> .....	18
2.2.3.	<i>Preparación de los extractos de Justicia chlorostachya y Plectranthus amboinicus</i> .....	18 21
2.2.4.	<i>Determinación de la inhibición de hialuronidasa</i> .....	21
2.2.4.1.	<i>Inhibición de hialuronidasa</i> .....	21
2.2.4.2.	<i>Veneno de Cobra (Naja naja)</i> .....	23
<b>CAPÍTULO III</b>		<b>24</b>
3.	<b>MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
3.1.	<b>Resultados y discusiones</b> .....	<b>24</b>
3.1.1.	<i>Control de calidad de la materia prima</i> .....	24
3.1.2.	<i>Tamizaje fitoquímico</i> .....	25
3.1.3.	<i>Cromatografía en capa fina</i> .....	26
3.1.3.1.	<i>Cromatografías del extracto de Plectranthus amboinicus</i> .....	26
3.1.3.2.	<i>Cromatografías del extracto de Justicia chlorostachya</i> .....	27
3.1.4.	<i>Cuantificación de flavonoides totales</i> .....	27
3.1.5.	<i>Análisis del protocolo de inhibición de hialuronidasa</i> .....	28
<b>CONCLUSIONES</b> .....		<b>31</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....		<b>32</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		
<b>ANEXOS</b>		



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>g</b>	Gramos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>%</b>	Porcentaje
<b>S</b>	Segundo
<b>N</b>	Normalidad
<b>dL</b>	Decilitro
<b>M</b>	Moralidad
<b>°C</b>	Grados celsius
<b>P.a.</b>	<i>Plectranthus amboinicus</i>
<b>J.c.</b>	<i>Justicia chlorostachya</i>
<b>ADA</b>	Asociación Americana de la Diabetes
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b>mmol</b>	Milimol
<b>km</b>	Kilometro
<b>mg</b>	Miligramos
<b>MSP</b>	Ministerio de Salud Pública
<b>ug</b>	Microgramo
<b>uL</b>	Microlitro
<b>INEN</b>	Instituto Nacional de Normas Ecuatorianas

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°1-2	Esquema de tratamientos de acuerdo a cada especie vegetal para la inhibición de hialuronidasa... ..	22
TABLA N°2-2	Esquema de tratamientos de acuerdo a cada especie vegetal en la inhibición del veneno de cobra ( <i>Naja naja</i> )... ..	23
TABLA N°1-3	Control de calidad de las diferentes especies investigadas... ..	24
TABLA N°2-3	Tamizaje fitoquímico de los extractos de <i>Justicia chlorostachya</i> y <i>Plectranthus amboinicus</i> ... ..	25
TABLA N°3-3	Porcentaje de inhibición de hialuronidasa de los extractos metanólicos de <i>Plectranthus amboinicus</i> y <i>Justicia chlorostachya</i> ... .	28
TABLA N°4-3	Efecto de los extractos metanólicos de <i>Plectranthus amboinicus</i> y <i>Justicia chlorostachya</i> en la inhibición de hialuronidasa del veneno de cobra... ..	29

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO N°1-1</b>	Clasificación de los grados de severidad del pie diabético de acuerdo con la escala de Wagner.....	4
<b>CUADRO N°2-1</b>	Taxonomía de <i>Justicia chlorostachya</i> .....	7
<b>CUADRO N°3-1</b>	Taxonomía de <i>Plectranthus amboinicus</i> .....	8
<b>CUADRO N°1-3</b>	Rf de los compuestos obtenidos por cromatografía de capa fina del <i>Plectranthus amboinicus</i> .....	26
<b>CUADRO N°2-3</b>	Rf de los compuestos obtenidos por cromatografía de capa fina de <i>Justicia chlorostachya</i> .....	27

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA N°1-1</b>	Fórmula del ácido hialurónico...	10
<b>FIGURA N°1-2</b>	Diagrama de obtención de metabolitos secundarios...	16
<b>FIGURA N°2-2</b>	Diagrama de flujo para la obtención de extracto de <i>Justicia chlorostachya</i> ...	19
<b>FIGURA N°3-2</b>	Diagrama de flujo para obtención de extractos de <i>Plectranthus amboinicus</i> ...	20
<b>FIGURA N°1-3</b>	Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de <i>Plectranthus amboinicus</i> . Fase Móvil: tolueno: acetato de etilo forma progresiva (93:7)-(80:20)-(70:30)-(60-40)...	26
<b>FIGURA N°2-3</b>	Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de <i>Justicia chlorostachya</i> . Fase Móvil: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (100:11:11:26)...	27
<b>FIGURA N°3-3</b>	Curva de calibración de quercetina...	28
<b>FIGURA N°4-3</b>	Curva de Calibración de la actividad de los extractos metanólicos de <i>Plectranthus amboinicus</i> y <i>Justicia chlorostachya</i> en la inhibición de hialuronidasa del veneno de cobra ( <i>Naja naja</i> )...	30

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA N°1	Peso del crisol
FOTOGRAFÍA N°2	Peso del crisol con la muestra
FOTOGRAFÍA N°3	Método de extracción por soxhlet
FOTOGRAFÍA N°4	Concentración en rotavapor de orégano e insulina
FOTOGRAFÍA N°5	Blancos
FOTOGRAFÍA N°6	Hialuronidasa bovina
FOTOGRAFÍA N°7	Reactivos los ensayos
FOTOGRAFÍA N°8	Distintos tratamientos de las plantas analizadas
FOTOGRAFÍA N°9	Adición del DMSO 5%
FOTOGRAFÍA N°10	Adición del buffer
FOTOGRAFÍA N°11	Adición del CaCl <sub>2</sub>
FOTOGRAFÍA N°12	Adición del hialuronato de sodio
FOTOGRAFÍA N°13	Incubación de los tratamientos a 37°C
FOTOGRAFÍA N°14	Calentamiento
FOTOGRAFÍA N°15	Enfriamiento
FOTOGRAFÍA N°16	Medición de absorbancias

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A	Análisis de Humedad
ANEXO B	Extracción de las plantas <i>Plectranthus amboinicus</i> y <i>Justicia chlorostachya</i>
ANEXO C	Inhibición de hialuronidasa
ANEXO D	Determinación de absorbancias de los diferentes tratamientos de <i>Plectranthus amboinicus</i> y <i>Justicia chlorostachya</i>

## RESUMEN

Se determinó el efecto cicatrizante de los extractos metanólicos de *Plectranthus amboinicus* y *Justicia chlorostachya*, mediante los ensayos *in vitro* de inhibición de hialuronidasa y veneno de cobra (*Naja naja*), realizados en el Laboratorio de Fitofarmacia y Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Donde se utilizó distintos tratamientos por cada planta empleada, los cuales fueron: 0.005 g/mL - 0.01 g/mL y 0.02 g/mL de la parte flavónica de *Plectranthus amboinicus* y *Justicia chlorostachya* para los diferentes análisis. Se empleó un blanco negativo y un control donde se presentará la mayor actividad de los ensayos realizados. Los diferentes extractos se lograron mediante extracción por soxhlet y reflujo a partir de 50 gramos de la parte aérea seca de las distintas plantas utilizadas. Los resultados obtenidos en la inhibición de hialuronidasa fueron satisfactorios en los tratamientos con *Plectranthus amboinicus* con un 82.5% de inhibición en la dosis de 0.02 g/mL y con los tratamientos de *Justicia chlorostachya* en menor proporción. En los resultados conseguidos para la inhibición de veneno de cobra los tratamientos de *Plectranthus amboinicus* fueron satisfactorios en comparación con los tratamientos de *Justicia chlorostachya*. Se recomienda continuar con la investigación en el análisis de inhibición de hialuronidasa respecto a los extractos de *Justicia chlorostachya*, utilizando un método que permita medir de mejor maneja la cantidad de n-acetilglucosamina liberada.

**Palabras claves:** <INHIBICIÓN DE HIALURONIDASA IN VITRO> <INHIBICIÓN DE VENENO DE COBRA IN VITRO> <PLECTRANTHUS AMBOINICUS> <JUSTICIA CHLOROSTACHYA> <PIE DIABÉTICO> <CICATRIZACIÓN> <FLAVONOIDES>

## SUMMARY

The Healing Effect of Methanol Extract of *Plectranthus amboinicus* and *Justice chlorostachya* was determined by the in vitro inhibition of hyaluronidase and cobra venom (*Naja naja*), performed at the Laboratory of Phytopharmacy and Instrumental Analysis of the Sciences Faculty of The Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Where it was used different treatments for each plant used, which were: 0.005 g/mL - 0.01 g/mL and 0.02 g/mL of *Plectranthus amboinicus* flavonic part and *Justice chlorostachya* for different analysis. White and negative control was used where will be presented the main activity of the trials. The different extracts were obtained by soxhlet extraction and flow from 50 grams of the dried aerial part of the various plants used. The results obtained in the inhibiting hyaluronidase were satisfactory in *Plectranthus amboinicus* treatments with 82.5% inhibition at doses of 0.02 g/mL and with the *Justice chlorostachya* treatments lesser extent. In the obtained results for the inhibition of cobra venom the *Plectranthus amboinicus* treatments were satisfactory compared to the *Justice chlorostachya* treatments. It is recommended further research on the analysis of inhibition of hyaluronidase about the *Justice chlorostachya* extracts, using a method to better measure the amount of n-acetylglucosamine released.

**KEYWORDS:** <INHIBITION OF HYALURONIDASE IN VITRO> <INHIBITION OF COBRA VENOM IN VITRO> <PLECTRANTHUS AMBOINICUS> <JUSTICE CHLOROSTACHYA> <DIABETIC> <HEALING> <FLAVONOIDS>



## INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas como alternativa medicinal natural usada por los antepasados, ha sido de gran ayuda en el tratamiento de un sin número de enfermedades. Por ello, la entidad científica en la actualidad ha mostrado gran interés por este tipo de alternativa natural. (Prieto, S. et al. 2000. p. 28)

Este tipo de alternativa de origen natural constituye en países subdesarrollados un recurso valioso, aunque no se conoce con exactitud la extensión de la utilización a nivel global, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que cerca del 80% de la población mundial emplea las plantas como medicina natural, siendo usado los extractos o sus principios activos en los tratamientos medicinales. (Akerle, O. 1985. p. 1)

En la amazonia ecuatoriana existen poblaciones como los huorani los cuales desde tiempos ancestrales han utilizado las hojas machacadas o maceraciones de especies vegetales para curaciones tales como heridas, cortes, fracturas entre otras. (Aragadway, S.P. 2009. p. 20)

Dentro de las enfermedades crónicas que se encuentran en el Ecuador la Diabetes mellitus ha representado un problema de salud en la actualidad, siendo la primera causa de muerte en el país obteniéndose un registro de 4.695 muertes, con un porcentaje de 7,44% y una tasa de mortalidad de 29,76. (INEN, 2013. <http://ecuadorencifras.com>)

Cuando la diabetes no ha sido controlada o su estadio es de carácter crónico existen complicaciones como enfermedades de tipo vascular, inmunológicas y neurológicas. Todo esto conlleva al desarrollo de úlceras en el pie, produciendo gangrenas y en el peor de los casos la amputación del pie. La cicatrización de la herida es mucha más lenta en personas que padecen de pie diabético, debido a la carencia de factores de generación de queratinocitos y colágeno, sumado a la disminución de irrigación sanguínea en los miembros inferiores, lo cual hace incapaz la regeneración tisular. (Poretsky, L. 2008. p. 378)

Todo ello conlleva al desarrollo e investigación del uso de la medicina natural como alternativa curativa para aquellas personas que sufren de pie diabético.

El gasto en fármacos para la diabetes se ha duplicado en los últimos años en nuestro medio, debido a un claro desplazamiento de la prescripción hacia los nuevos fármacos, hecho que responde más a una estrategia de marketing que a ventajas clínicas reales. (Tamayo, M. 2014. p. 25)

Debido a esto, es menester encontrar nuevas alternativas de tipo vegetal que faciliten el proceso de cicatrización en pacientes que padecen de dicha patología, siendo asequible al usuario, en el Ecuador se encuentra un fármaco denominado trolamina el cual es utilizado para el tratamiento terapéutico de la cicatrización en el pie diabético, aunque es efectivo, su costo no es accesible para la población que padece de esta enfermedad, por poseer bajos recursos económicos. De igual forma ocurre con el factor de crecimiento epidérmico recombinante denominado Heberprot-P®, este fármaco permite un mejor progreso en el tratamiento de pie diabético, pero su costo es muy alto llegando alcanzar un valor de 6.857,35 dólares.

(MSP. 2013. <http://www.salud.gob.ec/dia-mundial-de-la-diabetes.html>)

Es así, que se opta por la utilización de especies vegetales como alternativa de tipo natural curativa como lo es la *Justicia chlorostachya* y *Plectranthus amboinicus*, cuyos componentes secundarios como compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas entre otros; permiten la regeneración celular y por ende la inhibición de compuestos que no permitan una mejor cicatrización en personas que padecen de pie diabético, además la inhibición de la enzima hialuronidasa nos permite obtener un método confiable y preciso, donde no se lleva a cabo la muerte del animal de experimentación al ser un método *in vitro*. (Prathiba, V., Gupta, P.D. 2000, p. 78)

Este tipo de investigación conlleva a un tratamiento de bajo costo, siendo una alternativa asequible para pacientes que sufren de pie diabético, ayudando a cumplir con el tratamiento sin llegar a la necrosis y por ende al amputamiento, además de aportar con el desarrollo de nuevas investigaciones nacionales, siendo la diabetes mellitus uno de los principales temas a tratar en cuanto a mayores datos de mortalidad en el Ecuador. (MSP. <http://www.salud.gob.ec/dia-mundial-de-la-diabetes.html>)

## CAPÍTULO I

### 1 MARCO TEÓRICO

#### 1.1 Diabetes

Es una enfermedad de carácter metabólico, proceso que transforma los alimentos en energía para el normal funcionamiento de nuestro cuerpo humano.

Cuando los niveles de glucosa 70-110 mg/dL en la sangre se encuentran por encima, se genera la diabetes, esto se debe a que una hormona llamada insulina provoca un fallo incrementando los niveles de glucosa en la sangre, en pacientes con esta enfermedad, se pueden observar dos tipos de fallas: (Balkan, B. 1991. p. 40)

- (Tipo I) La producción de insulina no existe o es baja.
- (Tipo II) La insulina producida no es utilizada correctamente por las células del cuerpo.

El diagnóstico y clasificación para la diabetes fueron desarrollados por La Asociación Americana de Diabetes (ADA) y el comité asesor de la Organización Mundial de la Salud (OMS), donde su clasificación esta mediada dependiendo de su etiología y características fisiopatológicas. (Figueroa, D. 2009. p. 1933)

##### 1.1.1 Complicaciones Crónicas

La diabetes al ser una enfermedad progresiva produce daños a otros sistemas, llegando incluso a la muerte en el paciente si no son tratados a tiempo. Entre las complicaciones más graves encontradas tenemos:

###### 1.1.1.1 Retinopatías:

La irrigación de los vasos sanguíneos que se produce en la córnea es deteriorada, generando oscurecimiento en la visión.

### 1.1.1.2 *Pie diabético:*

Se produce un pie diabético cuando existe un daño en los tejidos como consecuencia de la diabetes, provocando la úlcera en las extremidades inferiores llevando a infecciones, necrosis y en el peor de los casos el amputamiento de la parte afectada. Se incluye una hiperqueratosis provocando daño óseo a nivel del talón, originando una necrosis sin el debido cuidado, todo ello a la dificultad en el proceso de cicatrización en pacientes diabéticos. (Poretsky, L. 2008. p. 378), existe una clasificación de los distintos grados de severidad del pie diabético como se muestra en el Cuadro N°1.

**CUADRO N°1-1.** Clasificación de los grados de severidad del pie diabético de acuerdo con la escala de Wagner.

<b>Grado 0</b>	Pie en riesgo por presencia de enfermedad vascular periférica, neuropatía, deformidades ortopédicas, pérdida de la visión, nefropatía, edad avanzada
<b>Grado 1</b>	Úlcera superficial
<b>Grado 2</b>	Úlcera profunda que llega a tendón, ligamento, articulaciones y/o hueso
<b>Grado 3</b>	Infección localizada: celulitis, absceso, osteomielitis
<b>Grado 4</b>	Gangrena local
<b>Grado 5</b>	Gangrena extensa

Fuente: Asociación Latinoamericana de la Diabetes.

Entre los factores de riesgo como consecuencia de la asociación de uno o más a padecer de pie diabético tenemos:

- Neuropatía periférica
- Infección
- Enfermedad vascular periférica
- Trauma
- Alteraciones de la biomecánica del pie

### 1.1.1.3 *Hipertensión:*

La rigidez de las paredes de los vasos sanguíneos se produce debido a la acumulación de la cantidad de glucosa, logrando que la circulación del torrente sanguíneo sea más forzada, por consiguiente la presión sanguínea aumenta provocando la hipertensión acompañada de otros factores como malos hábitos alimenticios, sedentarismo, entre otros. (Tamayo, M. 2014. p. 25)

## **1.2 Cicatrización**

Es un proceso que se produce cuando existe una herida ya sea un corte, quemadura, o algún tipo de lesión, con el fin de regenerar los tejidos de la piel mediante células encargadas de la proliferación celular, donde se lleva a cabo un sin número de fenómenos químicos y físicos, mediada por proteínas solubles (citoquinas y factores de crecimiento). (Singer, A.J., Clark, R.A. 1999. p. 738)

### **1.2.1 Procesos de cicatrización**

Entre las fases o procesos a darse en una cicatrización encontramos a los siguientes:

#### **1.2.1.1 Hemostasia - Fase aguda:**

Cuando ocurre una lesión ya sea un corte o una herida se origina un daño a nivel de los vasos sanguíneos seguido de la pérdida de células, plasma y factores de intersticio. En esta fase intervienen los elementos celulares sanguíneos los cuales inician la coagulación por lo tanto se forma el tapó hemostático, donde actúan la cascada de los factores de coagulación y agregación plaquetaria. (Kirsner, R., Eaglstein, W. 1993. p. 653)

Dando lugar a la formación del coágulo, donde las plaquetas juegan un papel importante en la sintetización de factores de crecimiento los cuales estimulan la epitelización. (Shah, M., Ferguson, M.W.J. 1995. p. 108)

#### **1.2.1.2 Fase inflamatoria:**

Células inmunológicas como los neutrófilos migran a la herida, estos son atraídos por mecanismos quimiotácticos, como el factor que estimula granulocitos, macrófagos, entre otros, así llegando al aumento del complejo dimérico, facilitando a su vez la diapédesis. (Larjava, H., et al. 1993. p. 92)

Existe una fagocitosis de microorganismos que hayan ingresado a la herida, por medio de enzimas específicas y radicales libres de oxígeno, donde ciertos neutrófilos se disecan con el tapón hemostático y otros mueren. (Xu, J., Clark, R. 1996. p. 239)

Finalmente, los monocitos se transforman en macrófagos uniéndose a proteínas que se encuentran en la matriz extracelular, originando la fagocitosis. (Vaalamo, M., et al. 1997. p. 109)

#### **1.2.1.3 Proliferativa o de Granulación:**

En esta fase los fibroblastos son los encargados de la producción de la matriz dérmica, logrando llegar a la herida desde músculo, tendón, transportándose hacia la matriz laxa de fibronectina.

La falta de oxígeno en la lesión permite la liberación de factores de crecimiento los cuales estimulan la proliferación de dichos fibroblastos. (Detmar, M., et al. 1997. p. 108)

La matriz de colágeno se forma de la migración de los fibroblastos los cuales depositan fibronectina y ácido hialurónico. (Clark, R.A.F., et al. 1990. pp. 128-134)

Intervienen células periendotheliales e integrina las cuales ayudan en la estabilidad y formación de nuevos vasos sanguíneos. (Folkman, J. 1997. p. 79)

#### **1.2.1.4 Fase de Epitelización:**

Los queratinocitos cierran la herida migrando hacia los bordes de la herida, así esta puede ser cerrada, llegando a reestablecer la barrera cutánea. (Gabbiani, G., et al. 1978. p. 76)

#### **1.2.1.5 Fase de remodelación o de contracción:**

La fibronectina, ácido hialurónico, proteoglicanos y colágeno producidos por el fibroblasto intervienen en esta fase llegando a la reparación de la misma, además de ser soporte tisular, tanto el ácido hialurónico como la fibronectina son degradados por enzimas. (Toole, B.P. 1991. p. 305). Finalmente, la actividad celular se ve disminuida, tronándose el tejido conjuntivo rico en colágeno. La dermis alcanza un 70% de reparación de la lesión. (Machesney, M., et al. 1998. p. 152)

### **1.3 Cicatrización en pie diabético**

En los pies el proceso de cicatrización es mucho más lento debido a la limitación en la circulación. En pacientes que poseen pie diabético la cicatrización por lo general es mucho más lenta lo que no ocurre con personas que no posean dicha patología, por todo lo mencionado éstos pacientes han llegado a perder la parte afectada dada por la amputación que requiere dicha enfermedad. (Boyko, E.J., et al. 1999. p. 22)

En pacientes con pie diabético que dispongan de una ulcera se origina en primer lugar una fase inflamatoria, la cual es propensa a factores agresivos externos, como la disminución de la capacidad de liberación de factores de crecimiento, citosinas, calidad del estado de granulación, producción de colágeno, células de reparación y limpieza logrando el entorpecimiento de la reparación celular. Además, se suma la Microangiopatía diabética la cual reduce la capacidad de migración y reparación de los tejidos en el torrente sanguíneo, debido a la destrucción de los vasos sanguíneos dado por la diabetes. (Malay, D.S., et al. 2006. p. 45)

La epitelización se encuentra bloqueada por la carencia de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento de los queratinocitos, el de plaquetas y el tipo de insulina. Todo esto en conjunto favorece que el cierre de las lesiones sea en forma más lenta de lo deseable, que haya mayor susceptibilidad para desarrollar infecciones, ocasionado a su vez por la falta de respuesta de los neutrófilos. (Brem, H., et al. 2004. p. 87)

En conclusión, los inconvenientes al tratarse de cicatrización del pie diabético, son por la mala circulación sanguínea, sensibilidad nerviosa deteriora debido a neuropatías, lo que predispone a un sin número de anomalías locales, deficiente respuesta ante los microorganismos que causen una infección, disminución en la velocidad de reparación celular y la debilidad en los tejidos reparados en comparación a un tejido sano. (Armstrong, D.G., et al. 2004. p. 4)

#### 1.4 *Justicia chlorostachya*

**CUADRO N°2-1.** Taxonomía de *Justicia chlorostachya*.

Nombre Científico	<i>Justicia chlorostachya</i>
Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Scrophulariales
Familia	Acanthaceae
Género	Justicia
Epíteto Específico	Chlorostachya
Autor Epíteto Específico	Leonard

Fuente: Instituto de Ciencias Naturales UNAL, 2007.

Es conocida como insulina vegetal en la amazonia ecuatoriana, sus hojas tienen forma ovalada, nervios detallados y flores que van de tono rosa a naranja. Ha sido utilizada por poblaciones prehispánicas para tratar problemas de disentería, además de poseer propiedades alucinógenas,

sin descartar como tratamiento para desórdenes de tipo diabético. (Poretsky, L. 2008. p. 378) En dosis bajas se la emplea en anemia e incluso para fortificar el sistema inmune. (Blacpma, 2001. p. 95)

#### 1.4.1 *Composición Química y Actividad Farmacológica*

Posee propiedades anticonceptivas, antiarrítmicas y antidepresivas atribuibles a compuestos como las saponinas y lignanos. Existe también esteroides, aceites esenciales y mucílagos. (Stojanonska, L. 2005. p. 748)

Es utilizada en forma de cocción para enfermedades de carácter pulmonar como neumonías. (BLACPMA, 2001. p. 95) Sin descartar el empleo de esta especie vegetal en tratamientos como la diabetes llegando a formar un ente de atención en los últimos tiempos, por ello el nombre de insulina vegetal. (Pazmiño, C.O. 2011. p. 26)

#### 1.5 *Plectranthus amboinicus*

CUADRO N°3-1. Taxonomía de *Plectranthus amboinicus*.

Nombre Científico	<i>Plectranthus amboinicus</i>
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Subfamilia	Nepetoideae
Género	<i>Plectranthus</i>
Epíteto Específico	<i>Plectranthus amboinicus</i>

Fuente: Instituto de Ciencias Naturales UNAL, 2007.

Es una especie vegetal introducida en el Ecuador por los colonos, oriunda de Cuba, encontrada en continentes como Asia, África y América Latina. Tiene forma de arbusto con una altura de 1 metro, de hojas considerable, con vellosidades en toda su superficie y tallo delgado, carece de flores. Su aroma es característico por ello lleva el nombre común. Aplicada para curar dolencias como trastornos estomacales, expectorante, además de poseer propiedades cicatrizantes. (Menéndez, R. 1999. p. 110)



### 1.5.1 *Composición Química y Actividad Farmacológica*

En hojas y tallos se han realizado ensayos fitoquímicos con etanol al 30% evidenciando la presencia de aceites esencial, azúcares reductores, ácidos triterpénicos y flavonoides. (Timor, C. 1991. p. 63)

El carvacrol es un componente secundario que se encuentra principalmente en el aceite esencial de *Plectranthus amboinicus*, atribuyéndosele actividad antimicrobiana y antiinfecciosa. Existen metabolitos que se les atribuye propiedades curativas en resfriados, como broncodilatadores, en asma, dolores cefálicos, antiinfeccioso y anticonvulsivante. (Roig, J.T. 1974. p. 693)

Entre los componentes flavónicos tenemos: apogenina, luteolina, quercetina, taxifolina en su mayoría sin descartar crisoeriol, cirsimaritina, salvigenina. (Brieskorn, CH. 1979. p. 90)

### 1.6 **Hialuronidasa (Ec 3.2.1.35)**

Esta enzima posee una fórmula química indecifrable, siendo un fermento, se la ha denominado bajo el nombre de factor de difusión o spreading. (Wang, H.J. et al. 2002. p. 22)

Se encuentra en un sin número de sitios del organismo humano, animales y en los extractos de los diferentes órganos situados en el propio organismo como, hígado, cerebro, útero, placenta permitiendo la desintegración del ácido hialurónico por parte de la hialuronidasa. Encontrándose en mayor proporción en los testículos de mamíferos, en especial en el semen, ya que los espermatozoides al querer fecundar el óvulo, estos necesitan disolver la cubierta de este y así permitir la penetración, proceso mediante el cual se segrega esta enzima. (García Ludeña, J.L. 1958. p. 348)

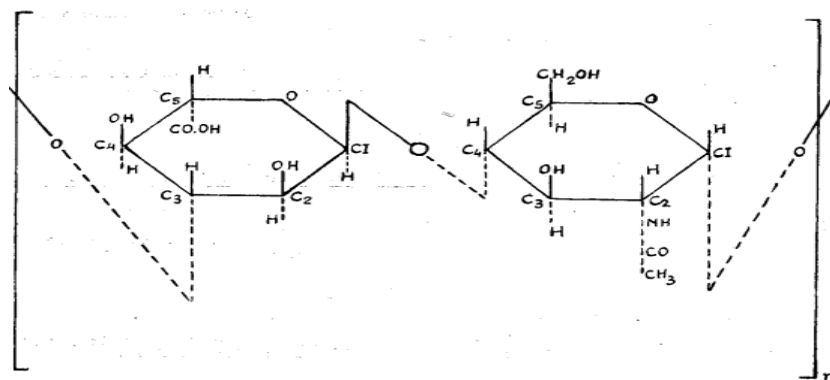
De los animales a encontrar la hialuronidasa se halla en los venenos de serpientes, en especial de los vipéridos, insectos, arañas, moluscos, entre otros, sin dejar a un lado su presencia en bacterias tales como estafilococo, neumococo, *Clostridium spp*, los más destacados, siendo los causantes de infecciones generalizadas ya que al poseer esta enzima esta permite la degradación del ácido hialurónico y por ende permiten que la permeabilidad de la matriz extracelular se ve afectada logrando así su proliferación al organismo. (García Ludeña, J.L. 1958. p. 348)

Su obtención se da por extracción de testículos bovinos, seguida de una purificación, al ser una enzima se degrada a condiciones de temperaturas altas (57°C) y pH <4 y >7.5. Inactivada por

rayos X, luz ultravioleta, especies químicas como el yodo, formol entre otras, insoluble en alcohol y soluble en agua. (Stanley, J. 1976. p. 409)

Dentro de los componentes que constituyen la matriz extracelular en tejidos de animales se encuentra el ácido hialurónico de alto peso molecular que al ser degradado por la enzima hialuronidasa se descompone en fragmentos de bajo peso molecular, rompiendo los enlaces glucosamínicos entre el carbono 1 de la porción glucosamina y el carbono 4 del ácido hialurónico, hecho que ocurre en condiciones inflamatorias. (Wang, H.J. et al. 2002. p. 22)

FIGURA N°1-1. Fórmula del ácido hialurónico



Fuente: Meyer, K.H. y Felling, J. 1950. p. 345

Al ser un mucopolisacárido el ácido hialurónico se encuentra estrechamente relacionado con la permeabilidad del sistema de irrigación siendo corresponsable de procesos inflamatorios y alérgicos. (Kakegawa, H. 1985. p. 33)

Cuando un tejido sufre un daño, este es propenso a padecer de alguna infección, la inflamación previene que esto suceda. (Guyton, A. 1974. p. 156) En la lesión provocada por algún agente químico-físico infeccioso, se liberan sustancias mediadoras como prostaglandinas, histamina, bradiquinina y serotonina. (García Ludeña, J.L. 1958. p. 348) Produciendo un incremento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos y por ende su dilatación. (Stanley, J. 1976. p. 409)

### 1.7 Veneno de cobra (*Naja naja*)

Se conocen cerca de 300 especies de serpientes venenosas, entre las cuales encontramos a la cobra de anteojos (*Naja naja*) perteneciente a la familia de las Elapidae, este tipo de familia posee un veneno con una potente neurotoxina, la cual actúa en la parálisis de los músculos y posterior paro cardiorespiratorio. Los componentes que se encuentran en el veneno de cobra están formados por polipéptidos que incluyen toxinas, péptidos y unas 20 enzimas distintas,

como la hialuronidasa generando lisis y aumentando la propagación del veneno en la presa.

(Karalliedde, L. 1995. p. 74)

Existen dos tipos de mecanismos en el cuadro neurotóxico, el presináptico es producido por alfa-neurotoxinas, que se caracterizan por el bloqueamiento de los canales de potasio de la porción terminal o por beta-neurotoxinas las cuales vacían las vesículas de acetilcolina, estas originan un estadio inicial, llegando a la parálisis facial, el bloqueo irreversible del receptor nicotínico formado por las alfa y k-neurotoxinas corresponde al postsináptico provocando la muerte del ser vivo. (Tsetlin, V., Hucho, F. 2004. p. 557)

## CAPITULO II

### 2 MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1 Parte Experimental

##### 2.1.1 Sitio De Investigación

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitofarmacia y Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo ubicada en la Panamericana Sur, km 1 ½ correspondiente a la ciudad de Riobamba, Provincia de Chimborazo.

##### 2.1.2 Materia Prima

La recolección de las hojas de insulina vegetal (*Justicia chlorostachya*) se la realizó en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, parroquia Alluriquín, barrio San Miguel Km. 24 vía Quito, con una temperatura constante de 23°C, de humedad 75% y por consiguiente también se realizó la recolección de las hojas del orégano orejón (*Plectranthus amboinicus*) en la misma provincia, parroquia Santo Domingo, barrio la aurora, a una temperatura constante de 23°C, de humedad de 75%. Posteriormente se realizó el secado de los dos tipos de especies vegetales en una estufa a una temperatura de 65°C por 72 horas, seguido de su respectiva trituración para los diferentes análisis físico-químicos.

##### 2.1.3 Materiales, reactivos y equipos

###### 2.1.3.1 Materiales

- Vasos de precipitación de 50mL, 250mL y 500mL
- Espátula
- Balones aforados de 10mL, 25mL, 50mL y 100mL
- Refrigerante de bolas
- Mangueras
- Pinzas para soporte universal
- Pinzas para cápsula de porcelana
- Tubos de ensayo
- Gradillas

- Cápsulas de porcelana
- Balones esmerilados de 250 y 500 mL
- Pipetas automáticas graduada de 1uL -1000uL
- Extractor soxhlet
- Frascos color ámbar
- Jeringuillas de 3mL
- Puntas amarillas y azules
- Papel filtro
- Embudo de separación
- Embudo
- Guantes de manejo
- Mascarillas descartables
- Pinzas para tubos
- Pera de succión
- Matraces
- Papel aluminio
- Probetas

#### 2.1.3.2 *Equipos*

- Estufa
- Reverbero
- Agitador
- Mufla
- Balanza analítica
- pH-metro
- Centrifuga
- Desecador
- Rotavapor
- Bomba al vacío
- Espectrofotómetro UV Helios-  $\beta$

#### 2.1.3.3 *Reactivos*

- Agua destilada y bidestilada
- Metanol

- Etanol
- Dimetilsulfóxido 5%
- Cloruro de calcio 12.5mM
- Acetato de etilo
- Ácido clorhídrico 10N y 1%
- Acetato de sodio 0.1M y 0.2M
- Hidróxido de sodio 0.4M
- Ácido acético 0.1M y 0.2M
- Borato de sodio 0.2M
- Cloruro de sodio 0.9% 0.15M
- p-dimetilaminobenzaldehído
- hialuronidasa bovina (7900 unidades/mL)
- hialuronato de sodio
- ácido hialurónico
- veneno de cobra
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Mayer
- Cloruro férrico 5%
- Magnesio metálico
- Reactivo de Baljet
- Reactivo de Fehling
- Alcohol amílico
- Anhídrido acético
- Cloruro de sodio polvo
- Solución de ninhidrina 5%

## 2.2 Técnicas

### 2.2.1 Control de calidad de la materia prima

#### 2.2.1.1 Determinación de humedad

Se realiza mediante método gravimétrico, se toma 2g de muestra y se añade a la cápsula de porcelana debe estar tarada por 3 horas a 37°C, por consiguiente se procede a someter la muestra por 3 horas en la estufa a 105°C con el fin de eliminar el agua que se encuentra en la

muestra. Luego se coloca en un desecador hasta que se enfríe la muestra para su posterior peso en la balanza analítica, obteniéndose un peso constante. (Miranda, Martha. 1992. p. 32)

**Cálculo:**

$$\% \text{ H u m e d a d } = \frac{(M_2 - M_1)}{(M_1 - M)} \times 100$$

D ó n d e:

$M_2$  = peso de la cápsula con la muestra

$M_1$  = peso de la cápsula con la muestra desecada

$M$  = peso de la cápsula vacía tarada

#### 2.2.1.2 *Determinación de cenizas totales*

Se lo realiza mediante método gravimétrico, se toma 2g de la muestra y se coloca se un crisol tarado previamente, antes se somete a carbonizar la muestra permitiendo la eliminación de todo residuo orgánico, seguido se coloca en la mufla por 2 horas a una temperatura de 600°C, llegando a obtener un polvo de color blanquecino, se enfría transcurrido una vez que transcurra el tiempo esperado y se pesa hasta valor constante. (Miranda, Martha. 1992. p. 32)

**Cálculo:**

$$\% \text{ C e n i z a s } = \frac{(M_2 - M_1)}{(M_1 - M)} \times 100$$

D ó n d e:

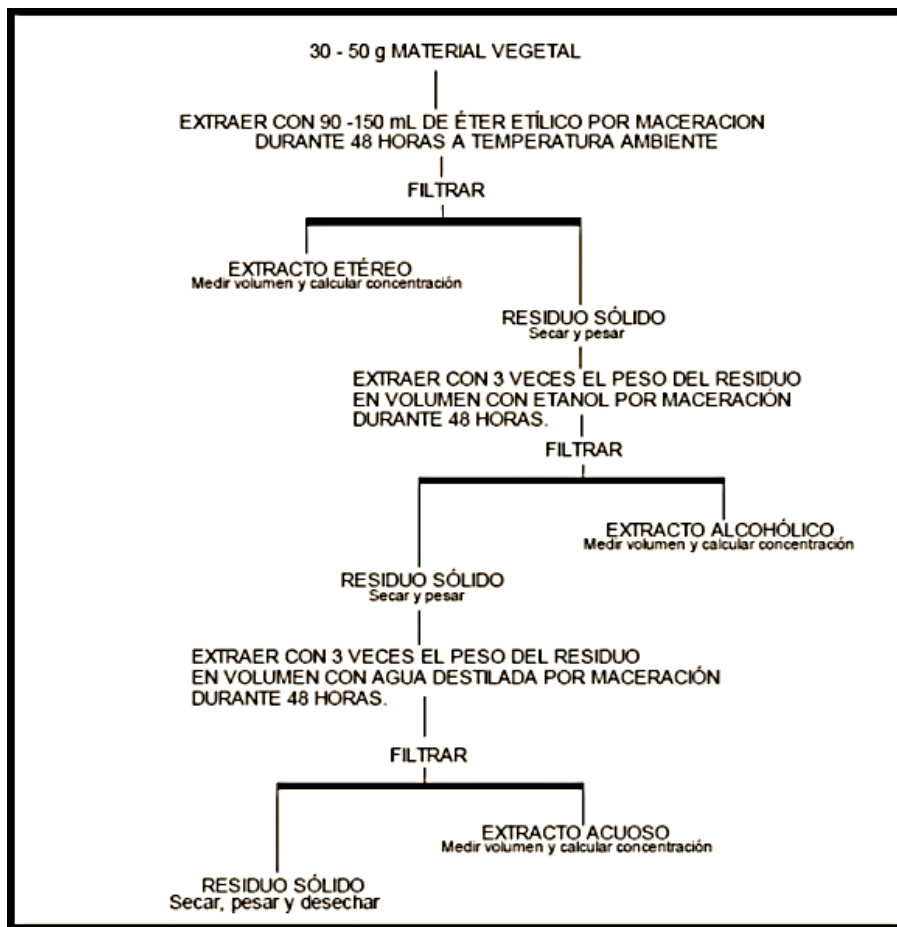
$M_2$  = peso del crisol con la ceniza

$M_1$  = peso del crisol con la muestra

$M$  = peso del crisol vacío

### 2.2.2 Ensayo fitoquímico

FIGURA N°1-2. Diagrama de obtención de metabolitos secundarios.



Fuente: MIRANDA, M. Farmacognosia y productos naturales, 2011. p. 62

#### 2.2.2.1 Ensayo de Dragendorff

Este ensayo sirve para evidenciar la presencia de alcaloides. La muestra una vez seca se procede a disolver en ácido clorhídrico 1%, se calienta paulatinamente y se enfría, a continuación se añade 3 gotas del reactivo de Dragendorff y se agita vigorosamente, los resultados pueden ser (+) opalescencia, (++) turbidez definida, (+++) precipitado. (Miranda, M. 2006. p. 39)

#### 2.2.2.2 Ensayo de Mayer

Al igual que el ensayo anterior nos sirve para observar la presencia de alcaloides, procede de igual manera se añade 1 gota de cloruro de sodio en polvo, a continuación se agita y se filtra, se agrega 3 gotas del reactivo en cuestión, e igual se observa: (+) opalescencia, (++) turbidez definida, (+++) precipitado. (Miranda, M. 2006. p. 39)



#### 2.2.2.3 *Ensayo de Wagner*

Igual al método de Dragendorff, se añade 2 gotas del reactivo de Wagner y se observa el mismo reporte que los anteriores mencionados. (Miranda, M. 2006. p. 39)

#### 2.2.2.4 *Ensayo de Lieberman- Buchard*

Se puede evidenciar la presencia de componentes de tipo terpénicos. La muestra es evaporada y se disuelve en cloroformo, seguido de la adición de 1 mL de anhídrido acético para su posterior homogenización. Las coloraciones reportadas pueden ser: rosado- azul muy rápido, verde intenso- visible medio rápido, verde oscuro- negro, final de la reacción. (Miranda, M. 2006. p. 39)

#### 2.2.2.5 *Ensayo de Baljet*

Este método sirve para determinar la presencia de componentes cumarínicos. Se seca la muestra y se disuelve en etanol, se añade 1 mL del reactivo de Baljet y se reporta rojo si es positivo. (Miranda, M. 2006. p. 39)

#### 2.2.2.6 *Ensayo de Sudán III*

A 1 mL de la muestra se le agrega 1 mL del reactivo de Sudán III, se somete a baño María hasta que el solvente se evapore. La presencia de gotitas grasas o una película roja indica componentes grasos. (Miranda, M. 2006. p. 39)

#### 2.2.2.7 *Ensayo de Borntrager*

Sirve para determinar la aparición de quinonas. La muestra se seca y se disuelve en 1 mL de cloroformo, se añade 1 mL de cal sodada al 5%, si el color cambia de rosado a rojo la reacción es positiva. (Miranda, M. 2006. p. 39)

#### 2.2.2.8 *Ensayo de catequina*

En un capilar la muestra es llenada, se coloca una gota en papel filtro, y se añade carbonato de sodio, el color verde brillante indica que la reacción es positiva para determinación de catequina. (Miranda, M. 2006. p. 39)

#### **2.2.2.9** *Ensayo de saponinas*

Se somete a dilución la muestra hasta cinco veces su volumen es decir si se toma 1mL del extracto se debería diluir 5mL con la dilución, se agita y se observa, la aparición de espuma por más de 2 minutos indica que la reacción es positiva. (Miranda, M. 2006. p. 39)

#### **2.2.2.10** *Ensayo de cloruro férrico*

Se añade unas gotas de tricloruro férrico 5% a la muestra, el color rojo indica que existen componentes fenólicos. (Miranda, M. 2006. p. 39)

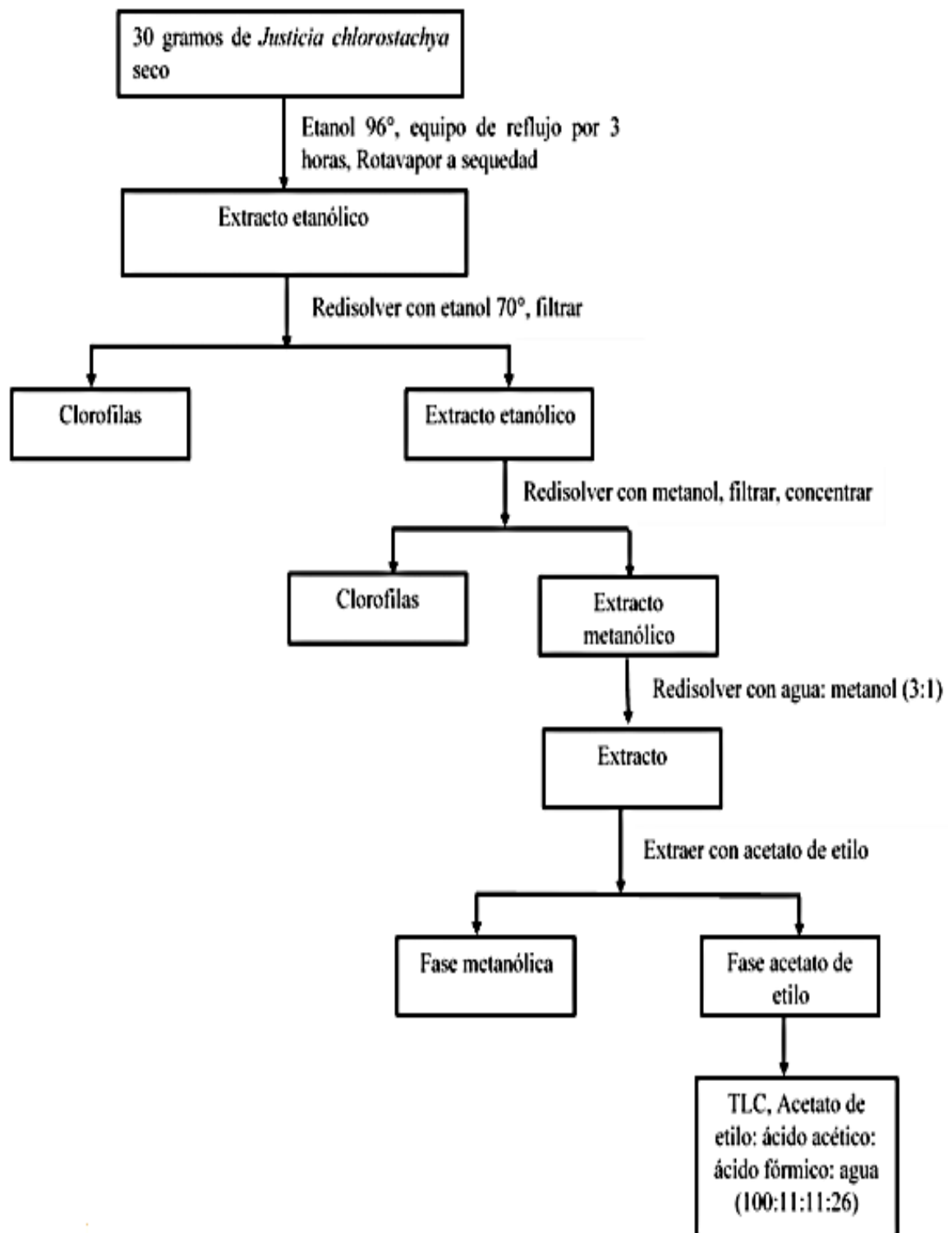
#### **2.2.2.11** *Ensayo de Shinoda*

1mL de ácido clorhídrico es añadido al extracto, se coloca cinta de magnesio, se espera un lapso de cinco minutos y se añade 1mL de alcohol amílico, se agita y reposa la muestra. En este ensayo se evidencia dos fases la una es alcohólica donde los colores pueden aparecer tanto amarillo, como naranja y rojo intenso, esta coloración es característicos de compuestos flavónicos. (Miranda, M. 2006. p. 39)

#### **2.2.3** *Preparación de los extractos de Justicia chlorostachya y Plectranthus amboinicus*

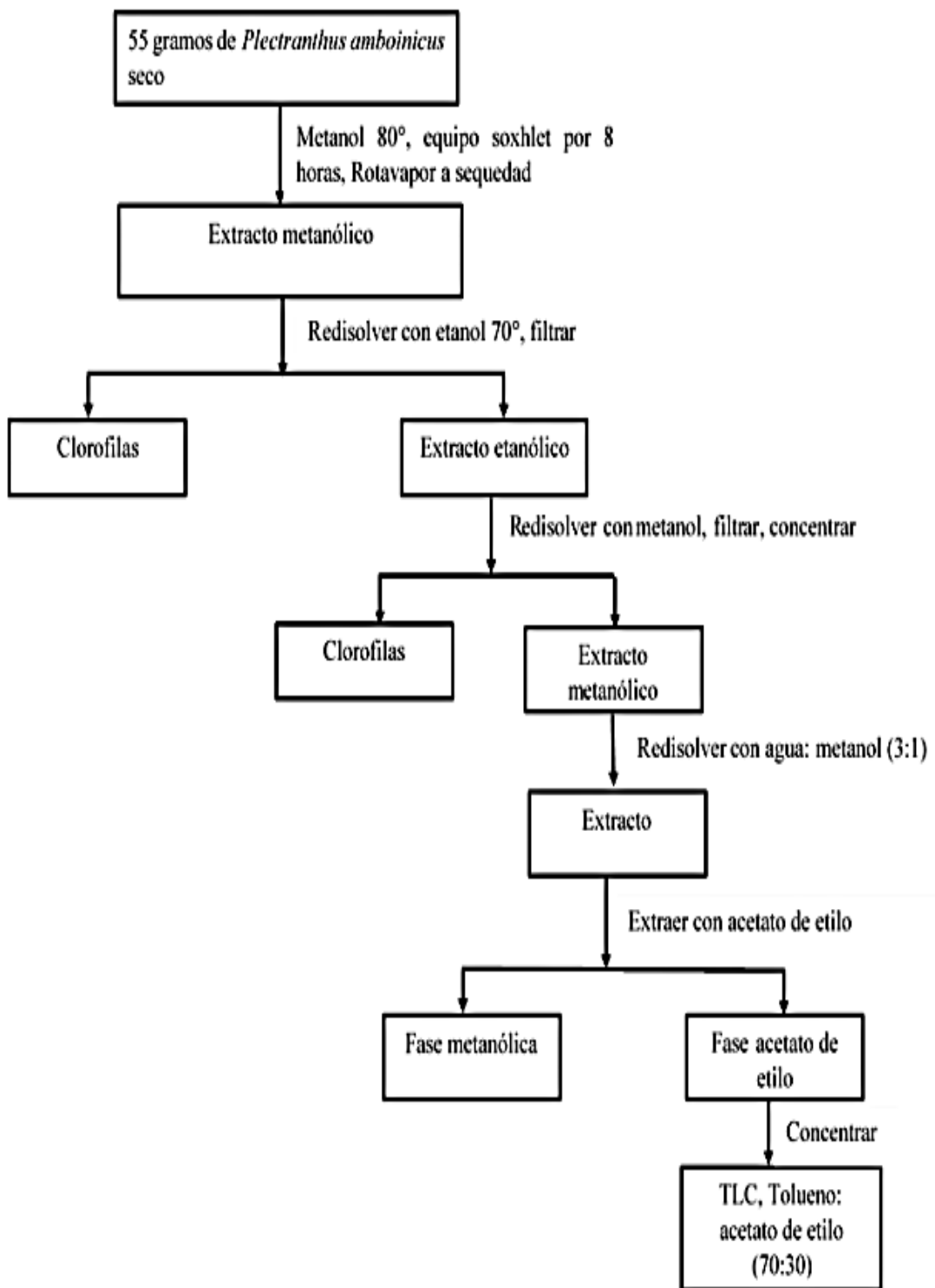
Se realiza la elaboración de los extractos de las plantas de acuerdo a los siguientes diagramas de flujo, teniendo en consideración que la parte aérea es la utilizada para los fines deseados.

FIGURA N°2-2. Diagrama de flujo para la obtención de extracto de *Justicia chlorostachya*.



Fuente: MONGE, Diego. 2015

FIGURA N°3-2. Diagrama de flujo para obtención de extractos de *Plectranthus amboinicus*



Fuente: MONGE, Diego. 2015

#### 2.2.4 *Determinación de la inhibición de hialuronidasa.*

Para la evaluación de la actividad inhibitoria de la hialuronidasa se utilizarán dos estudios:

##### 2.2.4.1 *Inhibición de hialuronidasa*

Para la medición de la cantidad de N-acetilglucosamina liberada del hialuronato de sodio se realizan los siguientes pasos:

- Tomar 50 uL de hialuronidasa bovina, la cual es disuelta en buffer acetato 0,1 M (pH=3.6).
- La solución es mezclada con 50 uL de los fracciones flavónicas en diferentes concentraciones de 0.005g/mL, 0.01g/mL y 0.02g/mL de cada tipo de especie vegetal disueltos en dimetilsulfóxido al 5%. El grupo control fue tratado con 50 uL al 5% de dimetilsulfóxido. Esta mezcla se somete a incubación a por 20 minutos a 37°C, transcurrido ese tiempo luego se agrega 50 uL de cloruro de calcio (12,5 mM) para activar la enzima y se deja incubar por 20 minutos más a la misma temperatura.
- Al término del tiempo se agrega 250 uL de hialuronato de sodio (1,2 mg/mL) y se incuba durante 40 minutos más a 37°C. Luego de la incubación la mezcla es tratada con 50 uL de NaOH 0,4 M y de 100 uL 0.2M de borato de sodio, sometida la mezcla por 3 minutos en un baño de agua hirviendo, se deja enfriar y posteriormente se agrega 1,5 mL de p-dimetilaminobenzaldehido (4g de p-dimetilaminobenzaldehido fueron disueltos en 50 mL de HCl 10N con 350 mL de ácido acético glacial) y se incuba por 20 minutos a 37°C hasta desarrollar color. La absorbancia es medida a 585 nm en un espectrofotómetro, midiendo la cantidad de N-acetilglucosamina liberada (Shasrabudhe, A., Deodhar, M. 2010. p. 299)

Expresándose este efector inhibitor de la siguiente manera:

$$\text{Inhibición (\%)} = \left( \frac{\text{O.D control} - \text{O.D muestra}}{\text{O.D control}} \right) \times 100$$

TABLE N°1-2. Esquema de tratamientos de acuerdo a cada especie vegetal para la inhibición de hialuronidasa.

TRATAMIENTOS	REACTIVOS					
	Buffer pH:3.6	Hialuro nidasa	CaCl <sub>2</sub> 12.5mM	Hialuro nato de sodio	NaOH 0.4M y Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> 0.2M	p-DMAB
BLANCO	X		X		X	X
CONTROL MAXIMA ACTIVIDAD		X	X	X	X	X
<i>Plectranthus amboinicus</i> (0.005g/mL) extracto flavónico		X	X	X	X	X
<i>Plectranthus amboinicus</i> (0.01g/mL) extracto flavónico		X	X	X	X	X
<i>Plectranthus amboinicus</i> (0.02g/mL) extracto flavónico		X	X	X	X	X
<i>Justicia chlorostachya</i> (0.005g/mL) extracto flavónico		X	X	X	X	X
<i>Justicia chlorostachya</i> (0.01g/mL) extracto flavónico		X	X	X	X	X
<i>Justicia chlorostachya</i> (0.02g/mL) extracto flavónico		X	X	X	X	X

Fuente: MONGE, Diego. 2015

2.2.4.2 Veneno de Cobra (*Naja naja*)

- 100 ug de veneno de cobra fueron disueltos en 20 uL de solución salina e incubado a 37°C con 50 ug de ácido hialurónico en 250 uL (0.2 M) disuelta en buffer acetato (pH 5.0) contenidos en 0.15 N de cloruro de sodio. La absorbancia de dicha mezcla fue medida a 585 nm.
- Las fracciones flavónicas de cada tipo de planta han sido disueltas como en la técnica anterior, es decir en dimetilsulfóxido al 5%, para su posterior ensayo. La actividad es expresada como n moles de N-acetylglucosamina liberada/minuto/mg de proteína. (Machiad, D. et al. 2006. p. 158)

**TABLA N°2-2.** Esquema de tratamientos de acuerdo a cada especie vegetal en la inhibición del veneno de cobra (*Naja naja*).

TRATAMIENTOS	REACTIVOS		
	Buffer pH:5.0	Veneno de cobra	Ácido hialurónico
BLANCO	X		
CONTROL MÁXIMA ACTIVIDAD		X	X
<i>Plectranthusamboinicus</i> (0.005g/mL) extracto flavónico		X	X
<i>Plectranthusamboinicus</i> (0.01g/mL) extracto flavónico		X	X
<i>Plectranthusamboinicus</i> (0.02g/mL) extracto flavónico		X	X
<i>Justicia chlorostachya</i> (0.005g/mL) extracto flavónico		X	X
<i>Justicia chlorostachya</i> (0.01g/mL) extracto flavónico		X	X
( <i>Justicia chlorostachya</i> (0.02g/mL) extracto flavónico		X	X

Fuente: MONGE, Diego. 2015

### CAPITULO III

## 3 MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 3.1 Resultados y Discusiones

#### 3.1.1 Control de calidad de la materia prima

Se tomó como referencia la Guía de Farmacognosia y Productos Naturales y en base a las Normas Ramales para Drogas crudas, extractos y tinturas. (NRSP 309, 311 y 312) para la obtención de los extractos a investigar. Tomando en cuenta las determinadas antes ya descritas. A continuación se presentan los resultados obtenidos:

TABLA N° 1-3. Control de calidad de las diferentes especiales investigadas.

ANÁLISIS EFECTUADOS	<i>Justicia chlorostachya</i>	<i>Plectranthus amboinicus</i>	Rangos dentro del límite a aceptar (Real Farmacopea Española 2002)
CENIZAS (%)	4.5 %	4 %	5 %
HUMEDAD (%)	13.2 %	11 %	14 %

Fuente: MONGE, Diego. 2015

En la Tabla N° 1-3 podemos observar que el porcentaje de humedad para *Justicia chlorostachya* fue el de 13.2% y para *Plectranthus amboinicus* fue de 11%, valores que se encuentran dentro de lo establecido o normado por la Real Farmacopea Española (2002). También podemos evidenciar que el porcentaje de cenizas totales fue de 4.5% y 4% correspondiente a *Justicia chlorostachya* y *Plectranthus amboinicus* respectivamente, datos acorde a los establecido por el ente regulador.

A todo ello, podemos decir que los valores tanto de humedad como los de cenizas totales obtenidos en los diferentes análisis de las diferentes plantas se encuentran dentro de los límites permitidos, presentando proporciones relativamente bajas en lo referente a minerales, los cuales no producirían impedimento en la preparación de los extractos a obtener. (Brunenton, J. 2001. p. 59)



### 3.1.2 Tamizaje Fitoquímico

Tomando como referencia la bibliografía (Miranda, M. 2006. p.39) se realizó el análisis fitoquímico.

Los resultados alcanzados fueron los siguientes:

**TABLA N°2-3.** Tamizaje fitoquímico de los extractos de *Justicia chlorostachya*. Y *Plectranthus amboinicus*.

Método realizado	Resultado <i>Justicia chlorostachya</i>	Resultado <i>Plectranthus amboinicus</i>	Compuestos identificados
Dragendorff	-	-	Alcaloides
Mayer	-	-	Alcaloides
Wagner	-	-	Alcaloides
Lieberman-Buchard	-	-	Compuestos terpénicos
Baljet	-	++	Cumarinas
Sudan III	+	+	Grasas
Borntrager	++	++	Quinonas
Catequina	+	+	Catequinas
Antocianidinas	+++	++	Antocianidinas
Espuma	-	-	Saponinas
Tricloruro férrico	+++	+++	Compuestos fenólicos
Shinoda	+++	+++	Flavonoides
Resinas	-	+	Resinas
Fehling	-	+	Azúcares reductores

Dónde: (+) opalescencia, (++) turbidez definida, (+++) precipitado

Fuente: MONGE, Diego 2015.

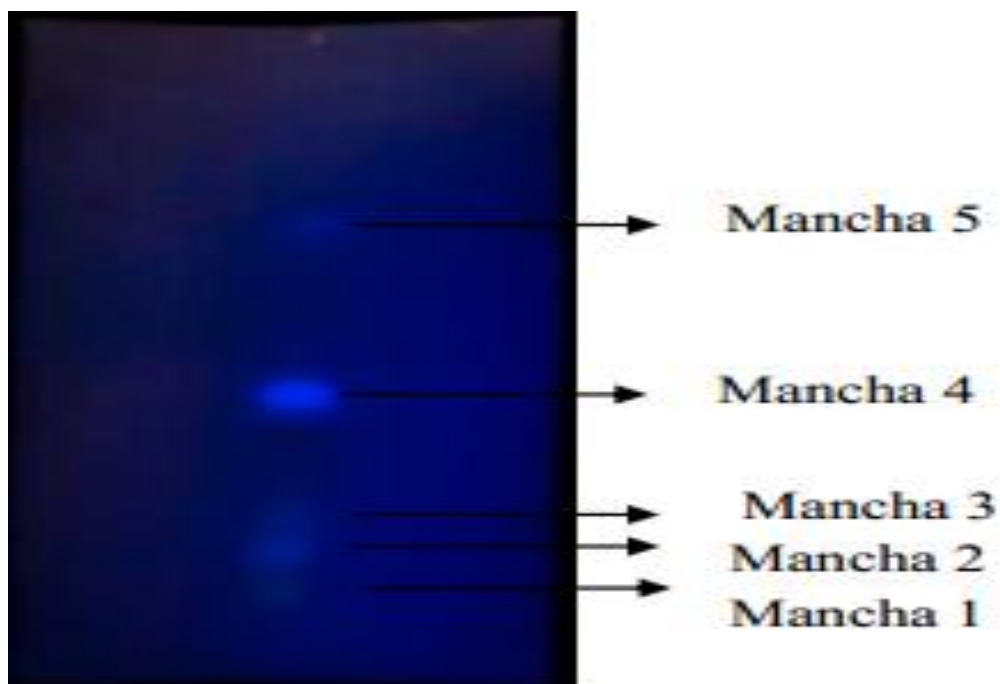
En la Tabla N° 2-3 se puede observar claramente que los compuestos secundarios en mayor cantidad son: quinonas, catequinas, antocianidinas, componentes fenólicos, flavonoides, en ambas especies vegetales, hecho que da a entender el posible efecto inhibitorio de la hialuronidasa y veneno de cobra, por parte de estas sustancias de carácter fenólico. (Timor, C. 1991. p. 63) Es así que al encontrarse en su mayoría compuestos flavónicos, la presente investigación se la realiza con este tipo de componentes.

### 3.1.3 Cromatografías en capa fina

#### 3.1.3.1 Cromatografías del extracto de *Plectranthus amboinicus*

Se realizaron los respectivos ensayos de cromatografías utilizando los siguientes solventes, tolueno: acetato de etilo (93:7), tolueno: acetato de etilo (80:20), tolueno: acetato de etilo (70:30), y finalmente con tolueno: acetato de etilo (60:40), este último ensayo es donde se evidencia cinco manchas visibles a la luz ultravioleta.

**FIGURA N°. 1-3.** Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de *P.a.* Fase Móvil: tolueno: acetato de etilo forma progresiva (93:7)-(80:20)-(70:30)-(60-40).



Fuente: MONGE, Diego. 2015

**CUADRO N°1-3.** Rf de los compuestos obtenidos por cromatografía de capa fina del *Plectranthus amboinicus*

COMPONENTE	Rf
Mancha 1	0,05
Mancha 2	0,12
Mancha 3	0,47
Mancha 4	0,80
Mancha 5	0,83

Fuente: MONGE, Diego 2015.

### 3.1.3.2 Cromatografías del extracto de *Justicia chlorostachya*.

Se utilizaron los siguientes solventes: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (100:11:11:26). Posteriormente, se obtuvieron cuatro manchas las cuales fueron visible a la luz ultravioleta.

**FIGURA N°2-3.** Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de *Justicia chlorostachya*. Fase Móvil: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (100:11:11:26)



Fuente: MONGE, Diego. 2015.

**CUADRO N°2-3.** Rf de los compuestos obtenidos por cromatografía de capa fina de *Justicia chlorostachya*.

COMPONENTE	Rf
Mancha 1	0,25
Mancha 2	0,35
Mancha 3	0,80
Mancha 4	0,90

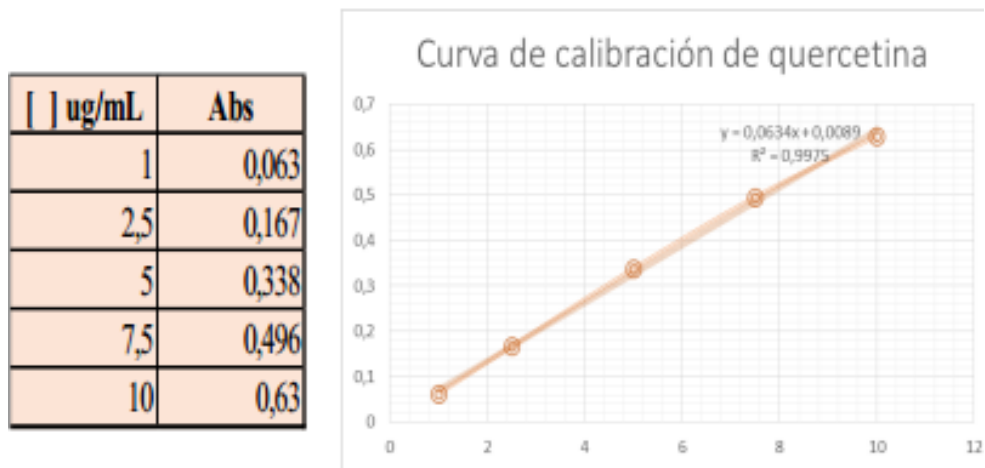
Fuente: MONGE, Diego. 2015.

### 3.1.4 Cuantificación de Flavonoides Totales

Se utilizó como estándar quercetina, para cuantificar los flavonoides totales presentes en las especies vegetales a investigar, donde se elaboró una curva de calibración con dicho estándar a distintas concentraciones, por consiguiente se calculó la concentración de flavonoides totales mediante la ecuación de la curva tomando como referencia las absorbancias medidas en el

espectrofotómetro ultravioleta a 377nm para cada distinta planta a analizar, detallándose a continuación la curva de calibración:

FIGURA N°3-3. Curva de calibración de quercetina.



Fuente: MONGE, Diego. 2015.

En esta gráfica podemos evidenciar una vez interpolado los resultados de las diferentes plantas, es decir sus absorbancias en referencia al estándar que para el *Plectranthus amboinicus* se obtuvo una concentración de 0,2mg/g de droga y 0,15mg/g de droga correspondiente a *Justicia chlorostachya*. Este hecho demuestra que para cada especie vegetal analizada la cantidad de flavonoides presentes en dichas plantas son realmente significativas.

### 3.1.5 Análisis del protocolo de Inhibición de hialuronidasa

TABLA N° 3-3. Porcentaje de inhibición de hialuronidasa de los extractos metanólicos de *Plectranthus amboinicus* y *Justicia chlorostachya*.

Material	Parte usada	Concentración (g/mL)	% Inhibición
<i>Plectranthus amboinicus</i>	Hojas	0.005	41.25
		0.01	50
		0.02	82.5
<i>Justicia chlorostachya</i>	Hojas	0.005	-601.25
		0.01	-676.25
		0.02	-718.75

Fuente: MONGE, Diego. 2015.

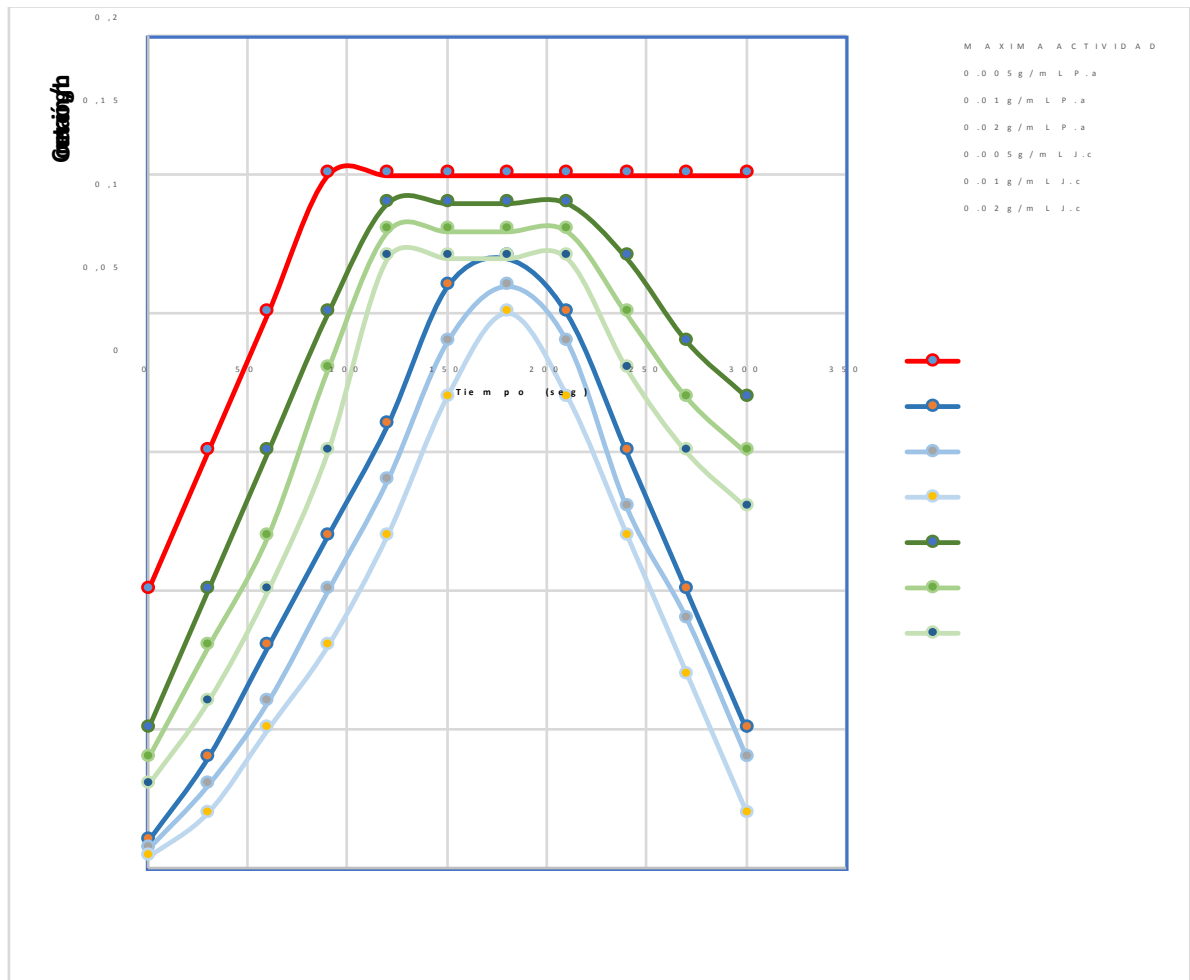
En la Tabla N° 3-3 podemos observar que en los diferentes tratamientos aplicados con los extractos de *Plectranthus amboinicus* presentaron una actividad sumamente interesante en la inhibición de hialuronidasa, obteniendo un 82.5% en la dosis de 0.02 g/ml de fracción flavónica, esto quiere decir que a mayor dosis mejor efecto inhibitorio. Hecho que no ocurre con los diferentes tratamientos de los extractos de *Justicia chlorostachya*, debido a que no se puede establecer la inhibición con este método, ya que podrían existir una mezcla de compuestos flavónicos y/o compuestos relacionados polares, ocasionando interferencia.

**TABLA N° 4-3.** Efecto de los extractos metanólicos de *Plectranthus amboinicus* y *Justicia chlorostachya* en la inhibición de hialuronidasa del veneno de cobra.

TIEMPO (SEG)	MAXIMA ACTIVIDAD	<i>Plectranthus amboinicus</i>			<i>Justicia chlorostachya</i>		
		0.005 g/m L	0.01 g/m L	0.02 g/m L	0.005 g/m L	0.01 g/m L	0.02 g/m L
0	0,1	0,01	0,007	0,03	0,032	0,031	0,03
30	0,15	0,04	0,03	0,03	0,032	0,031	0,03
60	0,2	0,08	0,06	0,03	0,032	0,031	0,03
90	0,25	0,12	0,1	0,03	0,032	0,031	0,03
120	0,25	0,16	0,14	0,031	0,032	0,032	0,031
150	0,25	0,21	0,19	0,031	0,033	0,032	0,031
180	0,25	0,22	0,21	0,031	0,033	0,032	0,031
210	0,25	0,2	0,19	0,031	0,033	0,032	0,031
240	0,25	0,15	0,13	0,029	0,033	0,032	0,031
270	0,25	0,1	0,09	0,029	0,033	0,032	0,03
300	0,25	0,05	0,04	0,029	0,032	0,032	0,03

Fuente: MONGE, Diego. 2015.

FIGURA N°4-3. Curva de Calibración de la actividad de los extractos metanólicos de *Plectranthus amboinicus* y *Justicia chlorostachya* en la inhibición de hialuronidasa del veneno de cobra (*Naja naja*).



Fuente: MONGE, Diego. 2015.

De acuerdo a la Figura N°4-3. Los extractos de *Plectranthus amboinicus* presentan mejores resultados en cuanto a los tratamientos de *Justicia chlorostachya*, la fracción flavónica de *Plectranthus amboinicus* a la dosis de 0.02g/mL permite una excelente inhibición de la hialuronidasa encontrada en dicho veneno, sin descartar las demás dosis bajas utilizadas en esta investigación siendo aceptables, esto quiere decir que a dosis altas hay mayor inhibición de veneno de cobra. Ocurre de igual manera con los demás tratamientos de *Justicia chlorostachya*, que también al aumentar sus dosis no se descarta un buen efecto inhibitorio. La mezcla del veneno de cobra con el ácido hialurónico produce una turbidez, precipitación o floculación del medio, una vez que los extractos actúan sobre dicha mezcla estos no permiten que la reacción progrese sino que en cambio disminuya, donde los componentes flavónicos estarían interviniendo en dicho procedimiento. (Bricskorn, Ch. et al. 1979. p. 90)

## CONCLUSIONES

- Se generaron los diferentes extractos metanólicos tanto de *Plectranthus amboinicus* como de *Justicia chlorostachya*, utilizando el método de reflujo por soxhlej y reflujo, donde una vez obtenidos los extractos fueron sometidos a separación de componentes fenólicos, la coloración de tono amarillo y rojo de los extractos respectivamente, evidencia la presencia de compuestos fenólicos.
- Se realizó el tamizaje fitoquímico de los extractos metanólicos de las diferentes especies vegetales, cuya determinación permitió evidenciar la presencia de componentes de tipo fenólico, como flavonoides y antocianinas, en su mayoría.
- Se comprobó la actividad inhibitoria de los extractos de *Plectranthus amboinicus* en la hialuronidasa, siendo la dosis de 0.02g/ml de fracción flavónica la más óptima en este tipo de investigación ya que a mayor concentración mayor inhibición.
- Se determinó el efecto inhibitorio de los extractos de *Plectranthus amboinicus* y de *Justicia chlorostachya* en la enzima hialuronidasa encontrada en el veneno de cobra, donde a ambas especies vegetales se les atribuye una excelente actividad inhibitoria, cabe destacar que el mejor tratamiento fue el del extracto de *Plectranthus amboinicus* en la dosis de 0.02g/mL.
- Mediante esta investigación se puede concluir que los extractos en especial el del *Plectranthus amboinicus* posee actividad inhibitoria y por ende un mejor efecto cicatrizante en pacientes con pie diabético.

## RECOMENDACIONES

- De acuerdo al presente trabajo los extractos de *Justicia chlorostachya* referente al método de inhibición de la enzima hialuronidasa, no presenta dicha inhibición, como recomendación para futuras investigaciones, sería la de utilizar un métodos de separación de componentes de fase sólida, descartando así las interferencias.
- Se recomienda seguir con la investigación, referente a un método más completo acerca de la purificación de los metabolitos secundarios, las cuales son sustancias encargadas explícitamente de la actividad biológica.
- Sería aconsejable realizar una formulación de tecnológica farmacéutica, que permita una fácil adquisición para aquellos pacientes diabéticos.
- Cuando existe un mayor % de flavonoides que están presentes en los extractos metanólicos, no se usa derivatización ya que estos miden absorbancias por poseer colorimétricos, se puede utilizar métodos inmunoquímicos, electroquímico.
- Seguir con la investigación en la elaboración de una fórmula magistral para la aplicación en pacientes con pie diabético.



## BIBLIOGRAFÍA

1. **AKERELE, O.** *The WHO traditional medicine program: policy and implementation. Int. Trad. Med. Newslett. Revista Brasileira de Ciências Farmacéuticas.* [en línea], 2009, (Brasil) 1, pp. 1-3. [Consulta: 02 Enero 2015]. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S037818442005000800005&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S037818442005000800005&script=sci_arttext)
2. **ARAGADVAY, S.** *Elaboración y control de calidad de tintura y gel cicatrizante y antiinflamatorio a base de chilca (Baccharis latifolia) y hierbamora (Solanum grum).* (TESIS-pregrado) (Bioquímica Farmacéutica). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba. Ecuador. 2009, pp. 65-69. [Consulta: 02 Enero 2015]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/216/1/56t00190.pdf>
3. **ARMSTRONG, D., LAVERY, L., KIMBRIEL, H., NIXON, B., BOULTON, A.** *Activity patterns of patients with diabetic foot ulceration: patients with active ulceration may not adhere to a standard pressure off-loading regimen. Diabetes Care.* [en línea], 2003, (Chicago) 26, pp. 2595-2597. [Consulta: 02 Enero 2015]. Disponible en: <http://care.diabetesjournals.org/content/27/8/1980.full>
4. **ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE LA DIABETES (ALAD).** *Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2.* [en línea], 2008, Washington: Pablo Aschner, MD, MSc, p. 4. [Consulta: 02 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.alad-latinoamerica.org/phocadownload/guias%20alad.pdf>
5. **BALKAN, B.** *Hyperinsulinemia and glucose tolerance in obese raton food.* Illinois-Estados Unidos, Editorial Universitaria, 1991, pp. 40-50.
6. **BLACPM A.** *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* [en línea], 2007, (Argentina) 6 (5), pp. 144-304. [Consulta: 02 Enero 2015]. Disponible en: [http://www.uv.es/prietojm/Old%20Blacpma/Old%20Blacpma%20archive/BLACPM A\\_V6\\_N5.pdf](http://www.uv.es/prietojm/Old%20Blacpma/Old%20Blacpma%20archive/BLACPM A_V6_N5.pdf)
7. **BOYKO, E.J., AHRONI, J.H. et al.** *A prospective study of risk factors for diabetic foot ulcer. The Seattle Diabetic Foot Study. Diabetes Care.* [en línea], 1999, (USA) 22 (7), pp.

- 1036-42. [Consulta: 02 Enero 2015]. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10388963>
8. **BREM, H., SHEEHAN, P., BOULTON, A.J.** *Protocol for treatment of diabetic foot ulcers. Am J Surg.* [en línea], 2004, (USA) 187 (5A): 1S-10S Review, p. 5. [Consulta: 05 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15147985>
9. **BRIESKORN, C.H., RIEDEL, W.** *Triterpene acids from coleus amboinicus toureiro. Arch Pharm.* [en línea], 1977, (India) 310 (11), p. 910-16. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol4\\_3\\_99/pla06399.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol4_3_99/pla06399.pdf)
10. **BRUNETON, J.** *Farmacognosia. Fitoquímica Plantas medicinales.* Zaragoza-España. Editorial Acribia. 2ª edición, 2001, pp. 59-60.
11. **CLARK, R.A.F.** *Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin. J Invest Dermatol:Suppl. Department of Dermatology and Medicine, University of Colorado School of Medicine and National Jewish Center for Immunology and Respiratory Medicine, Denver, Colorado.* [en línea], 1990, (U.S.A.) 94, pp. 128S-134S. [Consulta: 05 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.nature.com/jid/journal/v94/n6s/pdf/5612946a.pdf>
12. **FIGUEROA, D.** *Diabetes mellitus;* 13va ed. Madrid-España, Editoriales Harcourt Brace, 2009, pp. 1933-1969.
13. **FOLKMAN, J.** *Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview.* [en línea], 1997, (Francia), pp. 79:1-8. [Consulta: 02 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9002217>
14. **GABBIANI, G., CHAPONNIER, C., HUTTNER, I.** *Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. J Cell Biol* [en línea], 1978, (Reino Unido) 76, pp. 561-568. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC515361/>
15. **GARCIA LUDEÑA, J.L.** *La hialuronidasa estudio farmacológico. Experimental y aplicaciones. Terapéuticas. Antecedentes -Resumen histórico. Anales de Medicina y cirugía.* [en línea], 1958, (USA) Vol. XXXVIII, p. 348. [Consulta: 05 Enero 2015].

Disponible

en:

<http://www.raco.cat/index.php/AnalesMedicina/article/download/169773/254314>

16. **GUYTON, A.** *Fisiología humana*. México, Editorial Interamericana, 1974, pp. 156-158.
17. **INEC**, *La diabetes es la segunda causa de muerte general en el país*. [en línea], Quito-Ecuador, 2013. [Consulta: 05 Enero 2015]. Disponible en: <http://ecuadorencifras.com>
18. **KAKEGAWA, H., MATSUMOTO, H., ENDO, K., SATOH, T., NONAKA, G., NISHIOKA, I.** *Inhibitory effects of Tannis on Hialuronidase Activation and on Degranulation from Mesentery Mast Cells. Chem. Pharm. Bull.* [en línea], 1985, (Tokyo) 33, pp. 5079-5081. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: [http://www.uv.es/prietojm/Old%20Blacpma/old%20blacpma%20archive/BLACpMA\\_V3\\_N4.pdf](http://www.uv.es/prietojm/Old%20Blacpma/old%20blacpma%20archive/BLACpMA_V3_N4.pdf)
19. **KARALLIEDDE, L.** *Animal toxins. British Journal of Anaesthesia.* [en línea], 1995, (London) 74, pp. 319-327. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.biosciweb.net/animal/pdf/animal%20toxins.pdf>
20. **KIRSNER, R., EAGLSTEIN, W.** *El proceso de curación de las heridas. Clínicas Dermatológicas*. Madrid, Editorial Interamericana, 1993, pp. 653-662.
21. **LARJAVA, H., SALO, T., HAAPASALMI, K., KRAMER, R.H., HEINO, J.** *Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. J Clin Invest* [en línea], 1993, (New York) 92, pp. 1425-1435. [Consulta: 11 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2132537/>
22. **MACHESNEY, M.I., TIDMAN, N., WASEEM, A., KIRBY, L., LEIGH, I.** *Activated keratinocytes in the epidermis of hypertrophic scars. Am J Pathol.* [en línea], 1998, (U.S.A.) 152 (5), pp. 1133-41. [Consulta: 11 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9588880>
23. **MACHIAH, D.K., GIRISH, K.S., GOWDA, T.V.,** *A glycoprotein from a folk medicinal plant, Withania somnifera, inhibits hyaluronidase activity of snake venoms. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* [en línea], 2006, (India) 143, pp. 158-161. [Consulta: 11 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.amazon.com/glycoprotein-medicinal-Withania-somnifera-hyaluronidase/dp/B000RR8FWQ>

24. MALAY, D.S., MARGOLIS, D.J., HOFFSTAD, O.J., BELLAMY, S. *The incidence and risks of failure to heal after lower extremity amputation for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcer. J Foot Ankle Surg. Center for Clinical Epidemiology and Biostatistics, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA* [en línea], 2006. (U.S.A.) 45, pp. 366-74. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: [http://www.jfas.org/article/S1067-2516\(06\)00443-1/fulltext](http://www.jfas.org/article/S1067-2516(06)00443-1/fulltext)
25. MENENDEZ, Rosa., GONZÁLEZ, Vania. *Plectranthus amboinicus (Lour) Spreng Revista Cubana. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Artículo de revisión.* [en línea], 1999, (Cuba) 3 (3), pp. 110-15. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol4\\_3\\_99/pla06399.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol4_3_99/pla06399.pdf)
26. MIRANDA, Martha. *Farmacognosia y productos naturales. Normas ramales de drogas crudas y extractos y tinturas.* Cuba. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP. 1992, pp 32-62
27. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. *Boletín del Día Mundial de la diabetes.* Ecuador. [en línea], Ecuador: MSP, 2013. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.salud.gob.ec/dia-mundial-de-la-diabetes-m-sp-ejecuta-acciones-para-reducir-su-incidencia-y-complicaciones/>
28. PAZMIÑO, Carlos. *Determinación de la actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de Justicia chlorostachya Leonard (insulina), en ratones con hiperglucemia inducida.* (TESIS-pregrado) (Bioquímico Farmacéutico). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba - Ecuador. 2011, pp 25-26. [Consulta: 06 Enero 2015]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1990/1/56T00298.pdf>
29. PORETSKY, L. *Principal of Diabetes Mellitus.* 2da ed, New York-USA, Editorial Medical ED, 2008, pp 378- 73.
30. PRIETO, S., GONZÁLEZ, J.A., MOLINA, J., DIEGUEZ, R., GARRIDO, G., GAMIOTEA, D., et al. *Contribución a una terapéutica natural en el tratamiento antiviral.* *Rev Latinoam Quím. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba.* La Habana: Editorial Científico-Técnica. [en línea], 2000. (Cuba) 28, p. 108. [Consulta: 08

Enero 2015]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75152003000300006&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75152003000300006&script=sci_arttext)

31. SHASRABUDHE, A., DEODHAR, M. *Anti-hyaluronidase, anti-elastase activity of Garcinia indica. International Journal of Botany.* [en línea], 2010. (China) 6, pp. 299–303. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: <http://scialert.net/fulltext/?doi=ijb.2010.299.303&org=11>
32. SINGER, A.J., CLARK, R.A. *Cutaneous Wound Healing. N. Eng. J. Med.* [en línea], 1999, (England) 341, pp.738–746. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471461>
33. SHAH, M., FOREMAN, D.M. *Neutralization of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 or exogenous addition of TGF- $\beta$ 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. J Cell Sci Cells, Immunology and Development Division, School of Biological Sciences, University of Manchester, UK.* [en línea], 1995, (Uckania) 108 (3), pp. 985-1002. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471461>
34. STANLEY, J. *Anatomía y fisiología humana.* México, Editorial Interamericana, 1976, p. 409.
35. STOJANONSKA, L. *Evolution of dexamethasone – induced insulin Resistant in rat;* Oklahoma-USA, Editorial Omega, 2005, pp.748-56.
36. TAMAYO, M. *Influencia de un tratamiento integral de pie diabético en la disminución del índice de amputaciones de los pacientes atendidos en la unidad de pie diabético del hospital provincial general docente Riobamba, durante el período enero– septiembre de 2013*". (TESIS-pregrado) (Médico). Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Salud. Escuela de Medicina Ambato, Ecuador, 2014, p. 25. [Consulta: 06 Enero 2015]. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/6595/1/Mar%C3%ADa%20Alexandra%20Tamayo%20Freire.pdf>
37. TIMOR, C. *Evaluación físico-química del aceite esencial de las hojas de Plectranthus amboinicus (Lour) Spreng. Revista Cubana Farmacéutica.* [en línea], 1991, (Cuba) 25 (1), pp. 63-6 [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol4\\_3\\_99/pla06399.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol4_3_99/pla06399.pdf)

38. TSETLIN, V.I., HUCHO, F. *Snake and snail toxins actino on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications*. [en línea], 2003, (Rusia), p. 557. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579303014546>
39. TOOLE, B.P. *Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation*. In: Hay ED, ed. *Cell biology of extracellular matrix*. Plenum Press. [en línea], 2001, (U.S.A.), pp. 305-341. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.nature.com/ja/journal/v59/n12/abs/ja2006101a.html>
40. VAALAMO, M., MATTILA, L., JOHANSSON, N., KARINIEMI, A.L., KARJALAINEN-LINDSBERG, M.L., KÄHÄRI, V.M. et al. *Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds*. *J Invest Dermatol*. [en línea], 2001. (Finlandia), 109, pp. 96-101. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.nature.com/jid/journal/v129/n11/full/jid2009298a.html>
41. WANG, H.J., PAUL, I.C., ZELNIK, R., MIKUTA, K., LAVIC, D. *Structure and absolute stereochemistry of the tipernoid barbatusin*. *J Amer Chem Soc. Evaluación físico-química del aceite esencial de las hojas de Plectranthus amboinicus (Lour) Spreng. Revista Cubana Farmacéutica*. [en línea], 1973, (Cuba) 78 (558/600), pp. 8555-69 [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol14\\_3\\_99/pla399.pdf](http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol14_3_99/pla399.pdf)
42. XU, J., CLARK, R.A.F. *Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins*. *J Cell Biol* [en línea], 1996, (U.S.A.) 132, pp. 239-249. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: <http://jcb.rupress.org/content/132/1/239.abstract>

## ANEXOS

### Anexo A. Análisis de Humedad



Fotografía N°1. Peso del crisol



Fotografía N°2. Peso del crisol con la muestra

### Anexo B. Extracción de las plantas *Plectyranthus amboinicus* y *Justicia chlorostachya*



Fotografía N°3. Método de extracción por soxhlet



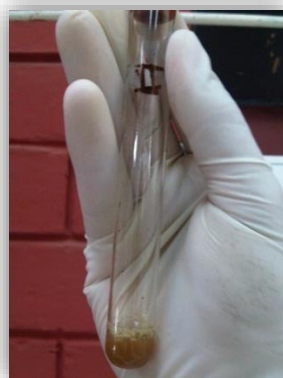
Fotografía N°4. Concentración en rotavapor de orégano orejón e insulina vegetal respectivamente



**Anexo C. Inhibición de hialuronidasa**



**Fotografía N°5. Blancos Fotografía N°6. Hialuronidasa bovina Fotografía N°7. Reactivos**



**Fotografía N°8. Distintos tratamientos de las plantas analizadas**



**Fotografía N°9. Añadición del DMSO 5%**

**Fotografía N°10. Añadición del buffer**





Fotografía N°11. Añadición del CaCl<sub>2</sub>



Fotografía N°12. Añadición del hialuronato de sodio



Fotografía N°13. Incubación de los tratamientos a 37°C



Fotografía N°14. Calentamiento



Fotografía N°15. Enfriamiento

Anexo D. Determinación de absorbancias de los diferentes tratamientos de *Plectranthus amboinicus* y *Justicia chlorostachya*



Fotografía N°16. Medición de absorbancias