



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE EXTRACTOS DE HOJAS DE LLANTÉN DE PÁRAMO (*Plántago australis*) EN LESIONES, INDUCIDAS EN RATONES (*Mus musculus*)”

Trabajo de Titulación presentado para optar por el grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACEÚTICA

AUTORA: SANDRA VIVIANA ASTO GUAMAN

TUTORA: DRA. ELIZABETH ESCUDERO

Riobamba- Ecuador

2015

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Titulación certifica que el Trabajo de Titulación: **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE EXTRACTOS DE HOJAS DE LLANTÉN DE PÁRAMO (*Plántago australis*) EN LESIONES, INDUCIDAS EN RATONES (*Mus musculus*).”** De autoría de la señorita Sandra Viviana Asto Guaman ha sido cuidadosamente revisado por los miembros del tribunal de titulación quedando autorizada su presentación.

Dra. Elizabeth Escudero

**DIRECTORA DEL TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Dr. Félix Andueza

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. María Eugenia Macas.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DOCUMENTALISTA

SISBIB ESPOCH

Yo, Sandra Viviana Asto Guaman, 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

SANDRA VIVIANA ASTO GUAMAN

DEDICATORIA

A Dios por ser la guía en mi vida. A mis padres Luis y Carmita, por darme la vida, y siempre velar por mi bienestar y educación dándome su apoyo incondicional y confianza. A mis hermanos Cristian y Franz por los momentos compartidos juntos. A mis abuelitas María y Rosa, mis viejitas bellas las adoro con mi vida. Para mi novio Andrés, por su amor, por estar siempre a mi lado apoyándome, por darme ánimos y fuerza en momentos de declive y cansancio. A todos los amo con mi vida.

Viviana

AGRADECIMIENTO

A Dios y a la Virgen por ayudarme a cumplir una meta más en mi vida profesional.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por permitirme estudiar y llegar a ser ahora una profesional.

A la Dra. Elizabeth Escudero, Dr. Félix Andueza, quienes con su colaboración, dedicación, orientación y conocimientos han ayudado a que pueda culminar con éxito mi trabajo de investigación

A mis padres y hermanos por estar siempre junto a mí, sin importar las circunstancias, por sus consejos y enseñanzas su apoyo y compañía, sin ustedes no hubiera sido posible este triunfo.

A mis amigos y familiares que han formado parte de mi vida profesional les quiero agradecer por su cariño, amistad, apoyo, consejos, ánimos en momentos difíciles.

Viviana

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
CERTIFICACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
TABLA DE CONTENIDOS.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xiii
INDICE DE GRÁFICOS.....	xiv
INDICE DE ANEXOS.....	xv
RESUMEN.....	xvi
SUMARY.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
 CAPITULO I	
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Antecedentes de la Investigación.....	4
1.2. Bases Teóricas.....	6
1.2.1. <i>Llantén de páramo (Plantago australis)</i>.....	6
1.2.2. <i>Clasificación taxonómica</i>.....	6
1.2.3. <i>Características generales</i>.....	7
1.2.3.1. <i>Descripción Botánica</i>.....	7
1.2.3.2. <i>Origen y Distribución</i>.....	7
1.2.3.3. <i>Composición química</i>.....	8
1.2.3.4. <i>Usos</i>.....	8
1.2.3.5. <i>Propiedades</i>.....	9
1.2.4. <i>La piel y sus Componentes de la piel</i>.....	9

	Pág.
1.2.4.1. <i>Definición</i>	9
1.2.4.2. <i>Epidermis</i>	10
1.2.4.3. <i>Dermis</i>	10
1.2.4.4. <i>Hipodermis</i>	11
1.2.5. Heridas	11
1.2.5.1. <i>Tipos de Heridas</i>	11
1.2.6. Cicatrización	12
1.2.6.1. <i>Definición</i>	12
1.2.6.2. <i>Tipos de cicatrización</i>	12
1.2.6.3. <i>Fases de la cicatrización</i>	13
1.2.6.4. <i>Factores que influyen en la cicatrización</i>	16
1.2.6.5. <i>Complicaciones</i>	17
1.2.6.6. <i>Cicatrización Patológica</i>	17
1.2.6.7. <i>Células que intervienen en la cicatrización</i>	18
1.2.7. Metabolitos secundarios que intervienen en la cicatrización	19
1.2.8. Métodos de extracción de metabolitos en el material vegetal	21
1.2.9. Medicamentos Cicatrizantes	21
1.2.10. Cicatrizantes comerciales	22
1.2.10.1. <i>Antibióticos y quimioterápicos para uso dermatológico</i>	22
1.2.10.2. <i>Preparados dermatológicos con corticoides</i>	22
1.2.11. Ensayos biológicos	23
1.2.11.1. <i>Animales de Laboratorio (Ratones)</i>	23

CAPITULO II	Pág.
2. MARCO METODOLOGÍCO.....	26
2.1. Lugar de investigación.....	26
2.2. Materiales, equipos y reactivos.....	26
2.3. Técnicas y Métodos.....	27
2.3.1. <i>Recolección, Selección y Lavado del material vegetal</i>.....	27
2.3.2. <i>Control de calidad del material vegetal mediante métodos físico-químicos</i>.....	28
2.3.2.1. <i>Determinación de cenizas totales solubles en agua e insolubles en acido</i>	28
2.3.2.2. <i>Determinación de Humedad</i>	30
2.3.2.3. <i>Determinación de sustancias solubles</i>	30
2.3.3. <i>Tamizaje fitoquímico</i>.....	31
2.3.4. <i>Control de calidad del extracto de Plantago australis</i>.....	35
2.3.4.1. <i>Determinación de densidad</i>	35
2.3.4.2. <i>Determinación de índice de refracción</i>	36
2.3.4.3. <i>Determinación de pH del extracto</i>	36
2.3.4.4. <i>Determinación de sustancias totales</i>	37
2.3.5. <i>Preparación de extractos</i>.....	37
2.3.6. <i>Control de calidad microbiológica</i>.....	37
2.3.6.1. <i>Recuento de Aerobios mesófilos</i>	38
2.3.6.2. <i>Recuento de Escherichia coli</i>	38
2.3.6.3. <i>Recuento de Mohos y Levaduras</i>	39
2.3.7. <i>Cromatografía en capa fina (flavonoides)</i>.....	39
2.3.8. <i>Cuantificación de metabolitos secundarios</i>.....	40
2.3.8.1. <i>Cuantificación de fenoles totales</i>	40

	Pág.
2.3.8.2. <i>Cuantificación de flavonoides</i>	41
2.3.9. <i>Evaluación de la actividad cicatrizante</i>	41
2.3.10. <i>Exámenes histopatológicos</i>	43
2.3.11. <i>Análisis estadístico</i>	43

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	44
3.1. Análisis y Discusión de Resultados	44
3.1.1. <i>Control de calidad del material vegetal</i>	44
3.1.2. <i>Tamizaje fitoquímico</i>	45
3.1.3. <i>Control de calidad del extracto etanólico</i>	47
3.1.4. <i>Cromatografía en capa fina</i>	48
3.1.5. <i>Cuantificación de metabolitos secundarios</i>	49
3.1.5.1. <i>Cuantificación de fenoles totales (660 nm)</i>	49
3.1.5.2. <i>Cuantificación de flavonoides (415nm)</i>	49
3.1.6. <i>Preparación de extractos</i>	50
3.1.7. <i>Control de calidad microbiológica</i>	50
3.1.8. <i>Evaluación de la actividad cicatrizante</i>	51
3.1.9. <i>Exámenes histopatológicos</i>	55
3.2. Comprobación de hipótesis	56

	Pág.
CONCLUSIONES.....	59
RECOMENDACIONES.....	60
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1-1 Clasificación taxonómica del llantén de páramo.....	6
Tabla 2-1 Diferentes tipos de extracción de metabolitos secundarios.....	21
Tabla 3-1 Clasificación taxonómica de los animales de experimentación.....	24
Tabla 4-2 Materiales, Reactivos y Equipos. ESPOCH. Agosto 2015.....	26
Tabla 5-2 Protocolo Farmacológico.....	41
Tabla 6-2 Definición de grupos experimentales.....	42
Tabla 7-3 Control de Calidad de las Hojas de Llantén de Páramo (<i>Plantago australis</i>). Laboratorio de Productos Naturales, Investigación y Desarrollo. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015.....	44
Tabla 8-3 Tamizaje Fitoquímico de Extractos de Llantén de Páramo (<i>Plantago australis</i>). Laboratorio de Productos Naturales, Investigación y Desarrollo. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015.....	45
Tabla 9-3 Control de Calidad de Extractos de Llantén de Páramo (<i>Plantago Australis</i>). Laboratorio de Productos Naturales, Investigación y Desarrollo. Facultad De Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015.....	47
Tabla 10-3 Rf de la muestra de Llantén De Páramo (<i>Plantago Australis</i>). Laboratorio de Productos Naturales, Investigación y Desarrollo. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015.....	48
Tabla 11-3 Concentración de Fenoles Totales (% Ácido Gálico) del Llantén de Páramo (<i>Plantago australis</i>). Laboratorio de Productos Naturales, Investigación y Desarrollo. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015.....	49
Tabla 12-3 Concentración de Flavonoides Totales (% Quercetina) del Llantén de Páramo (<i>Plantago australis</i>). Laboratorio de Productos Naturales, Investigación y Desarrollo. Facultad De Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015.....	49
Tabla 13-3 Control de Calidad Microbiológica de Extractos de Llantén de Páramo (<i>Plantago australis</i>). Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015.....	50

	Pág.
Tabla 14-3 Tiempo de Cicatrización de Animales de Experimentación. Bioterio. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015.....	51
Tabla 15-3 Longitud de la Herida realizada en los Animales de Experimentación. Bioterio. Facultad De Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015.....	52
Tabla 16-3 Formación y Desprendimiento de la costra realizada en los Animales de Experimentación. Bioterio. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015.....	54
Tabla 17-3 Estudio Histopatológico del Tejido Regenerado de los Animales de Experimentación. SOLCA. Agosto 2015.....	55
Tabla 18-3 Análisis de Varianza ANOVA del efecto cicatrizante del <i>Plantago australis</i> en los grupos tratados considerando los días de cicatrización. Bioterio Facultad de Ciencias. ESPOCH. 2015.....	57
Tabla 19-3 Test de Tukey Grupos homogéneos de los días de cicatrización de los grupos experimentales. Bioterio de la Facultad de Ciencias. ESPOCH. 2015.....	57

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1-1 <i>Plantago australis</i>	6
Figura. 2-1 Distribución Geográfica.....	7
Figura. 3-1 Componentes de la Piel.....	9
Figura. 4-1 Tipos de cicatrización.....	13
Figura. 5-1 Fases de reparación de las heridas.....	14
Figura 6-1 Fase Inflamatoria.....	14
Figura. 7-1 Fase proliferativa.....	15
Figura. 8-1 Fase de remodelación tisular.....	16
Figura 9-1 Fases de la cicatrización.....	16
Figura. 10-1 Otro factores que influyen en la cicatrización.....	17
Figura. 11-1 Estructuras Básicas de los Flavonoides.....	19
Figura. 12-1 Estructuras del ácido gálico.....	20
Figura. 13-1 Animales de experimentación.....	23
Figura. 14-1 Microambiente y Macroambiente.....	25
Figura. 15-2 Esquema de extracción sucesiva del material vegetal para aplicar las técnicas de tamizaje fitoquímico.....	31
Figura. 16-2 Reacciones que se va a realizar en el extracto etéreo.....	32
Figura. 17-2 Ensayos a realizar en el extracto alcohólico.....	32
Figura. 18-2 Ensayos a realizar en el extracto acuoso.....	32

INDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico. 1-3 Comparación de los diferentes grupos de tratamiento de la longitud de la herida vs el tiempo.....	53
Gráficos 2-3 Gráfica de formación y desprendimiento de la costra	54

INDICE DE ANEXOS

- Anexo A** Cromatografía en Capa Fina de extractos de Llantén De Páramo (*Plantago australis*)
- Anexo B** Tabla de valores y Curvas de calibración del estándar para cuantificación de fenoles totales.
- Anexo C** Tabla de valores y Curvas de calibración del estándar para cuantificación flavonoides totales
- Anexo D** Peso de los Animales de Experimentación al inicio del Tratamiento. Bioterio. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015
- Anexo E** Recolección del material vegetal Llantén de Páramo (*Plantago australis*)
- Anexo F** Planta de Llantén de Páramo (*Plantago australis*) seca y pulverizada
- Anexo G** Control de Calidad del Llantén de Páramo (*Plantago australis*)
- Anexo H** Tamizaje fitoquímico de los extractos de las hojas del Llantén de Páramo (*Plantago australis*)
- Anexo I** Preparación de los extractos de las hojas del Llantén de Páramo (*Plantago australis*)
- Anexo J** Control de Calidad de los extractos de las hojas del Llantén de Páramo (*Plantago australis*)
- Anexo K** Control de Calidad Microbiológica de los extractos de las hojas del Llantén de Páramo (*Plantago australis*)
- Anexo L** Cuantificación de metabolitos secundarios de los extractos de las hojas del Llantén de Páramo (*Plantago australis*)
- Anexo M** Evaluación de la actividad cicatrizante de los extractos de las hojas del Llantén de Páramo (*Plantago australis*) en ratones
- Anexo N** Estudio histopatológico de la piel de los animales de experimentación
- Anexo O** Autorización de recolección del material vegetal del MAGAP.
- Anexo P** Norma INEN 2 392:2007. Hierbas Aromáticas. Requisitos
- Anexo Q** Certificado de Control de Similitud.

RESUMEN

En la investigación se evaluó la actividad cicatrizante de los extractos de hojas de llantén de páramo (*Plantago australis*). Se efectuó el control de calidad del material vegetal y extractos, dando como resultados la densidad 0,8296 g/mL, índice de refracción 1,344, pH 4,95 y sólidos totales 4,78 %. La cuantificación de fenoles y flavonoides se realizó en extracto hidroalcohólico y etanólico, dando como resultado que los fenoles totales expresados en ácido gálico fue de 2,78 y 5,06 mg/g de muestra respectivamente, los flavonoides totales expresados en quercetina fue de 1,52 y 2,35 mg/g de muestra respectivamente. Se determinó la calidad microbiana de los extractos a aplicarse en las lesiones de los ratones, los resultados obtenidos indican que presenta una buena calidad. En la evaluación del efecto cicatrizante se usó 24 ratones con lesiones inducidas, los resultados obtenidos de los días de cicatrización se sometieron a análisis estadístico mediante el software XLSTAT, con un intervalo de confianza del 95% se obtuvo como resultado que el extracto al 75% y 50% de hojas de *Plantago australis*, presentan mayor efecto terapéutico ya que cicatrizó la herida en 7 y 8 días respectivamente, estos resultados se relacionaron con un medicamento comercial de acetato de prednisolona 0,5g y sulfato de neomicina 0,5g que presentó una cicatrización en 13 días, con alcohol al 40% cicatrizó en 11 días y la cicatrización natural en 15 días. En el análisis histopatológico los resultados indicaron una buena regeneración celular de los tejidos. Según los resultados se concluye que presentan mejores efectos las lesiones tratadas con extracto al 75%, y 50% con menos tiempo de cicatrización y buena regeneración celular. Se recomienda elaborar una forma farmacéutica adecuada del extracto de *Plantago australis* para una mejor administración.

Palabras Clave: <FARMACIA>, < LLANTÉN DE PÁRAMO [*Plantago australis*]>, <RATONES (*Mus musculus*)>, <ACTIVIDAD CICATRIZANTE>, <EXTRACTO ETANÓLICO>, <SOFTWARE [XLSTAT]>, <LESIONES INDUCIDAS>, <REGENERACION CELULAR>

SUMMARY

In this research the healing activity of extract from plaintain leaves (*Plantago australis*) in the moors was evaluated. Quality control of plant material and extracts were made giving as results density of 0,8296 g/mL, refractive index 1.344, pH 4,95 and 4,78% of total solids. The quantification of phenol and flavonoids was executed in hydroalcoholic and ethanolic extract giving as result sample total phenols revealed in gallic acide as 2,78 and 5,06 mg/g respectively, sample total flavonoids showed in quercetin was 1,52 and 2,35 mg/g respectively. Microbial quality of the extracts applied in mice injures was determined. That is why the obtained results had a good quality. In the healing effect evaluation was used 24 mice with induced lesions, the results obtained from days of healing were subjected to statistical analysis using XLSTAT software, with a confidence interval of 95%, thus was obtained as a result that the extract of 75% and 50% *Plantago australis* leaf present higher therapeutic effect as it healed wound at 7 and 8 days respectively, these results relate to a comercial drug prednisolone acetate 0,5 g and 0,5 g neomycin sulfate which presented scarring in 13 days, with 40% alcohol healed in 11 days and natural healing in 15 days. In the histopathological analysis the results showed good celular tissue regeneration. According to the results it concluded that have better effects treated lesión with 75% extract, and 50% less healing time and good cell regeneration. It recomends producing a suitable dosage form of *Plantago australis* extract for a better medical managment.

Keywords: <PHARMACY>, < HEATH PLANTAIN [*Plantago australis*]>, <MICE (*Mus musculus*)>, <HEALING ACTIVITY>, <ETHANOL EXTRACT>, <SOFTWARE [XLSTAT]>, <INJURED DAMAGE>, <CELL REGENERATION>

INTRODUCCIÓN

Situación Problemática

Las personas tienden a adquirir heridas con frecuencia ya sean estas por accidentes, intervenciones quirúrgicas, quemaduras u otros factores, debido a esto se necesita un tratamiento que sea seguro y vertiginoso para cicatrizarlas, esto se ha vuelto un desafío terapéutico ya que cada vez se busca una buena cicatrización en un tiempo corto. Por lo que se sigue investigando tratamientos que sean completamente efectivos, ya que el proceso de cicatrización es complejo.

El uso de las plantas como medicina se da desde la antigüedad, los primeros usos fueron por instinto ya que no conocía sus propiedades, hoy con la ayuda de nuevos avances científicos se puede ir desarrollando investigaciones y así conocer las propiedades terapéuticas presentes en las plantas. Ecuador es un país con una gran diversidad de flora, no existe estudios de las actividades terapéuticas en todas las especies de plantas, principalmente de las plantas que se encuentran en los páramos de la provincia de Chimborazo por lo que se considera de gran importancia estudiarlas, para identificar nuevas especies con diferentes actividades farmacológicas, las cuales pueden ser de gran ayuda para curar enfermedades.

Para el tratamiento de heridas existe en el mercado los medicamentos cicatrizantes, los cuales presentan compuestos antiinflamatorios y antimicrobianos, pero el obtenerlos requiere un gasto económico. Por lo cual es beneficioso estudiar las especies vegetales y comprobar su actividad farmacológica para así proponerlos como alternativa terapéutica para tratar heridas agudas o crónicas la cual a más de ser efectiva va a ser segura y económica, para las personas que requieran su uso. (Soriano, 2004. Pp. 1-5.)

Una de las plantas medicinales que se encuentra en los páramos del Ecuador que es utilizada en medicina tradicional por las comunidades aledañas a los mismos, es el *Plantago australis* la cual es conocida como llantén de páramo, que según costumbres esta planta presenta efectos cicatrizantes. Esta especie de *Plantago* no se ha estudiado en nuestro medio por lo cual se planteó el estudio.

El llantén de páramo es una de las plantas que se encuentran en gran cantidad en los páramos de nuestro país, y no se conoce todas las propiedades que presenta. Esta investigación es un aporte para dar a conocer que esta especie puede ser utilizada como una planta medicinal para curar heridas. En vista de la problemática se consideró relevante realizar un estudio fitoquímico y

farmacológico del llantén de páramo (*Plantago australis*), para identificar la presencia de los metabolitos útiles para la actividad cicatrizante y así demostrar que esta planta puede ser utilizada como tal. Para lo cual se utilizó ratones (*Mus musculus*), como modelos farmacológicos. (Soriano, 2004. Pp. 1-5.)

Justificación de la investigación

El estudio de las plantas es de gran interés para la salud, ya que se busca sustancias activas. Las plantas presentan varios metabolitos los cuales han sido utilizados por el hombre históricamente y están vinculados con la forma de cura ancestral para combatir diversos problemas, existen varios estudios de plantas usadas para curar heridas. (Taylor , Ríos y León , 2013. Pp. 1-13). Y dada la gran diversidad de flora existente en nuestro país son muy pocos estudios fitoquímico y farmacológicos realizados.

El Ecuador es un país en donde la medicina tradicional es de gran importancia, esto es más evidente en los sectores rurales, ya que ahí los servicios de atención en salud son escasos, por esta razón las personas utilizan sus conocimientos ancestrales en plantas y curar enfermedades.

Los páramos del Ecuador presentan un ecosistema con plantas propias de la zona, que son utilizadas por personas nativas del lugar, es el caso del llantén de páramo el cual se utiliza para curar heridas y úlceras de la piel, y por su acción desinflamante favorece en la cicatrización. (López y Pino, 2014. Pp.1-10).

Debido a que el llantén de páramo es utilizado como planta medicinal por algunos pueblos de la Sierra del Ecuador, es necesario comprobar su actividad cicatrizante. Este estudio es de gran importancia ya que el *Plantago australis* está poco estudiado en nuestro país, y es una planta que tiene una amplia distribución en el continente Americano.

Tanto el hombre como los animales están expuestos a cortaduras ya sean estas intencionales o accidentales, por lo hace necesario buscar un producto de origen vegetal efectivo y accesible que ayude a una pronta y buena cicatrización, ya que los medicamentos comerciales tienen costos elevados y en algunos casos no son efectivos.

Por lo tanto esta investigación se basa en determinar la actividad cicatrizante del llantén de páramo (*Plantago australis*), para que así sus propiedades medicinales puedan ser constatadas y comprobadas para garantizar su actividad en el tratamiento de heridas.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Evaluar la actividad cicatrizante de extractos de hojas de llantén de páramo (*Plantago australis*) en lesiones inducidas en ratones (*Mus musculus*).

Objetivos Específicos

- Realizar el control de calidad del material vegetal y extractos del llantén de páramo (*Plantago australis*)
- Identificar mediante tamizaje fitoquímico los metabolitos secundarios presentes en los extractos.
- Determinar mediante cromatografía en capa fina los metabolitos responsables de la actividad cicatrizante.
- Cuantificar metabolitos secundarios (fenoles totales y flavonoides totales) presente en el *Plantago australis*
- Aplicar el extracto de las hojas de *Plantago australis* en los ratones para evaluar la cicatrización y el proceso de regeneración celular en la cicatrización utilizando controles farmacológicos.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes de la Investigación

La cicatrización ha sido un problema desde la antigüedad, ya que no se encontraba métodos para evitar que las heridas cicatricen rápidamente y no sean infectadas. Hace más de un siglo, todas las heridas eran infectadas, las cuales llevaban a elevar la tasa de mortalidad por lo que se evitaban las intervenciones quirúrgicas. Simmons y Howard indicaron que una herida infectada era aquella donde se formaba pus, aunque no se aísla germen alguno de este líquido. Considerándose herida una incisión en la piel y tejido celular subcutáneo. (Ramírez y Tuero, 2011. <http://bvs.sld.cu/revistas>).

En la era cristiana para tratar las heridas se utilizaba azúcar y miel, el azúcar crea un medio de alta tonicidad que genera migración de plasma y linfa hacia la solución de continuidad, así inhibe el crecimiento bacteriano, acelera el desprendimiento de tejido muerto. La miel ejerce un efecto antibacteriano antioxidante y antiinflamatorio favoreciendo a la cicatrización de heridas.. El *Plantago australis* es una planta herbácea de origen euroasiático y noroafriano la cual está ampliamente distribuida en el mundo y es utilizada en medicina tradicional para curar diferentes enfermedades sea interna o externamente. (Ramírez y Tuero, 2011. <http://bvs.sld.cu/revistas>).

En Bolivia se evaluó la actividad antiviral utilizando un extracto etanólico y acuoso de las hojas de *Plantago australis*, y virus de Herpes simplex tipo 1, virus de estomatitis vesicular, poliovirus tipo 1. El extracto acuoso presento una alta actividad antiviral frente al virus de estomatitis vesicular a concentraciones de 150-500 µg/mL, y no presentó efectos citotóxicos (Abad et al, 1991. p. 85).

Se realizó la evaluación de la actividad citoprotectora en ratas utilizando extractos de hexano, diclorometano, etanol y agua, se encontró la presencia de taninos, saponinas, flavonoides y cumarinas. Los extractos tienen actividad quimioprotectora en el tipo de ulcera provocada con etanol. (Gonzales et al, 2000. p.86).

En Brasil se evaluó la actividad antiulcerogénica del extracto de hojas de *Plantago australis* sobre diferentes tipos de úlceras gástricas inducidas con etanol, indometacina, y ayuno-choque frío. El extracto disminuyó el índice de ulcera en concentraciones de 500-1000 mg/kg, aumento la

producción de mucosa. Las úlceras inducidas con indometacina no se vieron afectadas por el extracto. (Burguer, 2002. p.86).

Realizaron una investigación sobre las propiedades antiinflamatorias y analgésicas de los extractos de *Plantago australis*. De esta manera se comprobó que los extractos de las raíces, hojas, frutos tienen actividad antiinflamatoria y analgésica. (Palmeiro et al, 2002. Pp 1-4)

Estudiaron la toxicidad subcrónica oral del extracto crudo acuoso de las hojas del *Plantago australis*, la determinación se realizó en ratas a dosis de 8500 y 1700 mg/mL, por 60 días. En los resultados se encontró valores normales en los parámetros bioquímicos y hematológicos a excepción de ALT el cual fue mayor en las ratas que recibieron los 850 mg/mL. El análisis histopatológico no presentó alteraciones, especialmente en el hígado. (Palmiero et al, 2003. P.5).

Realizaron una investigación de la actividad bactericida y fungicida de algunas plantas medicinales utilizadas de forma tradicional en Venezuela, entre las cuales se encontró el *Plantago australis*, se utilizó cepas microbianas como *Escherichia coli enterotoxigénica*, *Escherichia coli enteroinvasiva* y *Escherichia coli enteropatogena*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida krusei* y *Candida albicans*. Los resultados indicaron que aunque no fue una de las plantas que presentan mayor actividad antibacteriana y anti fúngica en los ensayos realizados si mostró actividad bactericida y fungicida para alguno de los microorganismos utilizados. (Lapenna et al, 2003. P. 6)

Evaluaron la acción antibacterial del extracto metanólico de hojas de *Plantago australis* frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtili*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Los resultados obtenidos indicaron que el extracto utilizado era inactivo frente a las cepas valoradas. (Coelho et al, 2004. p.86).

Efectuaron un estudio sobre el uso medicinal de las plantas en la ciudad de Sao Luiz Gonzaga, se utiliza las flores, las hojas y las raíces del *Plantago australis* y que presentan propiedades antiinflamatorias para la garganta, dolor dental, problemas cardiacos, infecciones, gripe, tabaquismo, problemas de intoxicación de ácido úrico. (Francisco et al, 2007. Pp.1-11).

El uso del *Plantago australis* como antiinflamatorio se explica por la presencia de mucilago, el cual es común en las especies de este género, también indica que a esta planta se le realizaron ensayos de toxicidad subcrónica, y se evaluaron mediante parámetros sanguíneos, se encontró una alteración, aumento de las transaminasas alcalinas, las cuales se produjeron en dosis mucho más altas que las que se utilizan en humanos. (Francisco et al, 2007. Pp.1-11).

Realizaron una investigación de cuantificación del contenido de fenoles y flavonoides en extractos de las hojas de *Plantago australis* y se evaluó la actividad antioxidante por el método de DPPH. Utilizando HPLC se reveló la presencia de compuestos de tipo neolignan, derivados de ácido cinámico, flavonoides (glucósidos de luteína) y pigmentos antocianicos. (Nemitz et al, 2010. P.86).

1.2. Bases Teóricas

1.2.1. Llantén de páramo (*Plantago australis*)



Figura. 1-1 *Plantago australis*
Fuente: Aguilar Z, 2014.

NOMBRE COMÚN: Llantén de páramo, lengua de vaca, caá-yaqui (voz guaraní;seg. Hieronymus, 1882). **Castellano:** Llantén peludo, **Portugués:** Tanchagem, tansagem, **Inglés:** Plantain (Tolosa, 2014. <http://florabonaerense.blogspot.com>)

1.2.2. Clasificación taxonómica

Tabla 1-1. Clasificación taxonómica del llantén de páramo

REINO	PLANTAE
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Lamiales
FAMILIA	Plantaginaceae
GENERO	<i>Plantago</i>
ESPECIE	<i>australis</i>

Fuente: López, G. Pino, A. 2014.

1.2.3. Características generales

1.2.3.1. Descripción Botánica

Es una herbácea que puede medir entre 30 y 40 cm de alto, tiene una vida de 90 a 150 días, las hojas están ubicadas en la base en roseta miden hasta 40 cm de longitud, son lanceoladas, color verde, con tintes morados, cubiertas por vellosidades, y nervios muy notorios, las hojas tiernas se consumen en ensaladas, cremas, tortas. Las inflorescencias son largas pueden medir hasta 40 cm, tienen varias flores, son poco vistosas y se disponen a lo largo del eje elevado, miden 5 mm de largo y son verdes. Las semillas que miden de 1,7 a 2,3 mm de largo, se utilizan para tratar el estreñimiento, o puede ser usado como antiséptico bucal. (Aguilar et al, 2001. P. 79) (Sanabria . 2008. Pp. 1-3)

1.2.3.2. Origen y Distribución

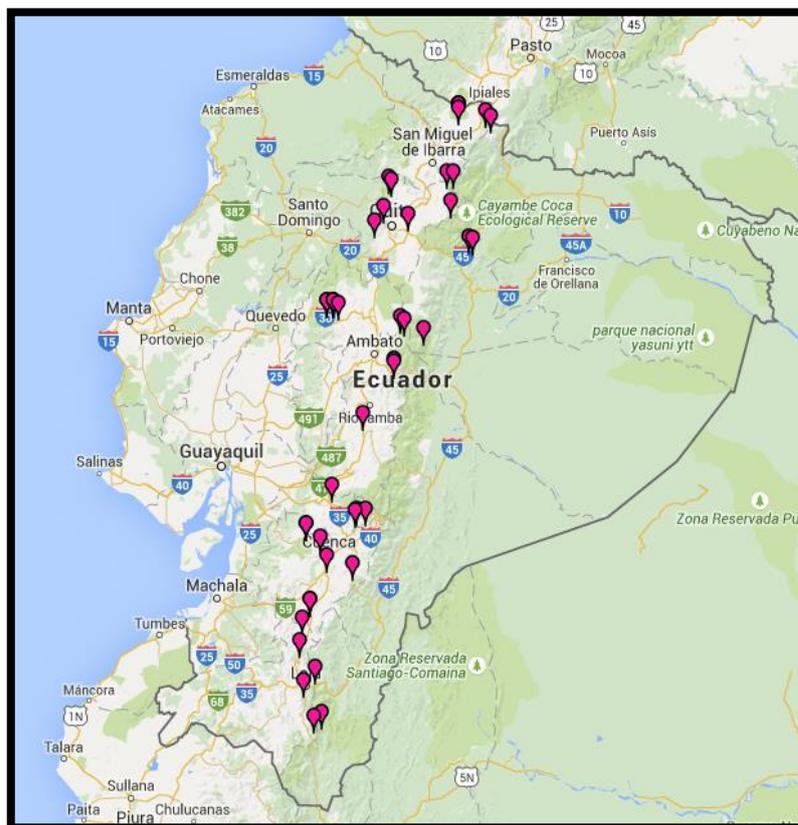


Figura. 2-1. Distribución geográfica de *Plantago australis*

Fuente: <http://www.tropicos.org>.

Tiene origen euroasiático y noroafriano, puede crecer en linderos y zonas nitrificadas, tiene una amplia distribución en todo el mundo, crece en Colombia en el subpáramo húmedo y en la

vegetación de pastos en el páramo. Está distribuida en por toda América Latina, desde el sur de Estados Unidos y México hasta la región patagónica de Argentina. (Carrizo y Isasmendi, 1998.<http://unsa.edu.ar/biblio/herbario/flora>) (Sanabria , 2008. Pp. 1-3).

En el Ecuador se encuentra en los páramos secos de la provincia de Chimborazo y Tungurahua, también lo podemos encontrar en las provincias de Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Morona-Santiago, Napo, Pastaza, Pichincha. (Cuesta et al, 2014. P.15) (Sanabria , 2008. Pp 1-3)

1.2.3.3. *Composición química*

Glucósidos irinoides (aucubina), mucilagos, taninos, ácido-fenil-carboxílicos, cumarinas, pectinas, sales orales, ésteres osídicos, fenil propanoides y flavonoides la planta en floración presenta vitamina C 0,167g/100g de hojas frescas. (Sanabria , 2008. Pp. 1-3) (López y Pino,2014.Pp. 4)

1.2.3.4. *Usos*

El *Plantago australis* en el Ecuador es conocido como llantén de páramo se utilizan las partes aéreas con fines medicinales esta especie es utilizada por los Kichwa de la Sierra-Loja para tratar la inflamación por calor (hinchazón), en Chimborazo es utilizada en infusión para tratar problemas de inflamación de los riñones, en Pichincha la infusión junto con otras plantas se bebe para dolor del hígado y riñones, en Loja se utiliza externamente para tratar úlceras y heridas, en Loja y Morona Santiago se usa para tratar el ardor de estómago, afecciones de hígado y riñones. En general esta planta se utiliza para limpiar y purificar la sangre, afecciones de vías urinarias, riñones e hígado, para bajar la hinchazón, junto con el matico es utilizada para lavados femeninos, y las hojas son utilizadas como cicatrizante de heridas de operaciones y úlceras externas, también ayuda a recuperarse de recaídas. (Sanabria , 2008. Pp.1-3) (Aguilar et al, 2001. P. 79)

En Venezuela se utiliza la planta por sus efectos espasmódicos y cicatrizantes (Lapenna et al, 2003). También es usada en Colombia como: las hojas se utilizan como antifebriles en infusión, el zumo de las hojas para curar úlceras intestinales, las semillas se utilizan en jaleas, jarabes, o tostadas y en polvo se utiliza como laxante. (Sanabria , 2008. Pp. 1-3)

1.2.3.5. Propiedades

Presenta actividad antitumoral, antimalaria, antiinflamatoria, cicatrizante, analgésica, anticonceptiva, y antiedematogénica. (Sanabria , 2008. Pp. 1-3)

1.2.4. La Piel y sus Componentes de la piel

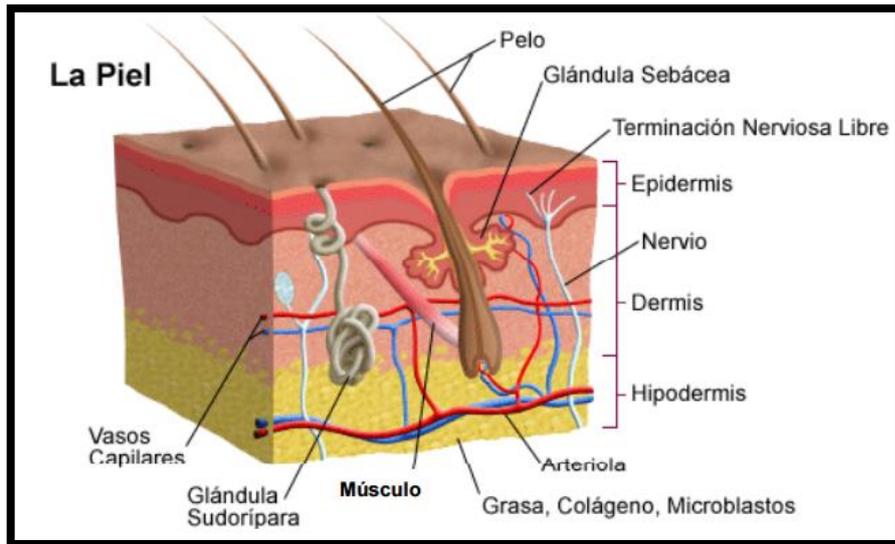


Figura. 3-1. Componentes de la Piel

Fuente: Hidalgo, O. 2010. Instituto Politécnico Nacional

1.2.4.1. Definición

La piel es el órgano más grande del cuerpo, ocupa el 20% del peso corporal. La función principal es proteger los órganos vitales del ambiente por lo que es una barrera protectora contra rayos UV, microorganismos, pérdida de fluidos, fuerzas mecánicas, y es un órgano sensitivo o de comunicación al exterior, recoge información a través de terminaciones nerviosas que detecta cambios en la presión, vibración, dolor, temperatura, para evitar o minimizar de esta manera los peligros externos. (Hidalgo, 2010. Pp. 17-18)

La piel está constituida por tres capas que son:

- Epidermis
- Dermis
- Hipodermis

1.2.4.2. Epidermis

Es una capa celular, no presenta nervios, estratificada verticalmente sentada sobre una membrana basal. Sus células se multiplican diferencian y renuevan cada 28 días. Tiene melanocitos no pigmentados, linfocitos, células de Langerhans (células dérmicas e inmunes) de Merkel (receptores del tacto) y queratinocitos (producen queratina). (Salazar, 2014. Pp.1-2)

Los queratinocitos están presentes en diferentes etapas de maduración están conformando cinco estratos:

- Estrato espinoso con queratinocitos recién divididos con espinas proyectadas
- Estrato granuloso por su aspecto granular, está comenzando un proceso de transformación gradual.
- Estrato lucido es una capa clara de células que contiene eleidina que se convierte en queratina.
- Estrato corneo.

Funciones: Impermeabilidad relativa, protección contra daño del medio, daños mecánicos como traumatismos. (Hidalgo, 2010, pp 17-18)

1.2.4.3. Dermis

Es una capa de tejido conectivo irregular, es tejido fibroso, presenta los anexos cutáneos (folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas). Contiene proteínas dérmicas como colágeno, elastina, reticulina, fibronectina, glicosaminoglicanos y ácido hialurónico que constituyen la matriz. Estos son secretados por los fibroblastos. La elastina le da elasticidad, el colágeno le da fuerza de tensión y la matriz provee de un medio semilíquido, para que se dé la colocación de tejido conectivo y células, favorece a la migración celular de nutrientes y requerimientos de reparación de heridas. (Hidalgo, 2010. Pp. 17-18)

Funciones: Inmunológicas, protectoras, defensa mecánica contra traumatismos, sostén de la piel, termorregulación y lubricación. (Hidalgo, 2010. Pp. 17-18)

1.2.4.4. Hipodermis

Conocido también como tejido subcutáneo, está bajo la dermis, sirve de sostén conecta todo lo que está sobre y bajo la dermis con los músculos, presenta macrófagos, fibroblastos y células cebadas, también nervios, vasos linfáticos, y sanguíneos que irrigan la piel. (Hidalgo, 2010. Pp. 17-18)

1.2.5. Heridas

Es el área de la separación de la continuidad del tejido en la cubierta cutánea, se da una pérdida de local de sustancias, dolor con estímulos dirigidos hacia el cerebro, órganos endocrinos, y liberación de sustancias celulares hacia la circulación la cual va a dar lugar a la respuesta postraumática, neuroendocrina y metabólica para ayudar en la curación. El proceso de reparación depende de la profundidad que sea la herida así como el tiempo para reparar el daño que puede ser de semanas, meses o incluso años. (Hidalgo, 2010, pp 17-18)

El estudio clínico de las heridas indica que existe dolor, solución de continuidad, hemorragia, separación de sus bordes. (Hidalgo, 2010. Pp. 17-18)

1.2.5.1. Tipos de Heridas

- *Según la integridad de la piel*

Herida abierta: Esta clase de herida presenta una solución de continuidad de la piel y mucosas, es causada por objetos cortopunzantes, pueden ser debido a una incisión quirúrgica, venopunción, o heridas con algún objeto. (Robalino, 2014. Pp. 9-10)

Heridas Cerradas: Estas no presentan solución de continuidad en la piel, es causado por golpe con cuerpos romo, fuerza de torsión dentro de este tipo de heridas están fracturas óseas, desgarros de vísceras. (Robalino, 2014. Pp. 9-10)

- *Según la gravedad de la lesión*

Herida superficial: Esta afecta solo a la epidermis, por causa de una aplicación a la superficie cutánea, dentro de este tipo esta la abrasión o quemaduras de primer grado. (Robalino, 2014. Pp. 9-10)

Heridas penetrantes: Este tipo de heridas presentan una solución de continuidad en la epidermis, dermis, tejidos u órganos profundos, es causado cuando un objeto ingresa profundamente en los tejidos del organismo. (Robalino, 2014. Pp. 9-10)

- *Según el agente que las provoca*

Heridas incisivas: Presentan bordes regulares y bien limitados son de continuidad nítida, se puede distinguir dos dimensiones extensión y profundidad. Dentro de este tipo de heridas se encuentra las producidas por navaja o bisturí. (Robalino, 2014. Pp. 9-10)

Heridas contusas: Presenta bordes irregulares y desflecados es causado por objetos romos.

Heridas penetrantes: Provocadas por agentes u objetos cortopunzantes. (Robalino, 2014. Pp 9-10)

1.2.6. Cicatrización

1.2.6.1. Definición

Es un proceso biológico mediante el cual se cura una herida a expensas del tejido conjuntivo o por regeneración de los tejidos afectados, la cual deja una cicatriz sea estética o no. Es un proceso complejo ya que cierra la herida por regeneración del epitelio y el remplazo de la dermis por un tejido conjuntivo fibroso constituido por colágeno, de características diferentes de la piel normal. Las nuevas fibras son más cortas y desorganizadas por lo que la cicatriz no llega a tener la misma fuerza tensora de la piel normal. (Orozco, 2013. Pp. 7-8)

1.2.6.2. Tipos de cicatrización

Por primera intención: Es una cicatrización primaria se da en las heridas operatorias y las incisivas, este proceso requiere ausencia de infección, hemostasia perfecta, afrontamiento correcto de bordes, ajuste por planos anatómicos de la herida en la sutura. (Jordi, 2008. Pp. 6)

Por segunda intención: Este tipo de cicatrización es lento a expensas de un tejido de granulación bien definido, deja una cicatriz larga retraída y antiestética, se da cuando existe infección, no hay un adecuado ajuste de los bordes de la herida y cuando hay pérdida de sustancia. (Jordi, 2008. Pp. 6)

Por tercera intención: Es cuando se reúne los dos bordes de la herida, en fase de granulación, con sutura secundaria. (Jordi, 2008. Pp. 6)

Por cuarta intención: Cuando se acelera la cura de una herida utilizando injertos cutáneos. (Jordi, 2008. Pp. 6)

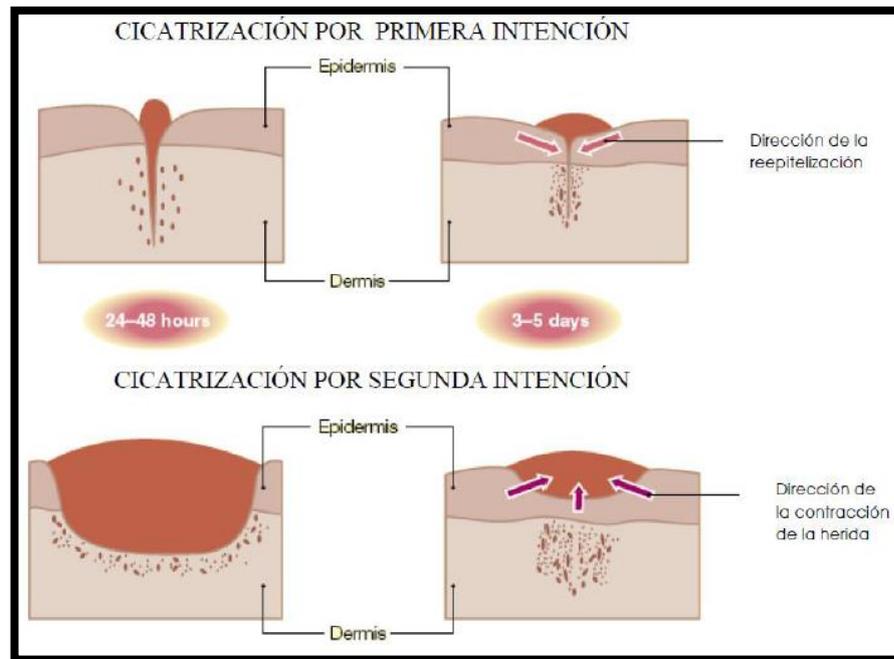


Figura. 4-1. Tipos de cicatrización.

Fuente: Robalino, C.2014.Facultad de Ciencias. ESPOCH.

1.2.6.3. Fases de la cicatrización

Son conocidos como fases de reparación cutánea, útiles para restablecer la integridad del área lesionada. Se dividen en tres fases cada una tiene periodo de tiempo, elementos celulares y extracelulares específicos. (Jordi, 2008. Pp. 6)

Las fases son: Inflamatoria (hemostasia e inflamación); Proliferativa (proliferación, migración, epitelización, y angiogénesis) y Remodelación Tisular (síntesis de colágeno, matriz, contracción y remodelación) (Jordi, 2008. P. 7)



Figura. 5-1. Fases de reparación de las heridas.
Fuente: Hidalgo, O.2010. Instituto Politécnico Nacional

Fase inflamatoria (días 1 al 5)

Es la primera fase en la cual los líquidos que contienen proteínas plasmáticas, células sanguíneas, fibrina y anticuerpos fluyen hacia la herida, para formar una costra en la superficie que va a impedir la salida de dicho líquido y evitar que exista una contaminación bacteriana. La inflamación ocurre en algunas horas, se da por el traslado de los leucocitos al área lesionada, provocando un edema, dolor, fiebre, enrojecimiento alrededor de la herida. Los leucocitos después se degradan para eliminar los restos celulares y así fagocitar el material y microorganismos extraños. Los monocitos se convierten en macrófagos, y fagocitan los residuos que quedan así como también producen enzimas proteolíticas, por último en los bordes de la piel, las células basales migran para cerrar la herida, y los fibroblastos que están en el tejido conjuntivo empiezan la reconstitución del tejido no epitelial. (Jordi, 2008. Pp. 7-8)



Figura 6-1. Fase Inflamatoria.
Fuente: Hidalgo, O.2010. Instituto Politécnico Nacional

Fase proliferativa (días 5-14)

En esta fase los fibroblastos migran hacia la herida, los cuales al unirse a las enzimas de la sangre y células del tejido circundante forman colágeno y sustancia fundamental (fibrina, fibronectina), las cuales son encargadas de adherir los fibroblastos al sustrato. Los fibroblastos contienen miofiblastos que contribuyen a la contracción de la herida, el depósito de colágeno empieza al quinto día y aumenta la fuerza de tensión de la herida. Las proteínas plasmáticas contribuyen en la síntesis de tejido fibroso. Además reemplaza componentes dañados del tejido conjuntivo, los vasos linfáticos se recanalizan, los vasos sanguíneos forman yemas, forma tejido de granulación, y capilares para nutrir los fibroblastos. (Jordi, 2008. Pp. 7-8)

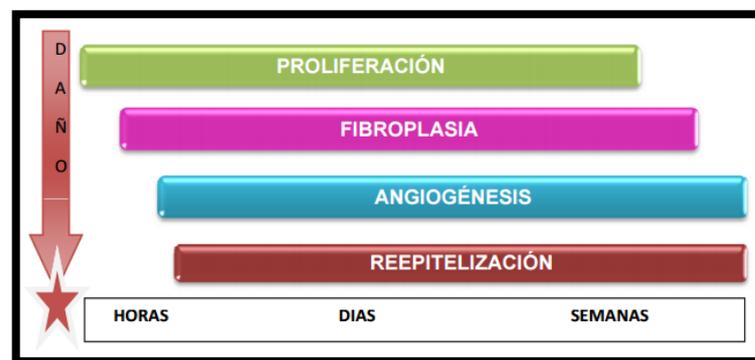


Figura. 7-1. Fase proliferativa.

Fuente: Hidalgo, O.2010. Instituto Politécnico Nacional

Fase de remodelación tisular (día 14 en adelante)

La cicatrización empieza en la fase II y va disminuyendo paulatinamente. La fuerza de tensión aumenta debido a la formación de entrecruzamientos de fibras de colágeno, la piel recupera su fuerza original. El contenido de colágeno permanece constante, se forma la cicatriz, producto del depósito de tejido conjuntivo fibroso y las células que ya no se requieren son removidos mediante apoptosis. (Jordi, 2008. Pp. 7-8)



Figura. 8-1. Fase de remodelación tisular

Fuente: Hidalgo, O.2010. Instituto Politécnico Nacional

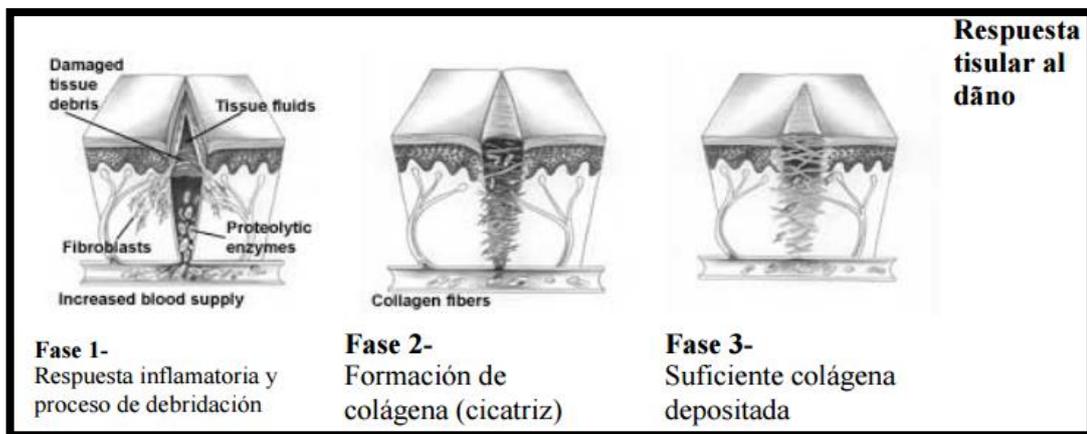


Figura 9-1. Fases de la cicatrización.

Fuente: (Jordi, 2008)

1.2.6.4. Factores que influyen en la cicatrización

Entre las causas principales de que no se dé una buena cicatrización están la hipoxia, isquemias, infecciones, edemas y anomalías metabólicas. Debido a que la tensión mínima de oxígeno para las heridas debe ser de 30 mmHg, por otra parte las infecciones mantienen la herida en la fase inflamatoria y así no se da paso a las otras fases, el edema actúa como barrera para el oxígeno y nutrientes porque incrementa la etapa de difusión. Los trastornos metabólicos también afectan la cicatrización y depende de la anomalía. (Hidalgo, 2010. p.11)

A continuación se presenta otros factores:

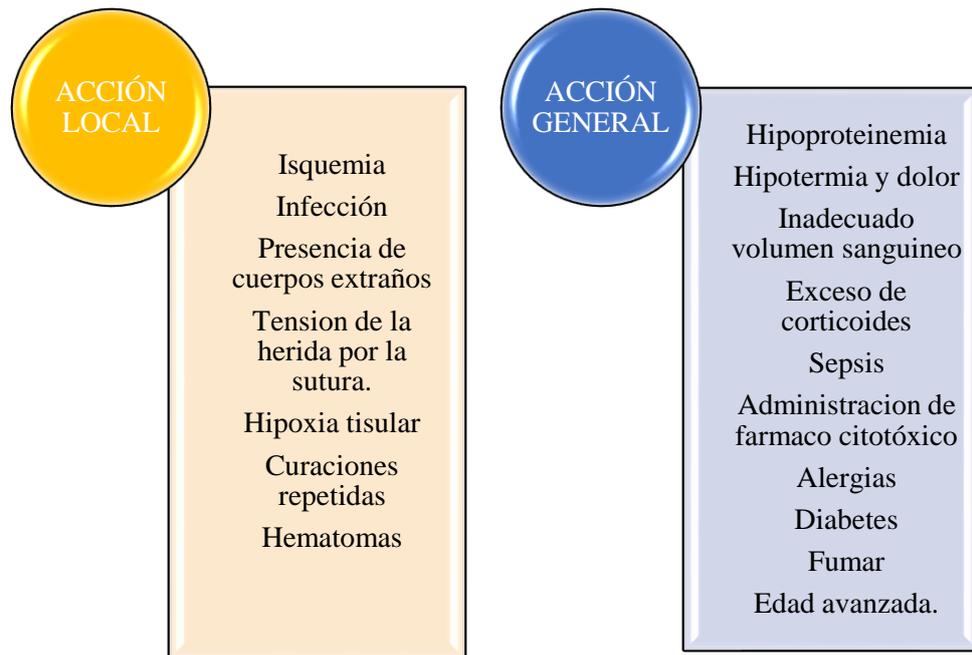


Figura. 10-1. Otros factores que influyen en la cicatrización

Fuente: Hidalgo, O.2010. Instituto Politécnico Nacional

1.2.6.5. Complicaciones

Cuando se genera una herida ya sea accidentalmente o por disección, la persona queda vulnerable a una infección y sus complicaciones. Por lo que los problemas mayores son infección y separación de la herida. (Orozco, 2013. p. 13)

Infección: Es una de las más severas que afecta al paciente. Es la contaminación de la herida por microorganismos virulentos que si no se le da un tratamiento adecuado puede provocar efectos graves como gangrena o muerte. (Orozco, 2013. p. 13)

Separación de la herida: Llamada también dehiscencia se presenta con frecuencia en pacientes de edad avanzada, afecta más a los hombres que mujeres y ocurre entre los días quinto y doceavo después de una operación. (Orozco, 2013. p. 13)

1.2.6.6. Cicatrización Patológica

Es aquel que no devuelve la integridad de la piel ya sea anatómica, funcional o estética y puede darse por falta de cicatrización o una producción excesiva de la cicatriz. Se puede clasificar en 2 tipos:

Cicatrización insuficiente: Es aquella que forma una cicatriz inestable y heridas crónicas.

Cicatrización excesiva: Es aquella que genera queloides los cuales son una cicatriz en la piel más grande que la herida, cicatrices hipertróficas, esta crece en la piel pero es muy pequeña y contracturas. (Salem, C. 2002. Pp. 1-8)

Algunos autores dicen que los queloides son tumores benignos que se desarrollan en la piel, compuesto de masas de tejido fibroso parte de la cual puede estar hialinizado. (Andrade; Sepulveda, 2014, p 2) (Melega, 1992, pp 9-13)

1.2.6.7. Células que intervienen en la cicatrización

Hematíes o eritrocitos: Aportan oxígeno a la célula y eliminan el CO₂. (Navarro, 2005. Pp. 1-5)

Plaquetas o trombocitos: Inician el proceso de la coagulación de la sangre. Además producen importantes factores de crecimiento necesarios para la cicatrización. (Navarro, 2005. Pp. 1-5)

Leucocitos: Tienen como función fundamental la defensa inmunológica del organismo. (Navarro, 2005. Pp. 1-5)

Granulocitos y Linfocitos: Tienen esencial importancia en el proceso de la cicatrización. Son atraídos por sustancias liberadas en la multiplicación bacteriana (quimiotaxis). Además, los linfocitos segregan otras sustancias que atacan la superficie de las bacterias, preparándolas para ser digeridas por los fagocitos. (Navarro, 2005. Pp. 1-5)

Monocitos o fagocitos: Son leucocitos especializados que ingieren y destruyen material muerto o extraño. Se transforman en macrófagos, además de producir enzimas y factores de crecimiento. Estos solo se encuentran en el tejido. (Navarro, 2005. Pp. 1-5)

Fibroblastos: Son células responsables de síntesis de colágeno y de la contracción del tejido cicatricial (miofibroblastos). (Navarro, 2005. Pp. 1-5)

1.2.7. Metabolitos secundarios que intervienen en la cicatrización

Compuestos fenólicos

Existe una gran cantidad de compuestos fenólicos en el reino vegetal. Que presenta en común un anillo bencénico. (Marcano, 2002. p. 134)

Flavonoides

Son pigmentos amarillos presentes en los vegetales, son de bajo peso molecular comparten un esqueleto en común de difenilpiranos (C₆-C₃-C₆). Se encuentran como O- glicósidos en de forma natural, aunque también como C-glicósidos. Poseen un origen biosintético común y un mismo elemento estructural básico con diferentes grados de oxidación, dando distintas familias estructurales: flavonas, flavonoles, flavanonas, catequinas (o flavanoles), antocianos, isoflavonas, chalconas y auronas (Orozco, 2013. p. 16)

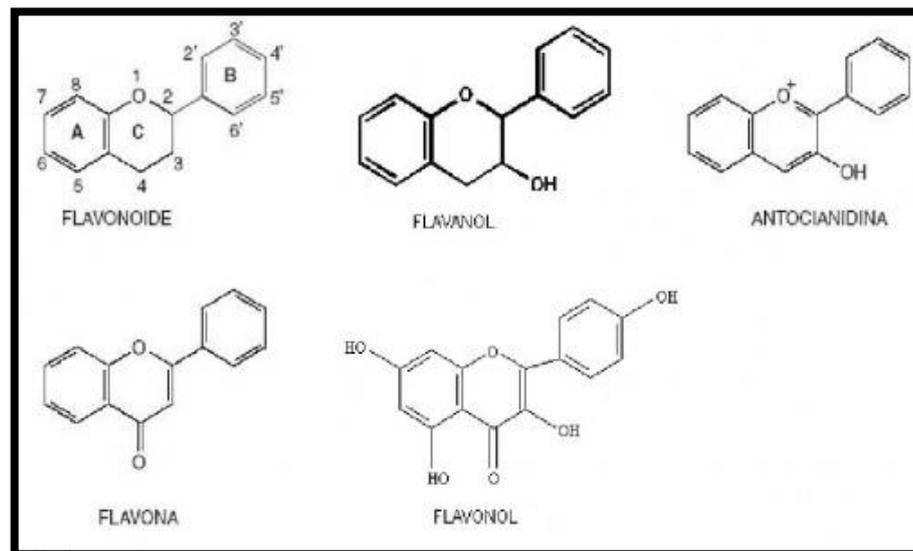


Figura. 11-1. Estructuras Básicas de los Flavonoides

Fuente: Hidalgo, O.2010. Instituto Politécnico Nacional

Existen como 900 flavonoides naturales, están distribuidos entre las plantas, libres o como glicósidos; estos últimos ayudan a proporcionar color a las flores, frutos y hojas. Las agliconas son más usuales en tejidos leñosos. Los flavonoides exhiben todos los matices de solubilidad, desde totalmente soluble en el agua hasta insolubles en ella, pero solubles en éter etílico, pasando por los solubles en etanol, son insolubles en éter de petróleo por lo que permite desengrasar un

material antes de extraerlo. Los que tienen mayor interés farmacológico son las flavonas, flavonoles y flavanonas. (Orozco, 2013. p. 16)

Los flavonoides que presentan actividad cicatrizante como la quercetina, kaempferol. Está presente en casi todas las plantas vasculares. Dándoles protección contra agentes ambientales y depredadores. En presencia de vitamina C producen un aumento de la fibronectina extracelular y colágeno al producir la proliferación de fibroblastos normales de la piel. Las antocianidinas favorecen la angiogénesis en las heridas y su cierre. Protegen los vasos sanguíneos de infecciones. (Cabezas, 2014. p.29)

Los flavonoides también presentan actividad antiinflamatoria y analgésica gracias a los efectos de los antioxidantes y a su capacidad de actuar contra la histamina y otros mediadores del proceso inflamatorio como son las prostaglandinas y los leucotrienos. (Orozco, 2013. p.16)

Taninos

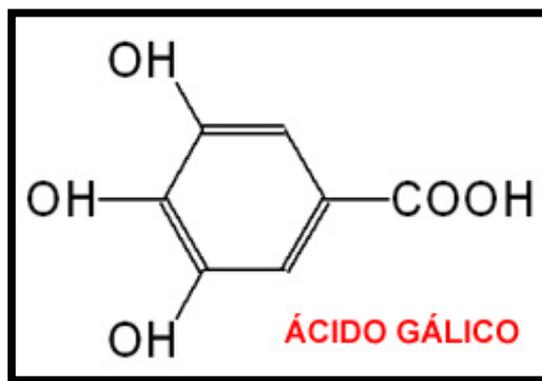


Figura. 12-1. Estructuras del ácido gálico.
Fuente: Hidalgo, O.2010. Instituto Politécnico Nacional

Constituidos por compuestos hidrosolubles con estructuras polifenólicas que pueden precipitar a ciertas macromoléculas de origen vegetal, presentan un peso molecular elevado, sabor astringente actúan uniendo las proteínas de la piel y de las mucosas. No permiten la contaminación bacteriana en la piel y mucosas. Se oxidan con facilidad, especialmente en medio ácido los taninos se disuelven en agua formando coloides y son solubles en alcoholes y acetona. (Orozco, 2013. P.16) (Kuklinski, 2000. Pp. 106-116)

Taninos pueden ser hidrolizables (ácidos fenólicos) y taninos condensados (polímeros de flavonoles). Favorecen a la coagulación y la cicatrización de la piel acelera la curación de las heridas, ya que la costra se forma con la unión de las proteínas de los taninos y crea un medio seco que impide el desarrollo de bacterias. (Cabezas, 2014. P.28)

Glucosinolatos.

Llamados también tioglucósidos, están en las plantas dicotiledóneas, presentan algucón o genina que se utiliza con carácter terapéutico. Es utilizado para tratar quemaduras de sol, para el envejecimiento, promueve la cicatrización de las heridas. (Cabezas, 2014. P.30)

1.2.8. Métodos de extracción de metabolitos en el material vegetal.

Existen diferentes métodos de extracción de metabolitos secundarios de las plantas utilizando diferentes solventes. Una buena extracción depende del tipo de solvente utilizado, la temperatura, y agitación. Ya que existen estudios que demuestran que al utilizar el ultrasonido en la extracción se obtiene resultados significativamente más eficientes. (Martínez et al, 2011, Pp.1-6)

Tabla 2-1. Diferentes tipos de extracción de metabolitos secundarios.

EXTRACCIONES	TEMPERATURA	TIEMPO	SOLVENTE
Maceración	T ambiente	Horas-días	Agua Mezclas hidroalcohólicas Glicerina
Digestión	T >ambiente	Horas-días	Agua Mezclas hidroalcohólicas Glicerina
Infusión	T próxima a ebullición	1-2 minutos Hasta 30 min.	Agua
Decocción	T de ebullición	15-30 min.	Agua

Fuente: Martínez, Juan. Scientia et Technica. Año 2011. Universidad Tecnológica de Pereira.

1.2.9. Medicamentos Cicatrizantes

Estos medicamentos contienen ingredientes que son capaces de disminuir la apariencia de las cicatrices, favorece la regeneración y reparación de los tejidos para su cicatrización, ayudan en la eliminación de células muertas y reponen con células nuevas.

Actividad cicatrizante: La cicatrización de heridas involucra varias actividades como coagulación, inflamación, formación de tejido de granulación, formación de matrices y remodelación de tejidos.

1.2.10. Cicatrizantes comerciales

Este tipo de medicamentos son los más usados, los cicatrizantes que están en el mercado poseen en su formulación un antibiótico, productos como esteroides corticoides o antimicóticos, para combatir las bacterias que pueden estar en la herida retrasando su cierre. El cicatrizante para el tratamiento de heridas y úlceras así como de quemaduras cutáneas por radioterapia esta la trolamina. (Vademécum farmacoterapéutico, 2015. <http://www.vademecum.es>)

Entre los cicatrizantes comerciales más usados está: El acetato de prednisolona 0,5 g y sulfato de neomicina 0,5 g, en donde el acetato de prednisolona es un dermocorticoide de forma micronizada con efecto antialérgico y antiinflamatorio, por otro lado el sulfato de neomicina es un antibiótico, no provoca hipersensibilidad y no es inactivo por los exudados. (Vademécum farmacoterapéutico, 2015. <http://www.vademecum.es>)

1.2.10.1. Antibióticos y quimioterápicos para uso dermatológico

Antibióticos

- La Neomicina es el que más se usa para aplicación tópica, presenta acción bactericida, también inhibe la síntesis de proteínas bacterianas ya que se une de manera irreversible a la subunidad 30S de las bacterias. (Robalino, 2014. P.14)
- El ácido fusídico está relacionado con las cefalosporinas desde el punto de vista químico. Inhibe la síntesis proteica mediante translocación (paso final de la síntesis de cadena peptídica). (Robalino, 2014. P.14)
- Sulfadiazina de plata es un anti infecciosos de uso tópico, su uso es para tratar y prevenir infecciones en heridas y quemaduras de segundo y tercer grado. Lo que se conoce de este medicamento es que provoca la lisis de las bacterias atacando su membrana y pared celular. (Robalino, 2014. P.14)

1.2.10.2. Preparados dermatológicos con corticoides

Los corticoides tópicos derivan de la hidrocortisona y cortisol que tiene actividad glucocorticosteroide y mineralocorticosteroide. Presenta efecto antiinflamatorio, vasoconstrictor,

inmunosupresor y antiproliferativo sobre la piel. Dentro de este tenemos la hidrocortisona, betametasona, prednisona. (Robalino, 2014. P. 14)

1.2.11. Ensayos biológicos

Este tipo de ensayos se utiliza para la evaluación de la actividad de ciertas drogas se realizan en seres vivos, órganos intactos o seccionados, y ayuda a determinar la potencia de una droga y sus preparados. Estos ensayos son más selectivos, y más sensibles que los ensayos físico-químicos, requieren largo tiempo para su realización y son menos exactos ya que su respuesta está condicionada por muchos factores. Mediante este tipo de ensayos se puede comprobar la verdadera actividad de la droga ya que en muchos casos su acción no es dada solo por el principio activo sino que viene dada por una sinergia entre varias sustancias. (Fresno, 1993. Pp. 81-82)

El uso de ensayos biológicos es importante cuando se quiere introducir una nueva droga o fármaco en terapéutica ya que ayuda a apreciar las propiedades farmacológicas de un nuevo fármaco en estudio y así conocer su actividad farmacológica y valor terapéutico. (Fresno, 1993. Pp. 81-82)

1.2.11.1. Animales de Laboratorio (Ratones)

El desarrollo de mejores medios para proteger la salud y bienestar del hombre y animales demanda a recurrir al uso de animales en experimentación. Deben ser de la especie y calidad apropiada y en un número no mayor a lo que se requiera para obtener resultados válidos. Los animales deben ser tratados como individuos sensibles, deben ser bien cuidados para evitarles disconfort, diestrés, o dolor. Todos los animales utilizados en investigación deben ser tratados tomando en cuenta los Principios Éticos Internacionales para Investigación Biomédica con Animales. (CIOMS, 2014. Pp. 1-2)



Figura. 13-1. Animales de experimentación
Fuente: Bioterio, ESPOCH

Miden de largo de 7 a 11 cm sin tomar en cuenta la cola, pesan alrededor de 15 a 20 g tienen una vida media de 4-6 meses en libertad, pero en cautiverio viven algunos años. Las hembras son sexualmente maduras a las 5-6 semanas, los machos necesitan unos días más. Presentan un sentido del olfato muy desarrollado, poca visión, y no distinguen colores. Son susceptibles a los cambios ambientales debidos su pequeño tamaño cuando varía la temperatura en 2- 3 °C. (Cabezas, 2014. Pp. 29-32)

Se utilizan ratones debido a que son de fácil cuidado y mantenimiento, por eficacia y reproducibilidad, costos bajos de manutención, periodos de vida cortos que son idóneos para estudios de investigación. (Cabezas, 2014. Pp. 29-32)

Taxonomía

Tabla 3-1. Clasificación taxonómica de los animales de experimentación

Clase	Mammalia
Orden	Rodentia
Familia	Muridae
Genero	Mus
Especie	musculus

Fuente: Cabezas, G. 2014. Facultad de Ciencias. ESPOCH.

Microambiente y macroambiente

El lugar adecuado debe brindar las condiciones ambientales y de manejo adecuadas para garantizar la salud de los animales de experimentación y su comodidad, para que sus patrones metabólicos y comportamiento sean los normales y estables para obtener respuestas confiables.

Macroambiente: Es el ambiente físico del encierro secundario, temperatura, humedad, ventilación, luz y calor. (Genovese, P. 2009. <http://www.urbe.fmed.edu>.)

Microambiente: Ambiente físico que rodea al animal, es el encierro primario. Jaulas, alimento, agua, cama. Debe ser un lugar fresco y seco para el desarrollo fisiológico adecuado de los animales, se debe ser un ambiente seguro que impida los accidentes y que se escapen y que sean se puedan observar con facilidad. (Genovese, P. 2009. <http://www.urbe.fmed.edu>.)

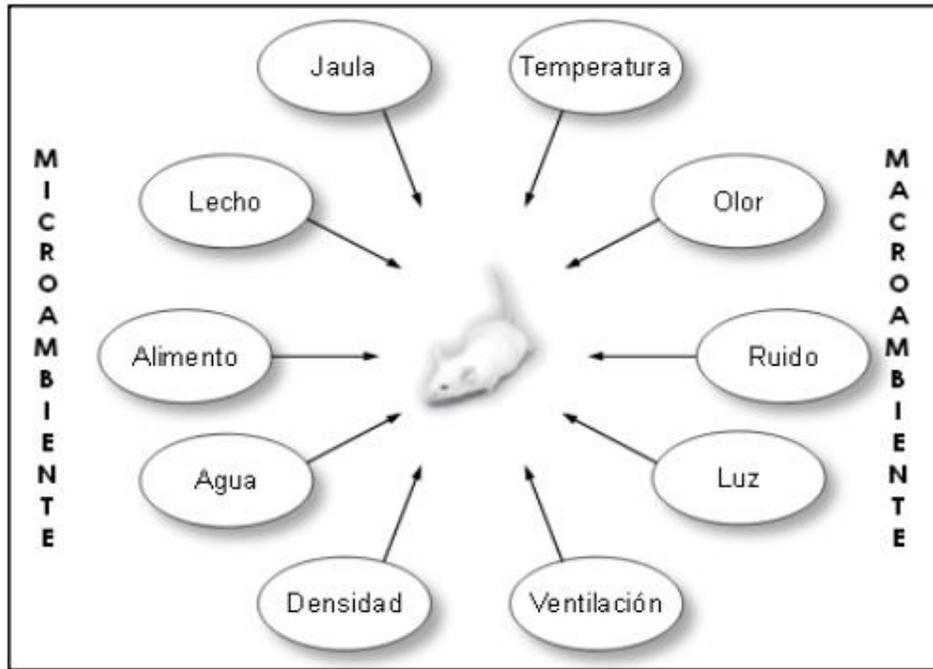


Figura. 14-1. Microambiente y Macroambiente.
Fuente: Cabezas, G 2014. Facultad de Ciencias. ESPOCH.

Los factores principales que afectan a los animales de experimentación son:

- Climáticos: temperatura, humedad relativa, ventilación, etc.
- Físicoquímicos: iluminación, ruido, composición del aire, sanitizantes, cama, etc.
- Habitacionales: forma, tamaño, tipo y población de las jaulas. Deben ser libres de polco, pigmentos y sustancias tóxicas.
- Nutricionales: dieta, agua, las cuales deben ser no contaminada y nutricionalmente adecuada. Administradas diariamente según los requerimientos de las especies. La alimentación debe ser transportada y almacenada en las mejores condiciones. Los utensilios utilizados para la alimentación y agua deben ser de fácil acceso y limpios.
- Microorganismos y parásitos. (Ferreira, B. 2002. Pp.1-5)

El macro y microambiente inadecuado pueden llegar a afectar la salud, el comportamiento y bienestar de los animales de experimentación, de esta manera influye en los resultados de la investigación. (Mrad, A. 2001. Pp.1-9)

El personal que va a manejar los animales de experimentación debe portar ropa estéril, gorro, cubre zapatos, guantes y mascarilla.

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar de investigación

El presente trabajo de investigación se realizó en la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO en la Facultad de Ciencias.

- Laboratorio de Productos Naturales, Investigación y Desarrollo
- Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos
- Laboratorio de Análisis Instrumental.
- Bioterio de la Facultad de Ciencias

2.2. Materiales, equipos y reactivos

Tabla 4-2. Materiales, equipos y reactivos. ESPOCH. Agosto 2015.

MATERIALES	REACTIVOS	EQUIPOS
Vasos de precipitación de 250 , 100 , 50 mL	Agua destilada	Rota vapor R220
Tubos de ensayo	Alcohol potable	Balanza analítica
Gradilla	Agua potable	Desecador
Piseta	Extracto de <i>Plantago australis</i>	Refrigerador
Trípode	Lamoderm	Refractómetro
Papel filtro	AlCl ₃	Estufa
Embudo	Ácido clorhídrico	pH metro
Pipetas 1,5,10 mL	Alcohol amílico	Espectrofotómetro UV-VIS
Probeta	Ácido sulfúrico	Bomba de presión
Balón esmerilado	Cloroformo	Computadora
Matraces	Reactivo de Wagner	Cámara digital
Reverbero	Reactivo de Sudan III	Mufla
Capsulas de porcelana	Reactivo de Dragendorff	Calculadora
Varilla de vidrio	Reactivo de Mayer	
Balones volumétricos	Reactivo de Baljet	
Puntas plásticas para pipetear	Reactivo de Fehling	
Embudo de separación	Magnesio metálico	
Guantes	Cloruro férrico	

Mascarilla	Éter di etílico	
Picnómetro	Amonio 5%	
Pera de succión	Formol 10%	
Espátula	Quercetina	
Crisol	NaNO ₂	
Papel aluminio	Acetona	
Pinzas para tubos	Ácido acético glacial	
Algodón	Ácido fórmico	
Bisturí	Acetato de etilo	
Capilares	Sulfato de cerio	
Fósforo		
Balón de aforo		
Cuba de vidrio		

Realizado por: Asto V. 2015.

2.3. Técnicas y Métodos

2.3.1. Recolección, Selección y Lavado del material vegetal.

Se recolecto 2 Kg de hojas de *Plantago australis* en el parque Nacional Sangay, sector Atillo en la Laguna Negra que pertenece a la provincia de Chimborazo, Cantón Guamote, Parroquia Cebadas a una altitud de 3539 m.s.n.m en las coordenadas: x=777785, y=9759205. Zona 17 S. Las muestras se colocaron en fundas plásticas para su transportación.

Se hizo una selección adecuada del material vegetal, desechando las hojas dañadas y otros materiales extraños. Se hizo un lavado y desinfección de las hojas eliminando tierra, polvo y material extraño, se lavó las hojas en agua 10 veces hasta que se eliminó la presencia de sustancias extrañas. (Miranda, 1991. Pp. 28-33)

Para mejorar el rendimiento de la extracción y la reproducibilidad de las mismas se debe someter el material vegetal a una serie de operaciones: Se debe hacer su identificación taxonómica. Seleccionar la parte del material a utilizar. Se debe desecar el material vegetal bajo condiciones controladas así evita la formación de compuestos químico. El proceso debe ser rápido a una temperatura moderada y en aire caliente. Se pulverizo las hojas secas ya que muchos de los principios activos en las plantas se encuentran en el citoplasma de la célula vegetal o formando sales que están incrustadas en las células. Para facilitar la extracción la droga es sometida a un troceado para que así se destruyan las estructuras celulares y mejoren el rendimiento. El almacenamiento debe ser en un lugar fresco y seco. (Fresno, 1993. P. 84)

2.3.2. *Control de calidad del material vegetal mediante métodos físico-químicos*

Mediante la realización de estas determinaciones se va a garantizar la calidad del material vegetal que presente las condiciones sanitarias e higiénicas adecuadas.

2.3.2.1. *Determinación de cenizas totales, solubles en agua e insolubles en ácido*

Las cenizas totales es producto de la incineración de una droga, las cenizas solubles en agua y las cenizas solubles en ácido clorhídrico se realizan a partir de las cenizas totales.

- *Para la determinación de cenizas totales se debe:*

- Se taró una cápsula de porcelana a 105°C hasta peso constante, Aprox. 2 horas.
- Se pesó 3 g de material vegetal en polvo en la cápsula de porcelana.
- Se carbonizó la muestra en un reverbero.
- Se incineró la muestra en un horno mufla a 700°C por 2 horas.
- Se colocó en un desecador la muestra por 30 min y pesar las muestras hasta peso constante.
- La determinación se debe hacer por triplicado. (Miranda, 1991. Pp. 28-33)

$$C = \frac{m_2 - m}{m_1 - m} \times 100$$

C: porcentaje de cenizas totales

m: masa de la cápsula vacío (g)

m1: masa de la cápsula con la muestra (g)

m2: masa de la cápsula con las cenizas (g)

100: factor matemático para cálculos. (Miranda, 1991. Pp. 28-33)

- *Para la determinación de cenizas solubles en agua se debe:*

- Para esta determinación se debe partir de las cenizas totales.
- Se añadió 20 mL de agua destilada.
- Se tapó el crisol y se somete al calor por 5 min.
- Se filtró la solución utilizando papel filtro cuantitativo es decir libre de cenizas
- El papel filtro con el residuo se transfiere a la cápsula inicial.

- Se carbonizó en un reverbero hasta desaparición de humo.
- Se transfirió la cápsula a un horno mufla a 700 °C por 2 horas.
- Transcurrido el tiempo se coloca la cápsula en el desecador por 30 min y se pesa
- La determinación debe realizarse por triplicado. (Miranda, 1991. Pp. 28-33)

$$Ca = \frac{m2 - ma}{m1 - m} \times 100$$

C: porcentaje de cenizas solubles en agua.

m2: masa de la cápsula con las cenizas (g)

ma: masa de la cápsula con las cenizas insolubles en agua (g)

m1: masa de la cápsula con la muestra (g)

m: masa de la cápsula vacía (g).

100: factor matemático para cálculos. (Miranda, 1991. Pp. 28-33)

- *Para la determinación de las cenizas insolubles en ácido clorhídrico se debe:*

- Para esta determinación de debe partir de las cenizas totales.
- Se añadió 3 mL de HCl al 10%.
- Se tapó la cápsula con un vidrio reloj y se calienta en baño de agua hirviendo por 10 min.
- Se lavó el vidrio reloj con 5 mL agua caliente y unirlo al contenido de la cápsula.
- Se filtró la solución utilizando papel filtro libre de cenizas.
- Se lavó el residuo hasta que el filtrado acidulado al cual se le adiciona de 1 a 2 gotas de solución de AgNO₃ 0,1 mol/L no presente cloruros.
- El papel filtro con el residuo se deseca a 105°C.
- Se transfirió al crisol inicial, se carboniza e incinera en horno mufla a 700°C por 2 horas.
- Después se coloca en un desecador por 30 min y se pesa. (Miranda, 1991. Pp. 28-33)

$$C(HCl) = \frac{m1 - m2}{m1 - m} \times 100$$

C (HCl): porcentaje de cenizas insolubles en HCl. (%)

m: masa de la cápsula vacía (g)

m1: masa de la capsula con las cenizas totales (g)

m2: masa de la cápsula con las cenizas finales (g)

100: factor matemático para cálculos. (Miranda, 1991. Pp. 28-33)

2.3.2.2. *Determinación de Humedad*

El contenido de agua en el material vegetal es un parámetro de gran importancia que se debe controlar ya que cuando se encuentra en cantidades altas puede dar lugar al crecimiento de hongos, insectos, y de esta manera se deteriora la droga. (Miranda, 1991. Pp. 28-33)

Método gravímetro. Pérdida por desecación.

- Se taró la cápsula de porcelana por 1 hora a 105°C.
- Se pesó 2 g de muestra y transferir a la cápsula de porcelana tarada.
- Se colocó la cápsula en la estufa a 105°C por 3 h.
- Se transfirió la cápsula al desecador, se deja 15 min y se pesa
- Nuevamente se coloca en la estufa la cápsula por 1 hora se transfiere al desecador se deja 15 min y se pesa hasta tener un peso constante. (Miranda, 1991. Pp. 28-33)

$$\%H = \frac{m_2 - m_1}{m_2 - m} \times 100$$

%H: pérdida en peso por desecación

m: masa de la cápsula vacía (g)

m1: masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g)

m2: masa de la cápsula con la muestra de ensayo (g)

100: factor matemático para cálculos (Miranda, 1991. Pp. 28-33)

2.3.2.3. *Determinación de sustancias solubles*

Se basa en la extracción de las sustancias solubles, utilizando algún solvente que puede ser agua, alcohol o mezclas de estos, mediante métodos de extracción como maceración y evaporación de una alícuota de extracto.

- Se taró una cápsula de porcelana.
- Se pesó 5 gramos de material vegetal en polvo y se coloca en un Erlenmeyer de 250 mL.
- Se Añadió 100 mL del disolvente en este caso alcohol al 96°.
- Se tapó y agitó por 6 horas, luego se deja reposar hasta el día siguiente.
- Se agitó por 30 min y dejar reposar por el mismo tiempo.

- Se filtró utilizando papel filtro.
- Del sobrenadante se tomó una cantidad de 20 mL y se colocó en la cápsula tarada.
- Se evaporó en baño de agua caliente hasta sequedad y se colocó en estufa de aire caliente por 3 horas a 105°C.
- Se enfrió en un desecador por 15 minutos y se pesa. (Miranda, 1991. Pp. 28-33)

$$Ss = \frac{r * 500 * 100}{m(10 - H)}$$

Ss: Sólidos Solubles. (%)

H: Humedad (%)

500 y 100: factor matemático para cálculos

r: residuo de la muestra (g)

m: masa de la muestra (g) (Miranda, 1991. Pp. 28-33)

2.3.3. Tamizaje fitoquímico

Mediante ensayos fitoquímico se identificó cualitativamente los metabolitos que se encuentran presentes en el *Plantago australis*. Para lo cual es necesario que el material vegetal a utilizar sea seco y pulverizado y así someter a pruebas de coloración y precipitación.

Se realiza extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente para obtener los extractos a utilizar para el “screening” (tamizaje). (Miranda, 1991. Pp. 34-39)

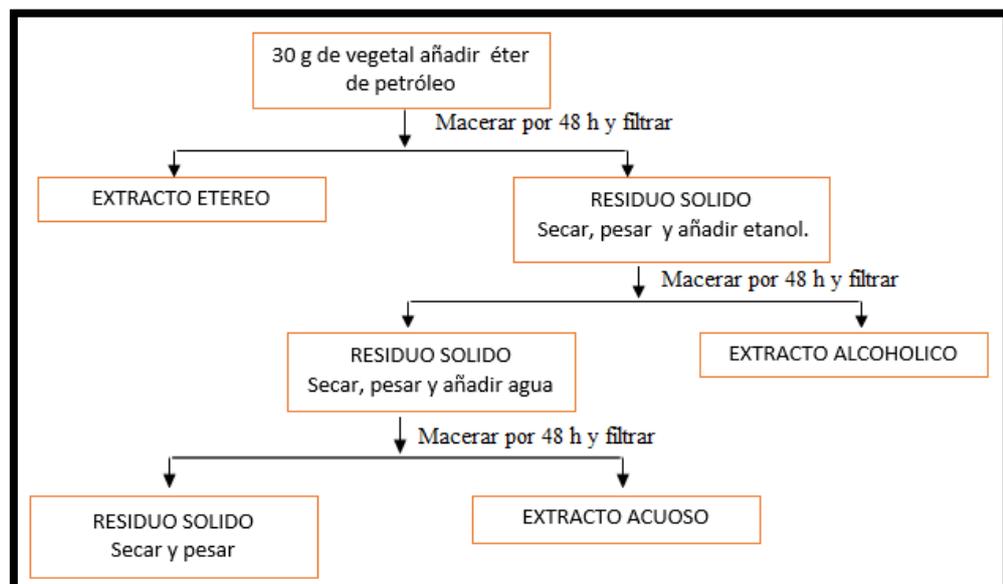


Figura. 15-2. Esquema de extracción sucesiva del material vegetal para aplicar las técnicas de tamizaje fitoquímico

Fuente: Drogas, crudas extractos y tinturas. Normas ramales.1992

Luego de obtener cada extracto por separado se realizó los siguientes ensayos por separado. (Ramales, 1992).

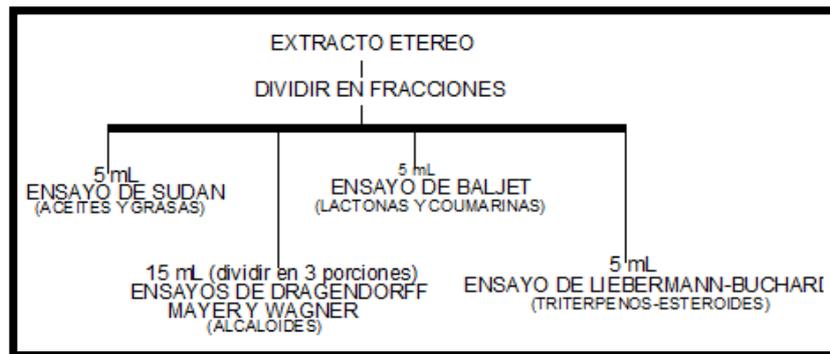


Figura. 16-2. Reacciones que se va a realizar en el extracto etéreo
Fuente: Drogas, crudas extractos y tinturas. Normas ramales.1992

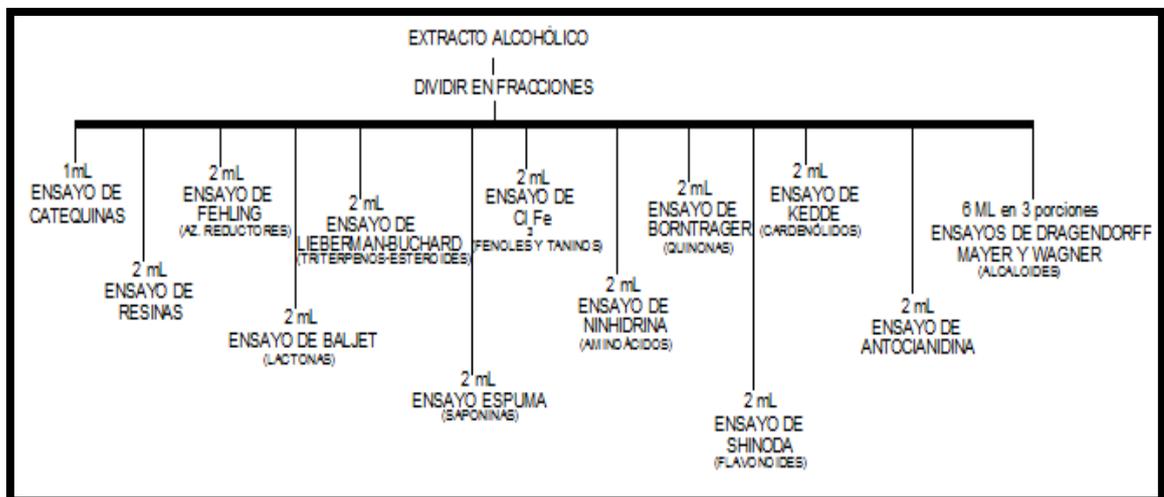


Figura. 17-2. Ensayos a realizar en el extracto alcohólico.
Fuente: Drogas, crudas extractos y tinturas. Normas ramales.1992

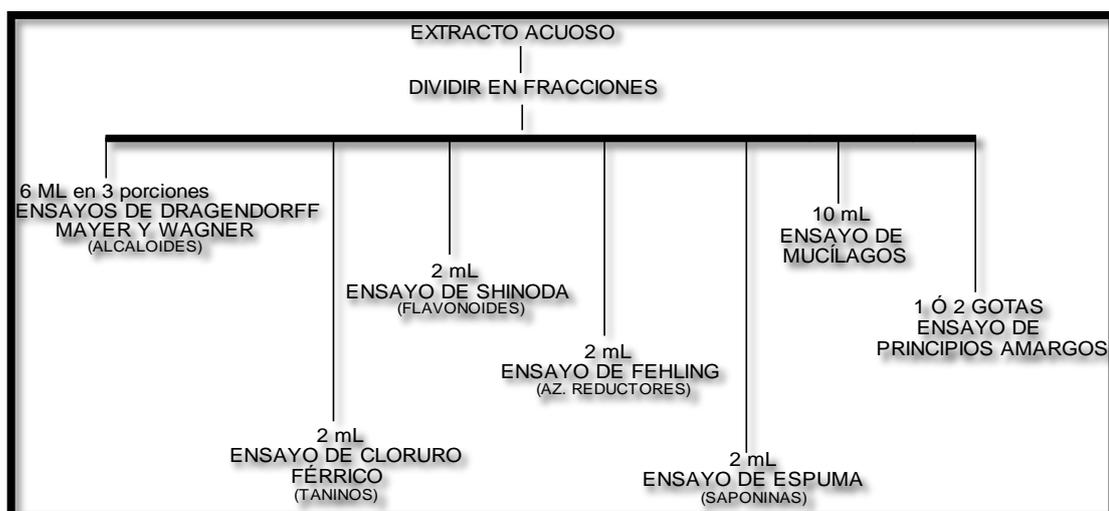


Figura.18.2. Ensayos a realizar en el extracto acuoso.
Fuente: Drogas, crudas extractos y tinturas. Normas ramales.1991

Ensayo de Sudan: (COMPUESTOS GRASOS).

A una alícuota de extracto se añadió 1 mL de colorante de Sudan III o Sudan IV y se calentó a baño de agua hasta evaporación.

Resultado: Es positivo si presenta compuestos grasos o una película color rojo. (Miranda, 1991. Pp. 34-39)

Ensayo de Dragendorff: (ALCALOIDES)

Se tomó una alícuota de extracto, si esta disuelta en solvente orgánico debe evaporarse y el residuo redisolverlo en 1 mL de HCl conc. Si se utilizó agua como disolvente se debe añadir 1 gota de HCL conc. Calentar y dejar enfriar. Luego de preparar la muestra se añadió 3 gotas de reactivo de Drangendorff.

Resultado: opalescencia (+), turbidez definida (++), precipitado (+++). (Miranda, 1991. Pp. 34-39)

Ensayo de Mayer: (ALCALOIDES).

Se preparó la muestra de la misma forma descrita anteriormente, añadir una pizca de NaCl en polvo, se agitó y filtró. Se añadió 3 gotas de solución de Mayer.

Resultados: opalescencia (+), turbidez definida (++), precipitado coposo (+++). (Miranda, 1991. Pp. 34-39)

Ensayo de Wagner: (ALCALOIDES).

Se preparó la muestra igual que los casos anteriormente descritos, luego se añade 3 gotas de reactivo. Los resultados se clasifican de la misma forma. (Miranda, 1991. Pp. 34-39)

Ensayo de Baljet: (COMPUESTOS LACTÓNICOS, CUMARINAS).

Para esta prueba si no se encuentra la alícuota en alcohol se evaporó y redisolvió en el mismo. Y añadir 1 mL de reactivo.

Resultado: color rojo (++), precipitado rojo (+++). (Miranda, 1991. Pp. 34-39)

g

Ensayo de Borntrager: (QUINONAS).

La alícuota de extracto debe estar disuelta en cloroformo. Se añadió 1 mL de Na(OH) al 5% en agua. Se agitó y se dejó reposar hasta que haya separación.

Resultado: fase superior color rosado (++), rojo (+++). (Miranda, 1991. Pp. 34-39)

Ensayo de Liebermann-Buchard: (TRITERPENOS, ESTERIOIDES).

La alícuota de extracto debe ser disuelta en cloroformo, se añadió 1mL de anhídrido acético y se mezcló. Colocar 3 gotas de H₂SO₄ conc. No agitar.

Resultados: son positivos cuando presentan un color rosado-azul muy rápido, verde intenso-visible aunque rápido, verde oscuro-negro-final de la reacción. (Miranda, 1991. Pp. 34-39)

Ensayo de Catequinas:

Se tomó una gota de extracto alcohólico y se aplica en un papel filtro, se añadió solución de carbonato de sodio y observó en el UV.

Resultado: coloración verde carmelita (+). (Miranda, 1991. Pp. 34-39)

Ensayo de Resinas:

En 2 mL de solución alcohólica se adicionó 10 mL de agua destilada.

Resultado: presencia de precipitado (+). (Miranda, 1991. Pp. 34-39)

Ensayo de Fehling: (AZÚCARES REDUCTORES).

La alícuota de extracto debe estar disuelta en agua, luego se adicionó 2 mL de reactivo y se calentó en baño de agua por 10 min.

Resultado: aparición de coloración o precipitado rojo (+). (Miranda, 1991. Pp. 34-39)

Ensayo de Espuma: (SAPONINAS).

Se Tomó una alícuota de extracto acuoso y se añadió 5 veces el volumen en agua y se agitó la muestra por 10 min.

Resultados: la aparición de espuma en la superficie de más de 2 mm por 2 min es positivo. (Miranda, 1991. Pp. 34-39)

Ensayo de Cloruro Férrico: (COMPUESTOS FENÓLICOS Y TANINOS).

En un extracto alcohólico se determina fenoles y taninos, se le adicionó 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5%. El extracto acuoso es para taninos, a una alícuota se añadió acetato de sodio para neutralizar y 3 gotas de la solución al 5% de tricloruro férrico.

Resultados: es positivo si presenta una coloración rojo vino (compuestos fenólicos en general), coloración verde intensa (taninos del tipo pirocatecólicos), color azul (taninos tipo pirogalotánicos). (Miranda, 1991. Pp. 34-39)

Ensayo de Shinoda: (FLAVONOIDES).

En una alícuota de extracto alcohólico y acuoso se colocó 1 mL de HCl conc. Y pedacitos de cinta de magnesio metálico, se esperó 5 min y se adicionó 1 mL de alcohol amílico esperar que se separe en 2 fases.

Resultado: positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo intensos. (Miranda, 1991. Pp. 34-39)

Ensayo de Antocianidinas: (C₆-C₃-C₆ DEL GRUPO DE FLAVONOIDES).

Se toma 2 mL de extracto etanólico y añadir 1 mL de HCl conc. Se calentó por 10 min. Se dejó enfriar y se añadió 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Se agitó y se dejó separar en 2 fases. Resultado: color rojo o marrón en la fase amílica es positivo. (Miranda, 1991. Pp. 34-39)

Ensayo de Mucílagos: (POLISACÁRIDOS).

A una alícuota de extracto en agua se enfrió a 0-5 °C.

Resultado: positivo cuando presenta consistencia gelatinosa. (Miranda, 1991. Pp. 34-39)

Ensayo de Principios Amargos y Astringentes:

Se saboreó una gota de extracto acuoso y reconocer sabores. (Miranda, 1991. Pp. 34-39)

2.3.4. Control de calidad del extracto de *Plantago australis*

2.3.4.1. Determinación de densidad

La densidad relativa es la relación que existe entre la masa y volumen de la sustancia a una temperatura de 25°C, y la masa de un volumen igual de agua. Esta determinación se realiza:

- Se pesó un picnómetro vacío
- Se colocó agua destilada a 25°C en el picnómetro y se pesa.
- Se secó el picnómetro y se añade el extracto y se pesa. (Miranda, 1991. Pp. 50-53)

$$D_{25} = \frac{m_1 - m}{m_2 - m}$$

D₂₅: peso del picnómetro con el extracto (g)

m₂: peso del picnómetro con el agua destilada (g)

m: peso del picnómetro vacío (g) (Miranda, 1991. Pp. 50-53)

2.3.4.2. *Determinación de índice de refracción*

Para esta determinación se utilizó un refractómetro Abbé, El índice de refracción es la relación entre el seno del ángulo de incidencia de la luz y el seno del ángulo de refracción cuando la luz oblicua para por el medio.

$$n = \frac{\text{Seni}}{\text{Senr}}$$

- Se colocó una gota de agua destilada sobre la prima de medición.
- Se ajustó el equipo seleccionando la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visible.
- Se movió el compensador cromático y colocar la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claros y oscuros.
- Luego se colocó una gota de extracto sobre la prima de medición.
- Se cerró el termoprisma y se enfocó la luz por el espejo y se procede de la misma manera que el agua.
- Las lecturas se debe hacer por triplicado. (Miranda, 1991. Pp. 50-53)

Si los resultados se obtienen a una temperatura diferente a la de referencia por lo que se emplea la formula siguiente:

$$N_d^{25} = N_d^t + 0.00044 (t-25)$$

N_d^{25} : índice de refracción a 25°C

N_d^t : valor leído en la escala del equipo a una temperatura t.

t: valor de la temperatura a la cual se hizo la medición(°C) (Miranda, 1991. Pp. 50-53)

2.3.4.3. *Determinación de pH del extracto*

Esta determinación se realiza para determinar el grado de acidez de una sustancia.

- Se pesó 10 gramos de material vegetal seco y pulverizado
- Se añadió 100 mL alcohol potable.
- Se ultrasonó por 30 min y se filtra
- Se utilizó un potenciómetro para medir el pH. (Miranda, 1991. Pp. 50-53)

2.3.4.4. *Determinación de sustancias totales*

Mediante esta determinación se conoce la variación de masa después de que la muestra ha sido sometida a un proceso como el calor en donde puede darse la pérdida de sustancias volátiles.

- Se taró una cápsula de porcelana.
- Se tomó 5 mL de extracto y se colocó en la cápsula de porcelana
- Se evaporó en baño de agua hasta sequedad y se colocó en estufa de aire caliente por 3 horas a 105°C
- Se enfrió en un desecador por 15 minutos y se pesa. (Miranda, 1991. Pp. 50-53)

$$Ss = \frac{Pr - P}{V} \times 100$$

Ss: sustancias solubles (%)

Pr: masa de la cápsula más el residuo (g)

P: masa de la cápsula vacía (g)

V: Volumen de la porción de ensayo (mL)

500 y 100: factor matemático para cálculos. (Miranda, 1991. Pp. 50-53)

2.3.5. *Preparación de extractos*

- Para la preparación de extractos se utilizó etanol al 96%.
- Se pesó 100 g de muestra, y se colocó 300 mL de etanol.
- Se ultrasonó por 1 hora y se filtró. (Miranda, 1991. Pp. 50-53)

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{cantidad real de extracto}}{\text{cantidad ideal de extracto}} \times 100 \quad (\text{Miranda, 1991. Pp. 50-53})$$

2.3.6. *Control de calidad microbiológica.*

Las drogas vegetales son contaminadas por los microorganismos que se encuentran presentes en el ambiente y en la tierra y varía entre 10^3 y 10^6 microorganismos por gramo de planta. Por lo general la contaminación inicial de la planta disminuye en el proceso de secado. Pero en los procesos de manipulación, trituration, almacenaje pueden aumentar la contaminación. (Fresno, 1993, Pp.74-75).

Por lo cual el control de calidad microbiológica nos ayuda a verificar la ausencia de cualquier tipo de alteración causada por los microorganismos. El recuento microbiológico se realizó en los extractos a utilizar en la evaluación In Vivo, al 25%, 50% y 75%. (Fresno, 1993, Pp.74-75).

2.3.6.1. *Recuento de Aerobios mesófilos por el método de extensión en placa*

Dentro de este tipo de microorganismos se encuentran bacterias y hongos que pueden desarrollarse a una temperatura de 30°C. Mediante este recuento se establece la calidad sanitaria, condiciones higiénicas y de manipulación de la muestra.

- Se Preparó las cajas Petri con agar PCA y codificar
- Se tomó 10 mL de cada muestra y se colocó por separado en 90 mL de agua estéril dejar reposar por 30 min.
- Se tomó 100 µL de cada dilución y se colocó en las cajas Petri, respectivamente.
- Con el asa de platino estéril se extendió la muestra por toda la placa.
- Se incubó en una estufa por 48 a 72h a temperatura de 30°C.
- Se reportó los resultados en UFC/mL. (Cano, 2010. Pp. 12-29)

$$c = n * 10 * f$$

c: UFC de microorganismos aerobios mesófilos/g o mL.

n: número de UFC contadas en la caja Petri.

10: factor para convertir el inóculo sembrado a 1 mL.

f: factor de dilución. (Cano, 2010. Pp. 12-29)

2.3.6.2. *Recuento de Escherichia coli por el método vertido en placa*

Se realizó este conteo para determinar si existe presencia de contaminación fecal en la muestra

- Se preparó las muestras las cuales puede diluirse en el caso de ser necesario.
- Se rotuló las placas Compact Dry.
- Con una pipeta automática y puntas estériles se colocó 1 mL de cada muestra en las placa compact Dry.
- Para eso se debe abrir la cubierta de la placa y colocar el 1mL en el centro de la misma.
- La muestra se dispersa sobre la lámina seca y se vuelve un gel cuando la muestra esta homogénea sobre la placa.
- Se Colocó la cubierta nuevamente en la placa.

- Se Introdujo la placa en la estufa a 35°C por 24 h
- Al día siguiente se realizó el reporte de resultados en el caso de observarse colonias color moradas en la placa indica presencia de coliformes totales y la presencia de colonias color azul indica presencia de *E. coli*. (Cano, 2010. Pp. 12-29) (HyServe, 2015. Pp. 1-8)

2.3.6.3. *Recuento de Mohos y Levaduras por el método extensión en placa*

Es importante determinar este microorganismo ya que su presencia puede ser indicador de descomposición de la muestra.

- Se preparó las cajas Petri con agar Sabouraud con cloranfenicol y se codificó
- Se tomó 10 mL de cada muestra y se colocó cada una en 90 mL de agua estéril se dejó reposar por 30 min.
- Se tomó 100 µL de las diluciones y se colocó en los medios de cultivo.
- Con el asa de platino estéril se extendió la muestra por toda la placa.
- Se selló y dejó incubar a la temperatura ambiente por 5 días.
- Se realizó el conteo y reportar los resultados en UFC/mL (Cano, 2010. Pp. 12-29) (HyServe, 2015. Pp. 1-8)

2.3.7. *Cromatografía en capa fina (flavonoides)*

Este método de separación es empleado para toda clase de sustancias de productos naturales y es reconocida como una técnica analítica importante en las modernas farmacopeas. Para el análisis se utilizó cromatofolios de aluminio de Merck. Se preparó un solvente para el corrido, se colocó el extracto con capilares sobre la placa cromatográfica, se introdujo la placa en la cuba cromatográfica, hasta que el solvente recorra las $\frac{3}{4}$ partes de la placa, secar la placa, revelarla, y observar los resultados. (Cabezas, 2014. Pp.47-48)

- Fase estacionaria: cromatofolio de aluminio.
- Fase móvil: acetato de etilo- ácido fórmico y agua. (65:20:15)
- Revelador. Vapores de amónico.

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

(Cabezas, 2014, pp 47-48)

2.3.8. *Cuantificación de metabolitos secundarios*

La determinación de los metabolitos secundarios se realizó por espectroscopia UV-Visible, este método se aplica a la mayoría de principios activos, su fundamento se basa en la absorción energética que presentan las moléculas analizadas al ser expuestas a una determinada intensidad de energía a una longitud de onda determinada. Así la concentración de una muestra problema depende únicamente de la absorción de la energía radiante por el sistema a esta se le denomina absorbancia o densidad óptica (A). (Fresno, 1993, Pp. 79-80)

El análisis de los máximos de absorción que presenta los componentes de una droga a determinadas longitudes de onda del espectro UV-Visible permite la cuantificación, para esta valoración se prepara una curva patrón utilizando para la medición un compuesto puro, a una longitud de onda a la cual el compuesto de su máxima absorción. Esta curva ayuda a determinar la concentración de una muestra. (Fresno, 1993, Pp. 79-80)

La cuantificación de los metabolitos secundarios se realizó en el extracto alcohólico e hidroalcohólico, para de esta manera determinar cuál de los dos extractos presenta mayor concentración de metabolitos. (Fresno, 1993, Pp. 79-80)

2.3.8.1. *Cuantificación de fenoles totales.*

- Se pesó 1 g de material vegetal seca y pulverizada se añadió 25 mL de etanol al 96%. Para hacer el extracto alcohólico y etanol al 80% para hacer el extracto hidroalcohólico
- Se dejó reposar por 24 h y se adicionó 25 mL de etanol para extracto alcohólico y alcohol al 80%, para hacer el extracto hidroalcohólico. se centrifugó a 2000 rpm.
- Se tomó 0,5 mL de cada extracto y se adicionó 10 mL de Na_2CO_3 al 10% y se dejó incubar a 38°C por 15 min.
- Se tomó una alícuota de 1 mL y se añadió 3mL de agua y 1mL de Reactivo de Folín-Ciocalteu, se dejó en reposo por 15 min en oscuridad.
- Se leyó las absorbancias a 660 nm.

La concentración de compuestos fenólicos se estableció con una curva de calibración, se utilizó ácido gálico como estándar, para eso se preparó soluciones de 100 μL , 125 μL , 150 μL , 175 μL , 200 μL se preparó de la mismas manera que la muestra. (Barrón, 2011, Pp. 1-7) 50

2.3.8.2. Cuantificación de flavonoides.

- Se pesó 1 g de material vegetal seca y pulverizada se añadió 25 mL de etanol al 96%. Para hacer el extracto alcohólico y etanol al 80% para hacer el extracto hidroalcohólico
- Se dejó reposar por 24 h y se adicionó 25 mL de etanol para extracto alcohólico y alcohol al 80%, para hacer el extracto hidroalcohólico. se centrifugó a 2000 rpm.
- Se tomó 0,5 mL del extracto y se añadió 1,5 mL de etanol al 96%, 0,1 mL de AlCl₃ al 10%, 0,1 mL de acetato de potasio y 2,8 mL de agua destilada.
- Se dejó incubar por 30 min a 38°C y se procedió a leer a 415 nm. (Barrón, 2011, Pp. 1-7)

La concentración de flavonoides se estableció con una curva de calibración, se utilizó quercetina como estándar, para eso se preparó soluciones de 700 µL, 350 µL, 175 µL y 100 µL se preparó de la mismas manera que la muestra. (Barrón, 2011, Pp. 1-7)

2.3.9. Evaluación de la actividad cicatrizante

Tabla 5-2. Protocolo Farmacológico a aplicarse en los animales de experimentación.

FASE DE ACLIMATACIÓN	Descripción de los animales de experimentación	Condiciones Ambientales
Se ambientó a los animales de experimentación por 20 días tanto al investigador como a la manipulación y adaptación, verificando las condiciones establecidas.	Peso: 30-40 g Edad: 2 meses Sexo: machos/hembras Lugar de nacimiento: Bioterio ESPOCH.	Humedad relativa: 40-60 % Temperatura: 21 °C ±2 Periodo: 12 horas luz, 12 oscuridad Ruido: ausente Ropa de cama: viruta de madera seca y limpia con cambios cada 48 horas Alimento: Balanceado para roedor en forma de pellets y agua Ad libitum.
FASE DE TRATAMIENTO	Definición de grupos Tabla 6-3	Se realizó diluciones del extracto madre para obtener las concentraciones C1, C2, C3, y se identificó cuál de las 3 presenta mayor actividad cicatrizante, se utilizó alcohol al 40% para las diluciones y se administró vía tópica a cada ratón cada 12 horas con un hisopo estéril.

		<ol style="list-style-type: none"> 1. Al control negativo no se le aplico tratamiento 2. A los controles positivos se les aplico alcohol al 40% y El acetato de prednisolona 0,5 g, sulfato de neomicina 0,5 g 3. A los grupos en estudio se les aplico extractos en concentraciones de 25%, 50% y 75% cada 12 horas
FASE DE INDUCCIÓN DE LA HERIDA	<ol style="list-style-type: none"> 1. Se humedeció con agua tibia la zona a depilar. 2. Se realizó la depilación de la zona dorsal de cada ratón con crema de depilar Veet en 5 min, y se retira con gasas húmedas. 3. Se dejó pasar 24 horas para descartar reacciones alérgicas. 4. Se desinfectó la zona depilada y se coloca anestesia lidocaína al 10% (roxicaína en spray) de 1 a 2 aplicaciones dejar 3 min. 5. Se marcó 2 cm de longitud perpendicular al eje longitudinal del ratón. 6. Se realizó el corte con el bisturí en la zona con una profundidad de 2 mm 	
FASE DE EVALUACIÓN	Tiempo de cicatrización Longitud de la herida Formación y desprendimiento de la costra	

Realizado por: Asto, V; Toapanta, G. 2015. Facultad de Ciencias. ESPOCH.

Tabla 6-2. Definición de grupos experimentales

Control (-)	Control (+)		Extracto C1	Extracto C2	Extracto C3
A1	B1	C1	D1	E1	F1
A2	B2	C2	D2	E2	F2
A3	B3	C3	D3	E3	F3
A4	B4	C3	D4	E4	F4

Realizado por: Asto, V. Toapanta, G. 2015. Facultad de Ciencias. ESPOCH

A: grupo heridos sin tratamiento

B: grupo heridos tratados con alcohol 40%

C: grupo heridos tratados con El acetato de prednisolona 0,5 g, sulfato de neomicina 0,5 g

D: grupo heridos tratados con extracto C1

E: grupo heridos tratados con extracto C2

F: grupo heridos tratados con extracto C3

2.3.10. Exámenes histopatológicos

Para realizar este estudio se sacrificó a los ratones utilizando una cámara de éter de petróleo. Se muestreó la zona de cicatrización y se realizó un corte de 1cm de largo y 1 cm de ancho. Se colocó y codificó la muestra en canastillas y se introdujo en frascos estériles con formol al 10% y se realiza placas para observación en el microscopio, a 10x y 40x así se evalúa el porcentaje de regeneración celular de los diferentes tratamientos. (Cabezas , 2014. Pp. 29-32)

2.3.11. Análisis estadístico

El estudio se realizó con 4 repeticiones para así obtener resultados más confiables. A los cuales se les aplicó el Test de Anova el cual nos va a permitir medir la igualdad de las medias de los datos obtenidos en el estudio experimental y el Test de Tukey el cual ayuda a comparar los tratamientos e identificar las diferencias entre las medias. Para el estudio estadístico se utilizó el programa XLSTAT 2015. (XLSTAT, 2015. <http://www.xlstat.com>)

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Análisis y discusión de resultados.

3.1.1. Control de calidad del material vegetal

En la tabla 7-3 se muestran los resultados del control de calidad en el material vegetal, cuyos ensayos fueron realizados en planta seca y triturada, luego se comparó los datos obtenidos con la Norma Ramal del MINSAP (NRSP 303) por pertenecer a la familia de las Plantaginaceae, Guía para el Control de Calidad de Plantas Medicinales de la OMS.

Tabla 7-3. Control de Calidad de las Hojas de Llantén de Páramo (*Plantago australis*). Laboratorio de Productos Naturales, Investigación y Desarrollo. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015.

PARÁMETROS	VALOR OBTENIDO (%)	VALOR DE REFERENCIA (%)
Cenizas totales	11,58	Max 16
Cenizas solubles en agua	38,7	Min 35
Cenizas insolubles en HCl	1,168	Max 2
Humedad	6,06	Max 14
Sustancias solubles.	74,96	Min 30

Realizado por: Asto. V. 2015. Valores de referencia de Normas Ramales (NRSP 303) y GMP-OMS, 2007.

Los valores obtenidos se encuentran dentro de los parámetros establecidos como referencia indicados en la tabla anterior. Por lo que se garantiza una buena calidad en el material vegetal, indicando que se ha dado una correcta selección y lavado de las hojas, eliminación de tierra, arena, al igual que un adecuado proceso de secado y almacenamiento de las hojas del *Plantago australis*.

Debido a que no existen estudios previos sobre la calidad del *Plantago australis* los datos obtenidos en nuestro estudio se compararon con datos obtenidos por Carballo et al, en *Plantago lanceolata* el cual indica que tiene Humedad 9,27, Cenizas Totales 17,94, Sustancias solubles en agua 36,29, sustancias solubles 32,02, se puede observar existe variaciones entre ellos, puede ser

porque son especies diferentes, o por el hábitat en el cual se desarrollan es diferente. (Carballo et al, 2002, <http://scielo.sld.cu/scielo>)

También se comparó los resultados obtenidos con un estudio realizado por Carpio y Ramón en las hojas del *Plantago major* en donde indica humedad 5.2%, cenizas totales 11,27 y sustancias solubles 52,3% estos valores obtenidos en el estudio son casi similares a los nuestros. (Carpio, Ramon. 2009. p. 61)

3.1.2. Tamizaje fitoquímico

Tabla 8-3. Tamizaje Fitoquímico de Extractos de Llantén de Páramo (*Plantago australis*). Laboratorio de Productos Naturales, Investigación y Desarrollo. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015.

METABOLITO	DETERMINACIONES	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ETANÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
Compuestos grasos	Sudan	+		
Compuestos lactónicos (cumarinas)	Baljet	-	+	-
Alcaloides	Dragendorff	+	++	++
	Mayer	+	++	++
	Wagner	+	+++	+++
Triterpenos, esteriodes	Liebermann-Buchard	+	+	
Catequinas	Catequinas		+	
Resinas	Resinas			+
Azúcares reductores	Fehling		+	+
Saponinas	Espuma		-	-
Quinonas	Borntrager		-	-
Flavonoides	Shinoda		++	+
C₆-C₃-C₆ del grupo de flavonoides	Antocianidina		+	
Compuestos fenólicos y taninos	Fecl ₃		++	+
Polisacáridos	Mucilagos		-	
P. amargos	Principios amargos			+

Realizado por: Asto, V.2015

- (-) No presenta metabolito;

- (+) Cantidad de metabolito baja;
- (++) Cantidad de metabolito considerable
- (+++) Cantidad de metabolito alta.

El tamizaje fitoquímico tiene como propósito la identificación cualitativa de metabolitos secundarios mediante cambios de coloración y formación de precipitados en los extractos etéreo, etanólico, y acuoso de las hojas del *Plantago australis*.

Se realizó utilizando tres extractos con solventes de diferente polaridad ya que de esta manera se va a extraer los metabolitos afines a cada solvente utilizado. Según los resultados obtenidos en el cuadro indica la presencia de compuestos grasos, cumarinas, alcaloides, triterpenos, catequinas, resinas, azúcares reductores, flavonoides, antocianidinas, fenoles y taninos, y principios amargos.

Al comparar los datos obtenidos con bibliografía de referencia sobre *Plantago australis*. Se encontró la presencia de taninos, flavonoides y cumarinas y en nuestro estudio existe la presencia de estos metabolitos. (Gonzales et al. 2000. Pp. 1-4)

Los resultados obtenidos se comparó con un estudio realizado por Pinto y Bustamante en las hojas de *Plantago major* el cual indica la presencia de taninos, flavonoides, saponinas y alcaloides. (Pinto, J. 2008. p. 5). Y en un estudio realizado por *Plantago lanceolata* presenta catalpina, mucilagos, carotenoides, taninos, saponina, alcaloides, pectina, flavonoides, glucosinolatos y se observa que en las tres especies existe la presencia de taninos, flavonoides, alcaloides. (plantas medicinales, <http://www.espiritugaia>)

Los metabolitos que intervienen en la cicatrización son los fenoles, taninos y flavonoides, ayudan en la coagulación de la sangre, curación de la herida, regeneración de los tejidos y evitando procesos de inflamación e infección durante la cicatrización.

3.1.3. Control de calidad del extracto etanólico.

Tabla 9-3. Control de Calidad de Extractos de Llantén de Páramo (*Plantago Australis*). Laboratorio de Productos Naturales, Investigación y Desarrollo. Facultad De Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015.

PARÁMETRO	VALOR OBTENIDO
Densidad	0,829 g/mL
Índice de refracción	1,344
pH	4,950
Sólidos totales	4,780 g

Realizado por: Asto,V. 2015

El extracto del llantén de páramo es menos denso que el agua esto indica que los componentes del extracto tienen menor pesadez que los del agua. El índice de refracción indica la presencia de sustancias disueltas y al compararlo con el de agua 1,333 g/mL el extracto tiene mayor índice de refracción por lo tanto mayor cantidad de sustancias disueltas. El pH del extracto es 4,95 es decir ácido, puede deberse a la presencia de sustancias como ácido fenil carboxílico y vitamina C encontrados en bibliografía, el extracto puede utilizarse en la piel ya que el rango de pH en la piel humana es 4,7 a 6, según un estudio publicado en International Journal of Cosmetic Science realizado por Lambers, por lo tanto no va a ocasionar irritaciones ni daños. Los sólidos totales se presentan en 4,78g esto indica sustancias suspendidas en el extracto y que pueden ser filtrables.

Al comparar los valores obtenidos con un estudio realizado por Redrobán en *Plantago major* indica la densidad 0,910, índice de refracción, 1,374, pH 5,13, sólidos solubles 6,025, indica que existe diferencia entre los resultados obtenidos en nuestro estudio. (Redrobán, 2012, p.60).

También se comparó los resultados con un estudio realizado por Vizoso et al, en *Plantago lanceolata* en donde presenta los siguientes resultados: sólidos totales 23,8%, pH 4,6, densidad 1,085 en donde indica que los valores de densidad y sólidos totales son superiores a los resultados de nuestro estudio. (Vizoso, A et al. 2000. [http://www.bvs.sld.cu/revistas.](http://www.bvs.sld.cu/revistas))

3.1.4. Cromatografía en capa fina

Tabla.10-3. Rf de la muestra de Llantén De Páramo (*Plantago Australis*). Laboratorio de Productos Naturales, Investigación y Desarrollo. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015.

MANCHAS OBSERVADAS	CALCULO DE RF	COLOR
1	$0,7/7 = 0,1$	Taninos
2	$2/7 = 0,28$	Catalpol
3	$2,5/7 = 0,36$	Ácido clorogenico
4	$2,7/7 = 0,38$	Rutina
5	$4,2/7 = 0,6$	7-O- Glucosido de Luteolina (Cinarósido)
6	$4,8/7 = 0,68$	Hiperósido
7	$5,9/7 = 0,84$	Carotenoides

Realizado por: Asto V. 2015

Los resultados obtenidos de la cromatografía indicando los posibles compuestos químicos presentes en el *Plantago australis*. Los Rf calculados se compararon con bibliografía obtenida de Wagner H y Bladt S, así se indica la presencia de taninos con rf de 0,1; catalpol con Rf 0,28; ácido clorogenico con Rf 0,36; rutina con Rf de 0,38; hiperosido (3-O- galactósido de quercetina) con Rf 0,68; 7-O- Glucósido de Luteolina (Cinarósido) con Rf 0,6 y carotenoides con Rf 0,84.

Según un estudio realizado por Nemitz, et al. Se indicó la presencia de 7-O- Glucósido de Luteolina (Cinarósido), en el *Plantago australis*. (Wagner H y Bladt S, 1996. p.25)

En los estudios realizados por Blanco et al, para el *Plantago major* se obtuvo rutina, aucubina y catalpol en la cromatografía en capa fina, de estos metabolitos identificados la rutina y el catalpol se encuentran presentes en el *Plantago australis*. (Redrobán, 2012, p.58)

3.1.5. Cuantificación de metabolitos secundarios

3.1.5.1. Cuantificación de fenoles totales (660 nm)

Tabla 11-3. Concentración de Fenoles Totales (% Ácido Gálico) del Llantén de Páramo (*Plantago australis*). Laboratorio de Productos Naturales, Investigación y Desarrollo. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015.

Extractos	Absorbancias	Concentración en ppm (μg de ácido gálico/ mL de extracto)	Contenido de fenoles en mg de ácido gálico/ g muestra
Hidroalcohólico	0,156	111,29 \pm 1,39	2,78
Alcohólico	0,293	202,4 \pm 0,67	5,06

Realizado por: Asto V. 2015

Para obtener la concentración de fenoles totales se realizó una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar. Los resultados expresados en la tabla anterior nos indican que el contenido de fenoles totales (% ácido gálico) es mayor en el extracto alcohólico con 5,06 mg/g indicando que este extracto es el adecuado para la determinación de la actividad cicatrizante.

3.1.5.2. Cuantificación de flavonoides (415nm)

Tabla 12-3. Concentración de Flavonoides Totales (% Quercetina) del Llantén de Páramo (*Plantago australis*). Laboratorio de Productos Naturales, Investigación y Desarrollo. Facultad De Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015.

Extractos	Absorbancias	Concentración en ppm (μg de quercetina/ mL de extracto)	Contenido de flavonoides en mg de quercetina/ g de extracto
Hidroalcohólico	0,081	60,53 \pm 2,55	1,52
Alcohólico	0,121	93,86 \pm 1,27	2,35

Realizado por: Asto V. 2015

Para la cuantificación de flavonoides totales se utilizó como estándar la quercetina. En los resultados se puede diferenciar que el mayor contenido de flavonoides presenta en el extracto alcohólico con 2,37 mg/g de muestra. De esta manera se considera que el extracto que se debe utilizar para la evaluación cicatrizante es el extracto alcohólico.

Se comparó los resultados obtenidos con un estudio realizado por Redrobán del *Plantago major* en donde indica que se obtuvo 1,02 mg/g de flavonoides, este estudio se realizó en extracto hidroalcohólico al compararlo con nuestro resultado de extracto hidroalcohólico los datos no presenta mucha diferencia, en comparación con el extracto alcohólico. (Redrobán, 2012, p.58)

3.1.6. Preparación de extractos

Se realizó la preparación del extracto etanólicos para la aplicación en las lesiones de los ratones y se obtuvo porcentaje de rendimiento en la obtención de extracto es del 60,67%, posteriormente se hizo las diluciones para los diferentes tratamientos con alcohol al 40%.

3.1.7. Control de calidad microbiológica.

Tabla 13-3. Control de Calidad Microbiológica de Extractos de Llantén de Páramo (*Plantago australis*). Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015.

PARAMETROS	VALORES OBTENIDOS			VALORES REFERENCIALES
	Extracto 25%	Extracto 50%	Extracto 75%	
Recuento de Aerobios mesófilos	30 UFC/mL	25 UFC/mL	10 UFC/mL	1x10 ⁷ UFC/mL
Recuento de <i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	1x10 ¹ UFC/mL
Recuento de Mohos y Levaduras	Ausencia	Ausencia	Ausencia	1x10 ⁴ UPC/mL

Realizado por: Asto V. 2015

Mediante el recuento bacteriano se va a determinar la calidad e inocuidad del extracto para ser utilizado en la evaluación de la actividad cicatrizante con los animales de experimentación. Los resultados obtenidos, se encuentra dentro de los requisitos indicados en la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2 392:2007.

La presencia de aerobios mesófilos es de 30 UFC/mL en el extracto al 25%, 25 UFC/mL en el extracto al 50%, 10 UFC/mL en el extracto al 75%, existe menos UFC en el extracto al 75%, los

valores se encuentran dentro de los parámetros establecidos en la norma así indica ambiente de trabajo, recipientes de almacenaje, manipulación adecuados.

La ausencia de *Escherichia coli* indica que en el extracto no existe presencia de contaminación con material fecal, lo cual es evidente ya que se hizo una selección exhaustiva de las hojas a utilizar en la investigación. La ausencia de mohos y levaduras indica que la estabilidad del extracto es adecuada ya que no presenta crecimiento fúngico, además indica que las hojas utilizadas para el extracto tenían un correcto secado y almacenado antes de ser utilizadas.

3.1.8. Evaluación de la actividad cicatrizante

La evaluación de la actividad cicatrizante del extracto de hojas *Plantago australis*, se realizó en 24 ratones (*Mus musculus*), a los cuales se les dividió en 6 grupos, cada uno formado por 4 ratones, las especies se distribuyeron aleatoriamente en cada grupo, se trabajó con grupos controles y 3 formulaciones: SN: grupo Control (-), es decir al cual no se le aplicó ningún tratamiento, C(+A) y C(+B), son los grupos controles positivos, medicamentos comercial (acetato de prednisolona 0,5 g y sulfato de neomicina 0,5 g) y alcohol al 40% respectivamente. Los grupos de tratamientos son T1 tratamiento al 25%, T2 tratamiento al 50%, T3 tratamiento al 75%. La aplicación del tratamiento se hizo vía tópica cada 12 horas hasta que se cure la herida, observándose el tiempo de cicatrización, Longitud de la herida, formación y desprendimiento de la costra.

Tabla 14-3. Tiempo de Cicatrización de Animales de Experimentación. Bioterio. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015.

TIEMPO DE CICATRIZACIÓN (día)						
Tratamiento	R1	R2	R3	R4	media	Desv.st.
Sin tratamiento	14	16	14	15	15	0,96
El acetato de prednisolona 0,5 g, sulfato de neomicina 0,5 g	13	12	13	12	13	0,58
Alcohol	12	11	10	11	11	0,82
Extracto 25%	8	9	9	10	9	0,82
Extracto 50%	7	8	8	8	8	0,50
Extracto 75%	6	7	6	7	7	0,58

Realizado por: Asto V. 2015

Los tiempos de cicatrización de las heridas en los animales de experimentación, se puede observar que los valores de las medias entre los grupos son diferentes, la desviación estándar nos indica

que existe una dispersión entre datos, esto se da porque debido a que los días de cicatrización son diferentes.

Estos valores se compararon con el estudio realizado por Redrobán, en mezclas de extractos de *Plantago major* y *Nasturtium officinal*, se obtuvo mejores resultados con el tratamiento 50/50 en 7 días, que es igual a nuestro tratamiento 75% de extracto de *Plantago australis* (Redrobán, 2012, p.64)

Cabezas, en un estudio de los extractos de *Tropaeolum maju* en la evaluación de su actividad cicatrizante presentó mejores resultados a los 10 días, y en comparación con el *Plantago australis* podemos decir que presenta mejor actividad cicatrizante ya que cicatrizo en 7 días. (Cabezas.2014.p82)

Según Licuy en su investigación sobre actividad cicatrizante de *Tradescantia zanonía* indico que el extracto con mayor efectividad tuvo un tiempo de cicatrización de 8 días, al comparar con nuestro estudio podemos ver que nuestro extracto tiene mejores resultados en tiempo de cicatrización. (Licuy. 2013. p. 76)

Tabla 15-3. Longitud de la Herida realizada en los Animales de Experimentación. Bioterio. Facultad De Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015.

LONGITUD DE LA HERIDA EN cm.						
Día	Control (-)	Control (+)	Control (+) A	Extracto 25%	Extracto 50%	Extracto 75%
1	2	2	2	2	2	2
2	2	1,9	1,8	1,8	1,8	1,6
3	1,8	1,7	1,8	1,5	1,7	1,1
4	1,7	1,6	1,6	1,5	1,2	0,6
5	1,6	1,3	1,6	1	0,8	0,3
6	1,5	1	1,4	0,8	0,5	0,1
7	1,4	0,8	1,2	0,5	0,3	0
8	1	0,8	0,9	0,3	0	
9	0,8	0,5	0,6	0,1		
10	0,7	0,5	0,3	0		
11	0,6	0,3	0,3			
12	0,4	0,2	0			
13	0,2	0				
14	0,2					
15	0,1					
16	0					

Realizado por: Asto V. 2015

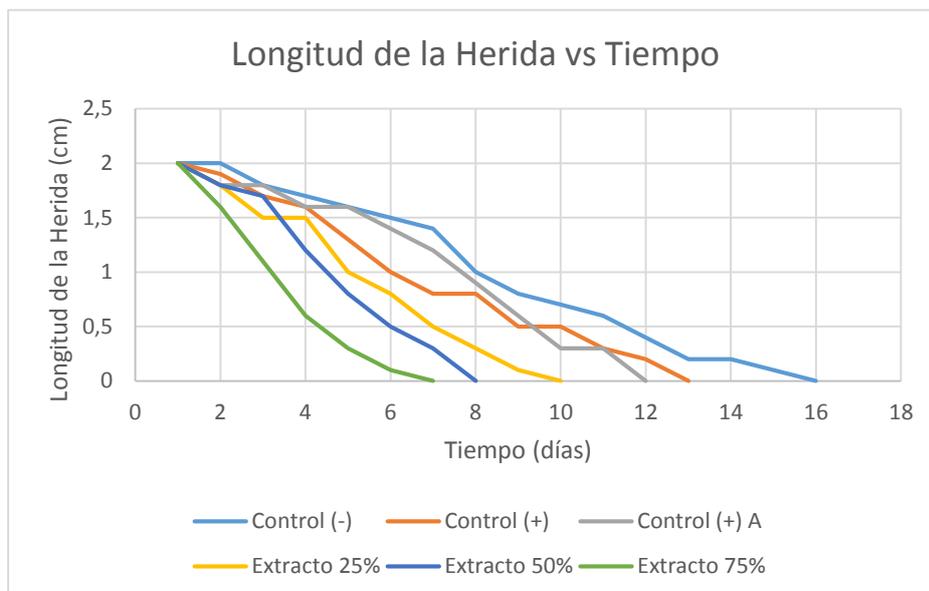


Gráfico. 1-3. Comparación de los diferentes grupos de tratamiento de la longitud de la herida vs el tiempo.

Realizado por: Asto V. 2015

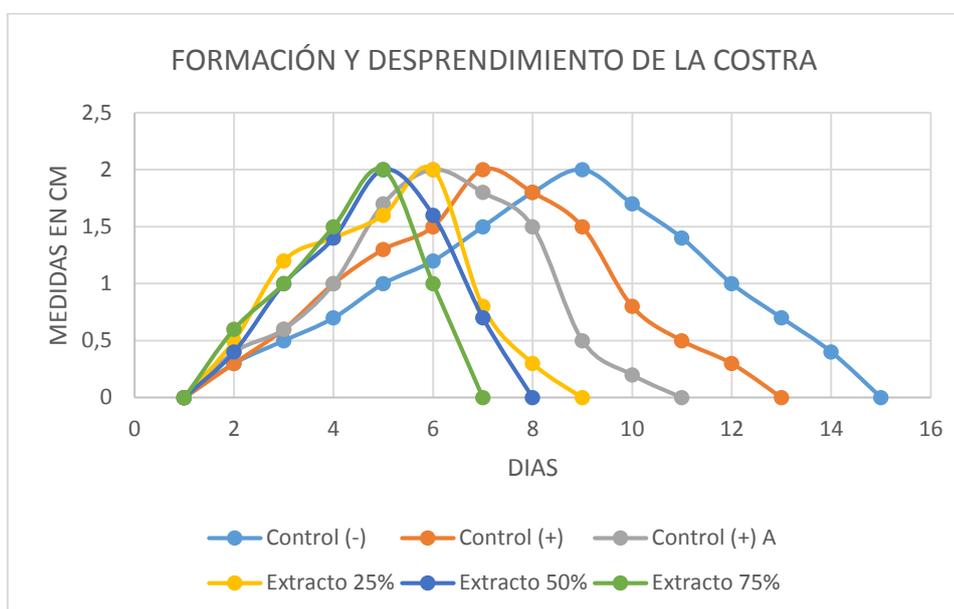
En la tabla y figura anterior se observa las longitudes de las heridas desde su inducción hasta el cierre observándose el proceso de cicatrización de cada herida y el tiempo que transcurre durante la curación, mediante estos datos se puede establecer que el tratamiento más efectivo por menor tiempo de cicatrización es con extracto al 75%. Y el que más demora en cicatrizar es el grupo que no tuvo tratamiento alguno.

En el estudio de la actividad cicatrizante de Redrobán, en mezclas de extractos de *Plantago major* y *Nasturtium officinal*, las longitudes de las heridas iniciales fueron en 1,5 y el tiempo final de cierre de estas se dio en 7 días con el tratamiento de mayor efectividad, al compararlo con nuestro estudio las longitudes iniciales de herida fueron de 2 cm y el cierre final se dio en 7 días lo cual según estos valores podemos decir que el *Plantago australis* presenta mejores resultados. (Redrobán, 2012, p.95)

Tabla 16-3. Formación y Desprendimiento de la costra realizada en los Animales de Experimentación. Bioterio. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Agosto 2015.

Día	Control (-)	Control (+)B	Control (+) A	Extracto 25%	Extracto 50%	Extracto 75%
1	0	0	0	0	0	0
2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,4	0,6
3	0,5	0,6	0,6	1,2	1	1
4	0,7	1	1	1,4	1,4	1,5
5	1	1,3	1,7	1,6	2	2
6	1,2	1,5	2	2	1,6	1
7	1,5	2	1,8	0,8	0,7	0
8	1,8	1,8	1,5	0,3	0	
9	2	1,5	0,5	0		
10	1,7	0,8	0,2			
11	1,4	0,5	0			
12	1	0,3				
13	0,7	0				
14	0,4					
15	0					

Realizado por: Asto V. 2015



Gráficos. 2-3. Gráfica de la formación y desprendimiento de la costra

Realizado por: Asto V. 2015

La formación y desprendimiento de la costra, se produce en todas las heridas se aplique o no un tratamiento médico, el grupo que presenta mejores resultados es tratamiento con extracto al 75% al cicatrizar en 6 días y caída de costra de 11 días, es debido al mayor contenido de los compuestos químicos también acorta el tiempo de caída de la costra ya que la piel se regenera rápidamente, al

grupo que se no se le aplico tratamiento es el que más demoro en formarse y desprenderse la costra, la formación de la costra se dio en el día 15 y el desprendimiento se dio en 19 días.

En el estudio de la actividad cicatrizante de Redrobán, en mezclas de extractos de *Plantago major* y *Nasturtium officinal*, se puede observar que el desprendimiento de la costra en los ratones tratados con los extractos se dio en 14, 12 y 10 días, en comparación con los resultados de nuestro estudio fue de 7,8,9 días. (Redrobán, 2012, p.97)

3.1.9. Exámenes histopatológicos

Tabla 17-3. Estudio Histopatológico del Tejido Regenerado de los Animales de Experimentación. SOLCA. Agosto 2015.

GRUPOS	RESULTADOS DEL ESTUDIO MICROSCOPICO					
	Edema	PMN	Tejido Conectivo	Epitelización	Linfocitos	Anexo Piloso
Control Negativo	+++	+	+	40%	+++	++
Control Positivo de Lamoderm	++	-	++	100%	+	+++
Control Positivo de Alcohol	++	+	+	60%	++	++
Tratamiento al 25%	+	+	++	100%	+	+++
Tratamiento al 50%	+	-	+++	100%	-	+++
Tratamiento al 75%	+	+	+++	100%	-	+++
RESULTADOS DEL ESTUDIO MACROSCÓPICO						
Control Negativo	Tamaño: 1,8; Color: rosado pálido; Aspecto: liso, herida superficial					
Control Positivo de Lamoderm	Tamaño: 1,7; Color: rosado pálido; Aspecto: liso herida superficial					
Control Positivo de Alcohol	Tamaño: 1,7; Color: rosado pálido; Aspecto: liso, herida superficial					
Tratamiento al 25%	Tamaño: 1,4; Color: rosado pálido; Aspecto: liso, herida superficial					
Tratamiento al 50%	Tamaño: 1,4; Color: rosado pálido; Aspecto: liso, herida superficial					
Tratamiento al 75%	Tamaño: 1,2; Color: rosado pálido; Aspecto: liso, herida superficial					

Realizado por: Asto V. 2015

(+): Leve

(++): Moderado

(+++): Abundante

Podemos observar los parámetros que se valoró en el estudio histopatológico del tejido regenerado, tenemos edema que este indica la presencia de hinchazón en la herida durante el proceso de cicatrización, PNM son los Polimorfonucleares los cuales se encuentran en gran cantidad cuando existen infecciones agudas, los linfocitos los cuales se presentan cuando existen infecciones crónicas, la presencia de tejido conectivo indica que se dio un proceso de cicatrización con fibrosis, la epitelización indica la regeneración de la epidermis en el tejido lesionado, y los anexos pilosos indican la regeneración de la dermis.

Según los resultados obtenidos se puede indicar que existe regeneración celular al 100% de los tejidos de los grupos controles positivos y tratamientos, el control negativo presento 40 % de regeneración celular, y aunque la herida ha cerrado externamente con este análisis se identifica que histológicamente aún no está completamente cicatrizada.

En los análisis histopatológicos de los tejidos lesionados y tratados con *Tropaeolum maju* la regeneración celular se dio al 100% para la concentración de extracto al 40% y 80%, el extracto a 20% presento una regeneración celular de 80%, en el *Plantago australis* los tratamientos presentaron buenos resultados al regenerar el tejido al 100% sin importar la concentración. (Cabezas. 2014. p. 120)

Según Licuy en su estudio de actividad cicatrizante el extracto de *Tradescantia zanonía* al 50% presento una regeneración al 100%, el extracto al 75% tuvo una regeneración al 90% y el extracto al 25% tiene una regeneración al 80%, al compararlo con la regeneración celular de nuestro estudio el cual fue de 100% en los tres tratamientos con extracto aplicados se indica que tiene mejores resultados. (Licuy. 2013. pp. 84)

3.2. Comprobación de hipótesis.

Para el análisis estadístico se comparó las medias de los grupos del tratamiento, para lo cual se utilizó los Test de Anova y de Tukey, para así identificar cuáles son los tratamientos que presentan una diferencia significativa. Se utilizó el programa XLSTAT 2015.

Definición de grupos: SN: grupo Control (-), es decir al cual no se le aplicó ningún tratamiento, C(+)_A y C(+)_B, son los grupos controles positivos, medicamento comercial (acetato de prednisolona 0,5 g, y sulfato de neomicina 0,5g) y alcohol al 40% respectivamente. Los grupos de tratamientos son T1 la Tratamiento al 25%, T2 Tratamiento al 50%, T3 Tratamiento al 75%.

H₀: Todas las medias del tiempo de cicatrización son iguales.

H_a: Por lo menos un par de las medias de los tiempos de cicatrización son diferentes.

Decisión: $p < \alpha$ se rechaza la hipótesis nula

$p > \alpha$ se acepta la hipótesis nula

Tabla 18-3. Análisis de Varianza (ANOVA) del efecto cicatrizante del *Plantago australis* en los grupos tratados considerando los días de cicatrización. Bioterio Facultad de Ciencias. ESPOCH. 2015.

Análisis de varianza:					
Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P-valor
Modelo	5	191,00	38,20	72,379	< 0,0001
Error	18	9,50	0,53		
Total corregido	23	200,50			

Realizado por: Asto, V. 2015

Según los datos obtenidos en el Test de Anova se rechaza la hipótesis nula, es decir que los días de cicatrización en las lesiones producidas en los animales de experimentación para los seis tratamientos son diferentes con un nivel de confianza del 95%, debido a que p-valor (0,0001) es menor al valor de significancia (0,05) y así se conoce que por lo menos dos de los tratamientos aplicados presentan diferente tiempo de cicatrización.

Debido a que en la evaluación del efecto cicatrizante se presenta un grupo al cual no se le aplico un tratamiento, puede ser el que indica un tiempo de cicatrización diferente al resto de grupos, por lo que para comprobar esta variación se va a realizar el Test de Tukey.

Tabla 19-3. Test de Tukey Grupos homogéneos de los días de cicatrización de los grupos experimentales. Bioterio de la Facultad de Ciencias. ESPOCH. 2015.

Categoría	Medias LS	Grupos			
SN	14,75	A			
C (+)A	12,50		B		
C (+)B	11,00		B		
T1	9,00			C	
T2	7,75			C	D
T3	6,50				D

Realizado por: Asto, V. 2015

SN: Control (-) sin tratamiento

C(+): medicamento comercial (Acetato de prednisona 0,5 g, y sulfato de neomicina 0,5 g)

C(+): Alcohol al 40%

T1: Tratamiento al 25%

T2: Tratamiento al 50%

T3: Tratamiento al 75%.

Con un nivel de confianza del 95%, el Test de Tukey nos permite comparar las medias entre los diferentes tratamientos, como se observa los datos en la Tabla. Se puede identificar los tratamientos se dividieron en cuatro grupos: A, B, C, D. El grupo A indica al grupo que no se le aplico ningún tratamiento por lo tanto presenta mayor tiempo para su cicatrización y no presenta homogeneidad con ningún otro grupo, en el grupo B se presentan los controles positivos (A y B), en los cuales los días de cicatrización son similares por lo tanto son homogéneos y tienen días de cicatrización menores que el grupo A, el grupo C está formado por el tratamiento al 25% y tratamiento al 50% lo cual indica que los tiempos de cicatrización de estos 2 grupos también son homogéneos y al mismo tiempo son menores que los del grupo B y en el grupo D se presenta también el tratamiento al 50% y además tratamiento al 75% estos dos tratamientos son los que presentan mejores resultados por su corto tiempo de cicatrización de la herida.

En resumen según el test estadístico ANOVA y TUKEY aplicado al tiempo de cicatrización de la herida, los tratamientos de los cuales se obtuvo mejores resultados sobre el efecto terapéutico es con el extracto al 50% y al 75% así se puede utilizar cualquiera de estos dos extractos para un tratamiento.

Al comparar los resultados con los obtenidos en el estudio de la evaluación cicatrizante del *Plantago major* y *Nasturtium officinale* en el cual el tratamiento que obtuvo mejores resultados fue la mezcla 50/50 es decir un solo tratamiento, podemos decir que el *Plantago australis* tiene mejores efectos terapéuticos ya que el tratamiento al 50% y 75% no presentan diferencias significativas en los días de cicatrización por lo que se puede utilizar en cualquiera de los dos porcentajes de extracto para un tratamiento en heridas. (Redrobán, 2012, p.69)

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el control de calidad del material vegetal y extractos de las hojas de *Plantago australis* indican cumplen con los parámetros establecidos por las normas de calidad utilizadas en esta investigación.

El tamizaje fitoquímico de los extractos de las hojas de *Plantago australis* demostró la presencia de varios metabolitos secundarios entre los cuales tenemos: compuestos grasos, cumarinas, alcaloides, triterpenos, catequinas, resinas, azúcares reductores, flavonoides, antocianidinas, fenoles y taninos, y principios amargos, siendo de mayor importancia para nuestra investigación los compuestos fenólicos y flavonoides.

Mediante el cálculo de Rf de la cromatografía en capa fina se identificó varios metabolitos como: taninos, catalpol ácido clorogénico, rutina, hiperosido (3-O- galactósido de quercetina), 7-O- Glucósido de Luteolina (Cinarósido), y carotenoides, cuyos responsables de la actividad cicatrizante son los flavonoides y taninos

Se cuantificó mediante espectrofotometría UV-Visible fenoles y flavonoides totales presentes en el extracto hidroalcohólico y etanólico de las hojas de *Plantago australis*, se obtuvo mayor cantidad de estos metabolitos en el extracto etanólico por esta razón se utilizó este extracto para la investigación de la actividad cicatrizante.

En la evaluación del efecto cicatrizante se usó 24 ratones con lesiones inducidas, en los resultados obtenidos de los días de cicatrización se sometieron a análisis estadístico mediante el software XLSTAT, se obtuvo como resultado que el extracto 75% y 50% presentan mayor efecto terapéutico ya que cicatrizó la herida en 7 y 8 días respectivamente, Según el análisis microscópico y macroscópico se demuestra que existe una buena regeneración celular de los tejidos al utilizar los extractos como cicatrizante.

RECOMENDACIONES

Evaluar la actividad terapéutica estudiada del *Plantago australis* en las otras partes de la planta como raíz y frutos para conocer cuál de ellas presenta un mayor efecto cicatrizante.

En estudios posteriores se utilice el extracto etanólico debido a que en este se presenta mayor cantidad de metabolitos tales como compuestos fenólicos y flavonoides.

Elaborar una forma farmacéutica adecuada utilizando el extracto etanólico del *Plantago australis* para así contribuir con un Fito medicamento que permita tratar heridas. Y así mejorar la calidad de vida del paciente de forma segura.

BIBLIOGRAFÍA

AGUILAR, Z; ULLOA, C, HIDALGO P. Guía de Plantas Útiles de los Páramos de Zuleta, Ecuador. *Proyecto de Manejo y Aprovechamiento Sustentable de Alpacas en los Páramos de Zuleta. PPA-Eco Ciencia.* Ecuador. Pp 60-79. [Consulta 05 de agosto de 2015]. Disponible en:

http://www.ecociencia.org/archivos/guia_plantas-091128.pdf

ANDRADE, P; SEPÚLVEDA, S. *Cicatrización Patológica.* 2014. Pp 1-2. [Consulta 05 de agosto de 2015]. Disponible en:

https://www.redclinica.cl/Portals/0/Users/014/14/14/Publicaciones/cicatrizacion_patologica.pdf

BARRÓN, R; et al. Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. *Scielo.* 2011. (México). Volumen 34. Número 3. Pp. 1-7. [Consulta 07 de agosto de 2015]. ISSN 0187-7380. Disponible en:

<http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v34n3/v34n3a5.pdf>

BARROS, F; et al. Plantas de Uso Medicinal no Município de São Luiz Gonzaga, RS, Brasil. *Latin American Journal of Pharmacy.* 2007. (Brasil). Volumen 26. N°5. Pp 1-11. [Consulta 04 de agosto de 2015]. ISSN 0326-2383. Disponible en:

http://www.latamjpharm.org/trabajos/26/5/LAJOP_26_5_1_2_B321C1PA89.pdf

BLANCO, B et al. Descripción anatómica, propiedades medicinales y uso potencial de *Plantago major* (llantén mayor). *Tecnología en Marcha.* 2008. (Costa Rica). Volumen 21. Número 2. Pp. 17-24. [Consulta 12 de octubre de 2015]. Disponible en:

http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/viewFile/107/106

BRUNETON, J. *Farmacognosia Fitoquímica Plantas Medicinales.* Segunda Edición. Zaragoza-España 1996. pp. 227-233

CABEZAS, G. “Evaluación del Efecto Cicatrizante de Extractos a Base de Mastuerzo (*Tropaeolum majus*) en Ratones (*Mus musculus*)”. (Tesis pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica Farmacia. Riobamba. Ecuador. 2014. Pp.29-32. [Consulta 06 de agosto de 2015]. Disponible en:

<http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/3737/1/56T00480%20UDCTFC.pdf>

CANO, R. Métodos de análisis microbiológico. Normas ISO, UNE. Topics, Books. Renata. 2010. Pp. 12-29. [Consulta 04 de agosto de 2015]. Disponible en:
<http://es.scribd.com/doc/27307620/metods-aerobios-mesofilos>

CARBALLO, C, et al. Desinfección química de plantas medicinales II. *Plantago lanceolata* L. *Revistas Cubanas*. 2002. Cuba. Volumen 3. Número 3. . [Consulta 04 de septiembre de 2015]. ISSN 1028-4796. Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962002000300003&script=sci_arttext

CARRILLO, J; ISASMENDI S. Aportes botánicos de salta. Herbario MCNS. 1998. (Argentina). Volumen 5. N° 4. PP. 1-4. [Consulta 04 de agosto de 2015]. ISSN 0327-506X. Disponible en:
<http://www.unsa.edu.ar/biblio/herbario/flora/vol5/pdf/4.%20AMARANTHACEAE.pdf>

CIOMS. *Principios Directrices Internacionales para la Investigación Biomédica que Implique el Uso de Animales*. Ginebra. 1985. Pp. 1-2.

CUESTA, F, et al. Editores. *Avances en investigación para la conservación de los páramos andinos*, CONDESAN. Pp.15-30 [Consulta 05 de agosto de 2015]. Disponible en:
http://web.intercom.es/jorgemas/Libro_Sutura.pdf

FERREIRA, B. Macro y Microambiente. *Scielo.Books*. 2002. Rio de Janeiro. Pp. 1-5. [Consulta 23 de agosto de 2015]. ISSN 0187-7380. Disponible en:
<http://books.scielo.org/id/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869-09.pdf>

FRESNO, A. *Farmacognosia General*. Paris. Segunda edición. 1993. Pp 76- 80; 191-210.

GENOVESE, P. *Bioterios y Laboratorio de Experimentacion Animal (LEA)*. 2009. [Consulta 22 de septiembre de 2015]. Disponible en:
http://www.urbe.fmed.edu.uy/cursos/animales_experimentacion/Macro%20y%20micro%20ambiente.pdf

GUÍA PARA CONTROL DE CALIDAD PARA PLANTAS MEDICINALES DE LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD: OMS. WHO Guidelines on Good Manufacturing Practices (GMP) for Herbal Medicines. Editorial de la OMS. Francia. 2007. Pp.12-14

HERNÁNDEZ, L. *Densidad*. Alcalá de Henares-España. 26 de noviembre de 2012. [Consulta 12 de agosto de 2015]. Disponible en:

<http://www.cienciaonline.com/2012/11/26/%C2%BFcuando-podemos-asegurar-que-un-cuerpo-es-mas-denso-que-otro/>

HIDALGO, O. *Determinación del efecto cicatrizante del extracto acuotánico de la planta Bacopa procumbens en la línea celular 3t3 de fibroblastos de ratón*. (Tesis pregrado). Instituto Politécnico Nacional. México. 2010. Pp- 1-14. [Consulta 05 de agosto de 2015]. Disponible en:

<http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/7502/DETEREFECTO.pdf?sequence=1>

HYSERVE GMBH et al. 2015. *Compact Dry*. Alemania. Pp. 1-8. [Consulta 04 de agosto de 2015]. Disponible en:

http://hyserve.de/files/CompactDry_ES.pdf

NTE INEN 2 392:2007. *Hierbas Aromáticas*. Quito-Ecuador. 2007. Pp. 1-4. [Consulta 10 de agosto de 2015]. Disponible en: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.2392.2007.pdf>

JORDI, M. *Cicatrización de Heridas*. España. REVISAT. Fundación Dr. Jordi Mas. Pp.5-20 [Consulta 05 de agosto de 2015]. Disponible en:

http://web.intercom.es/jorgemas/Libro_Sutura.pdf

KUKLINSKI, C. *Farmacognosia Estudio de las Drogas y Sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona- España. Omega S.A. 2000. Pp 106-116.

LAPPENA, E; MEDINA, et al. Actividad bactericida y fungicida de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional venezolana. *SciELO*. 2003. (Colombia). Volumen 34. Número 1. ISSN 0798-0477. [Consulta 04 de agosto de 2015]. Disponible en:

http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-04772003000100002&script=sci_arttext

LICUY, L. *“Estudio Farmacognóstico y Actividad Cicatrizante del Jatun Quilun Quilun”*. (Tesis pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica Farmacia. Riobamba. Ecuador. 2013. Pp.60-96.

LÓPEZ, G; PINO, A. Guía de manejo de Llantén *Plantago australis*. *Jardin Botanico de Bogota José Celestino Mutis*. (Colombia) pp 1-10. [Consulta 04 de agosto de 2015]. Disponible en:

<http://jbbrepositorio.metabiblioteca.org/bitstream/001/173/6/Anexo%206%20Guia%20tecnica%20Plantago.pdf>

MARCANO, D; HASEGAWA, M. *Fitoquímica Orgánica*. Segunda edición. Venezuela. Torino. 2002. [Consulta 10 de agosto de 2015]. Disponible en:
https://books.google.com.ec/books?id=hPkjgPwXDQC&pg=PA134&dq=compuestos+fenolicos&hl=es&sa=X&ved=0CBsQ6AEwAGoVChMIyY6_i7uxwIVDBseCh13Agv4#v=onepage&q=compuestos%20fenolicos&f=false

MARTÍNEZ J. Metabolitos secundarios en el guayacán amarillo y en el guayacán rosado. *Scientia Et Technica*. 2011. (Colombia) volumen 17. N° 47. Pp 1-6. [Consulta 05 de agosto de 2015]. ISSN 0122-1701. Disponible en:
<http://www.redalyc.org/pdf/849/84921327055.pdf>

MELEGA, J. *Biología de la Cicatrización de los tejidos*, Cirugía plástica, reparadora y estética. Rio de Janeiro. Brasil. 1992. Pp. 9-13

MIRANDA, M. *Medicamentos de Origen Vegetal. Extractos y Tinturas*. Normas Ramales. MINSAP. 1991.

MRAD, A. *Ética en la investigación con animales*. Ética y bioética. Cátedra de Manuel Ancizar. 2001. Pp. 1,9. [Consulta 02 de septiembre de 2015]. Disponible en:
http://www.bdigital.unal.edu.co/783/21/263_-_20_Capi_19.pdf

NAVARRETE, G., Revista Facultad Medicina UNAM. Histología de la piel., No.4., Vol.46., México., Julio-Agosto, 2003., Pp. 131-132

NAVARRO, P et al. Proceso experimental de cicatrización en conejos. *Revista Científica Arte y Ciencia Médica*. 2005. (Sucre.). Pp 1-5. [Consulta 01 de agosto de 2015]. ISSN 9999-8888. Disponible en:
http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S9999-88882005000100003&script=sci_abstract

OLMEDO, D. Farmacognosia y Fitoterapia. Escuela de Farmacia. Departamento de Química Medicinal y Farmacognosia., Universidad de Panamá. Farmacognosia. Módulo I. Panamá. 2009. Pp. 6,7,11, 12, 16,17. [Consulta 12 de septiembre de 2015]. Disponible en:
<http://www.slideshare.net/dionisioantonio/apuntes-modulo-farmacognosia-tecnico>

OROZCO, M. “Evaluación de la actividad cicatrizante de un gel elaborado a base de los extractos de molle (*Schinus molle*), cola de caballo (*Equisetum arvense L.*), linaza (*Linum usitatissimum L.*) En ratones (*Mus musculus*)”. (Tesis pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica Farmacia. Riobamba. Ecuador. 2013. Pp.7-21. [Consulta 14 de agosto de 2015]. Disponible en:
<http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/2585/1/56T00357.pdf>

PALMEIRO, N et al. Analgesic and Anti-inflammatory Properties of *Plantago australis* Hydroalcoholic Extract. *Acta Farm. Bonaerense*. 2002. (Brasil). Volumen 21. N°2. Pp.1-4 [Consulta 04 de agosto de 2015]. ISSN 0326-2383. Disponible en:
http://www.latamjpharm.org/trabajos/21/2/LAJOP_21_2_1_2_43SE7O6J11.pdf

PALMEIRO, N et al. Oral subchronic toxicity of aqueous crude extract of *Plantago australis* leaves. *ScienceDirect*. 2003. Volumen 88. Pp 15-18. [Consulta 03 de agosto de 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874103001375>

PEREZ, J. *La Cicatriz Patológica Estudio Clínico y Anatomopatológico*. Sevilla. España. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla. 1978. [Consulta 10 de agosto de 2015]. Disponible en:
<https://books.google.com.ec/books?id=60PJfhLybYcC&pg=PA27&lpg=PA27&dq=cicatrizacion+patologicafalse>

PLAZA, E. Realizar el estudio fitoquímico y de actividad biológica de dos especies altoandinas priorizadas dentro del proyecto 318. *Jardin Botanico de Bogota José Celestino Mutis*. 2011. (Colombia) pp 85-88 [Consulta 04 de agosto de 2015]. Disponible en:
<http://ut-repositorio.metabiblioteca.org/handle/001/511>

PINTO, J et al. Evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos de llantén (*Plantago major*). *Revistas Bolivianas*. 2008. (Bolivia). Pp. 1-6. [Consulta 04 de septiembre de 2015]. Disponible en:
<http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/rbfb/v16n1/v16n1a07.pdf>

RAMÍREZ, R; GONZÁLEZ J. Métodos alternativos para el tratamiento de pacientes con heridas infectadas. *Hospital Clinicoquirúrgico Docente Dr. Joaquín Castillo Duany*. 2011. (Cuba). [Consulta 02 de agosto de 2015]. Disponible en:
http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol_15_4_11/san15411.htm

REDROBÁN, K. “Comprobación del efecto cicatrizante de los extractos hidroalcohólicos de Berro (*Nasturtium officinale*) y Llantén (*Plantago major*) en ratones (*Mus Musculus*). (Tesis pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica Farmacia. Riobamba. Ecuador. 2012. Pp.54-82.

ROBALINO, C. “Evaluación del efecto antidiarréico y cicatrizante de la infusión y del extracto etanólico de *Cyclospermum leptophyllum* (Pers.) Sprague en ratones (*Mus musculus*) y conejos (*Oryctologus cuniculus*)”. (Tesis pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica Farmacia. Riobamba. Ecuador. 2014. Pp.10-14. [Consulta 05 de agosto de 2015]. Disponible en:
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3314/1/56T00439.pdf>

SALAZAR, A et al. *Citología e Histología*. Universidad de Murcia. Pp. 1-2. [Consulta 15 de agosto de 2015]. Disponible en:
<http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/citologia-e-histologia-veterinaria/material-de-clase-1/tema36-piel.pdf>

SALEM, C et al. Cicatrices Hipertróficas y Queloides. *Uach*. 2002. (Chile). Volumen 16. Pp. 1-8. [Consulta 23 de agosto de 2015]. ISSN 0187-7380. Disponible en:
<http://mingaonline.uach.cl/pdf/cuadrcir/v16n1/art13.pdf>

SANABRIA, M. Características generales de la especie llanten (*Plantago australis*). *Jardin Botanico de Bogota José Celestino Mutis*. 2008. (Colombia). Pp. 1-3 [Consulta 04 de agosto de 2015]. Disponible en:
<http://www.metadirectorio.org/bitstream/001/7111/1/LLANTEN%20PAQUETE%20TECNOLOGICO.pdf>

SOLER B et al. Drogas crudas. Normas ramales. Medicamentos de origen vegetal. La Habana: Ministerio de Salud Pública 1992:72

SORIANO, M et al. Aspectos Fitoquímicos y Actividad Cicatrizante. *UNMSM*. 2004. (Perú). Volumen 2. Pp 1-5. [Consulta 01 de agosto de 2015]. ISSN 1561-0861. Disponible en:
http://sisbib.unmsm.edu.pe/Bvrevistas/ciencia/v07_n2/pdf/cap7.pdf

TAYLOR, V; RIOS Y; LEON, D. Plantas con actividad fotosensibilizadora y potencial terapéutico en leishmaniasis cutánea: hipericina, una alternativa prometedora. *Scielo, infectio*.

2013. (Colombia). Volumen 17. Pp 1-13. [Consulta 01 de agosto de 2015]. ISSN 0123-9392. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v17n2/v17n2a07.pdf>

TOLOSA, H. *Llantén (Plantago australis)*. Buenos Aires- Argentina. Watermark. 21 de marzo de 2014. [Consulta 05 de agosto de 2015]. Disponible en: <http://florabonaerense.blogspot.com/2014/03/llanten-plantago-tomentosa.html>

VADEMÉCUM FARMACOLÓGICO. *Prednisolona (tópico) + Neomicina Sulfato*. [Consulta 04 de agosto de 2015]. Disponible en: http://www.saluddealtura.com/vademecum/principio.php?CAT_CODIGO=9.1.2.1.1.4.4

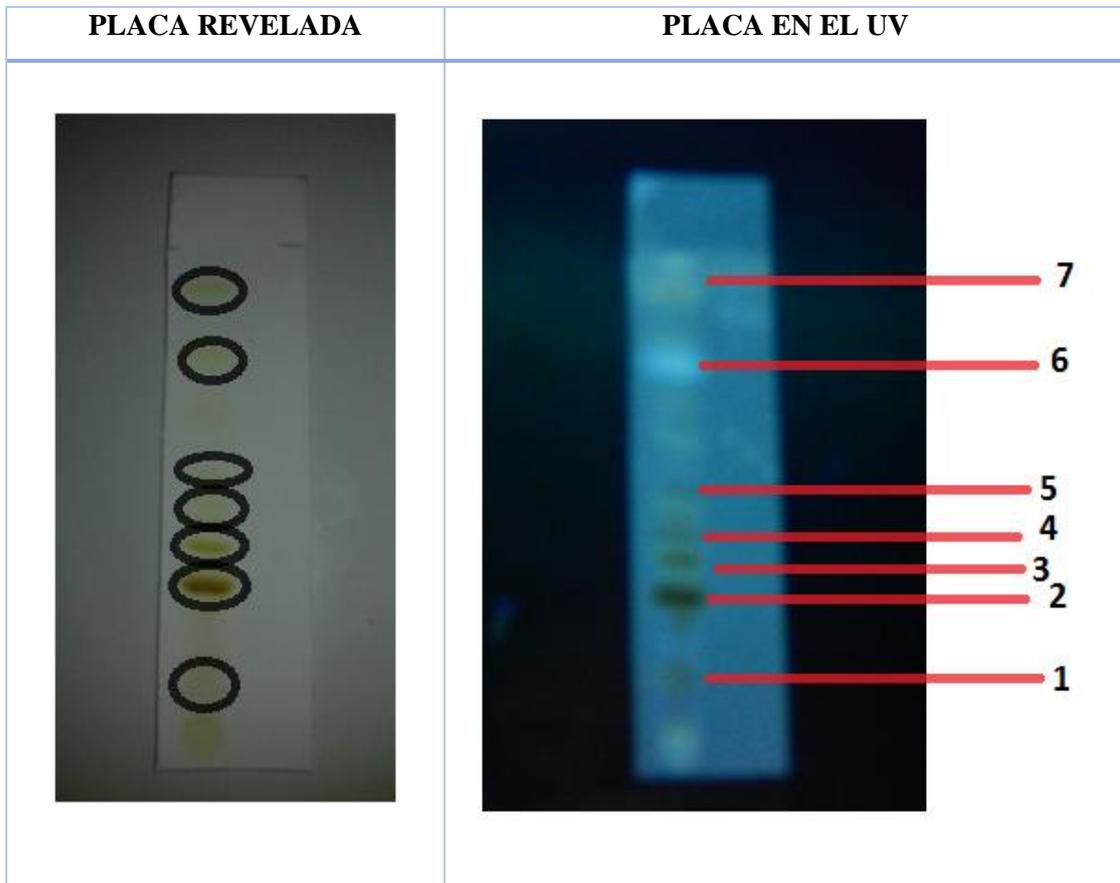
VIZOSO, A et al. Evaluación del efecto genotóxico en extractos fluidos de *Plantago lanceolata* L. (llantén menor) y *matricaria recutita* L. (manzanilla). Revista Cubana. 2000. (Cuba). Volumen 5. Número 2. Pp. 1-5. . [Consulta 05 de octubre de 2015]. Disponible en http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol5_2_00/pla07200.pdf

WAGNER, H; BLADT. S. *Plant Drug Analysis a Thin Layer Chromatography*. Segunda edición. Alemania springer- Verlag Berlin Heidelberg New York. 2001. Pp. 195-244.

XLSTAT, 2015. [Consulta 12 de agosto de 2015]. Disponible en: <http://www.xlstat.com/es/centro-de-aprendizaje/tutoriales/como-realizar-un-anova-de-un-factor-seguido-de-una-prueba-de-tukey.html>

ANEXOS

Anexo A: Cromatografía en Capa Fina de extractos de Llantén De Páramo (*Plantago australis*).

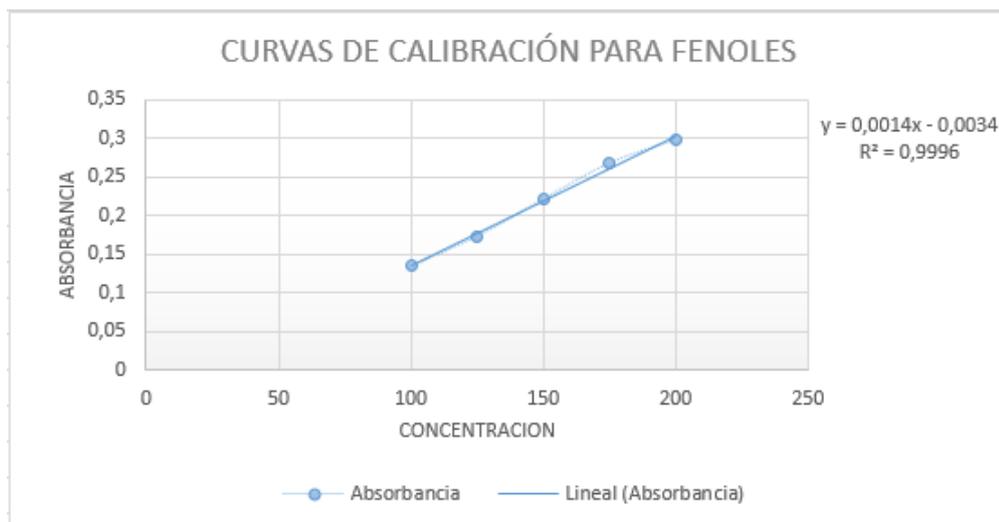


Realizado por: Asto V. 2015

Anexo B. Tabla de valores y Curvas de calibración del estándar para cuantificación de fenoles totales

Absorbancias	Concentración en ppm (μg de ácido gálico/ mL de extracto)
0,135	100
0,174	125
0,222	150
0,269	175
0,299	200

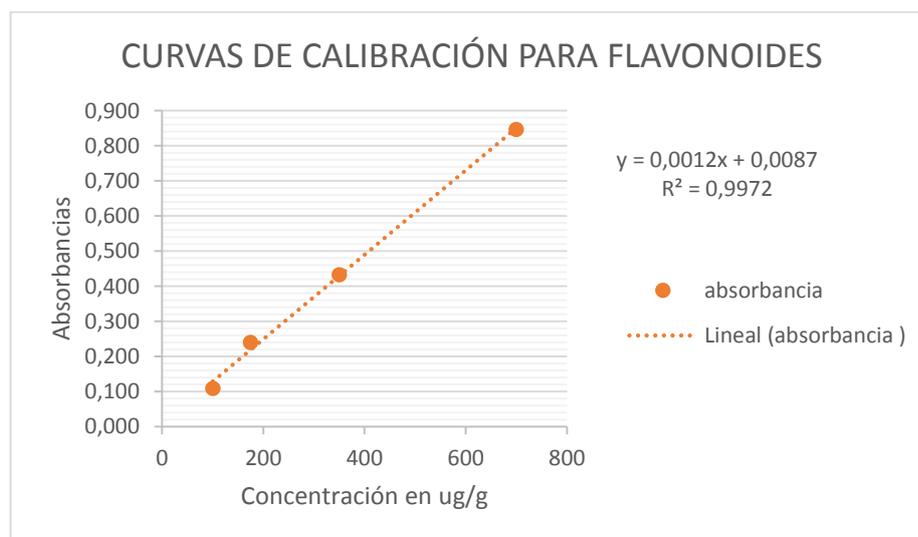
Realizado por: Asto, V. 2015



Anexo C. Tabla de valores y Curvas de calibración del estándar para cuantificación flavonoides totales.

CONCENTRACIONES en ppm (μg μg de quercetina/ mL de extracto)	ABSORBANCIA
100	0,109
175	0,240
350	0,433
700	0,847

Realizado por: Asto V. 2015



Realizado por: Asto V. 2015

Anexo D. Peso de los Animales de Experimentación al inicio del Tratamiento. Bioterio. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Agosto. 2015.

PESO DE RATONES AL INICIO DEL TRATAMIENTO			
Grupos	Sexo	Numero	Peso
Sin tratamiento	M	1	38,1
	M	2	39,3
	H	3	37,5
	H	4	37,8
Tratamiento con El acetato de prednisolona 0,5 g, sulfato de neomicina 0,5 g	H	1	34,4
	H	2	38,6
	H	3	36,7
	H	4	37,5
Tratamiento con Alcohol 40%	M	1	40,0
	M	2	39,1
	H	3	37,2
	H	4	36,2
Tratamiento con extracto 25%	M	1	39,7
	M	2	38,9
	H	3	36,6
	H	4	37,8
Tratamiento con extracto 50%	M	1	40,0
	M	2	40,0
	H	3	36,9
	H	4	37,8
Tratamiento con extracto 75%	M	1	39,7
	M	2	40,0
	H	3	36,8
	H	4	37,9

Realizado por: Asto V. 2015

M: machos

H: hembras

Anexo E. Recolección del material vegetal Llantén de Páramo (*Plantago australis*)



Llantén de Páramo (*Plantago australis*)



Laguna negra- Sangay.

Anexo F. Planta de Llantén de Páramo (*Plantago australis*) seca y pulverizada



Material vegetal seco



Material vegetal pulverizado.

Anexo G. Control de Calidad del Llantén de Páramo (*Plantago australis*).



Calcinación de las muestras



Muestras en la mufla



Desecador con muestras



Humedad



Cenizas



Pesos de las muestras

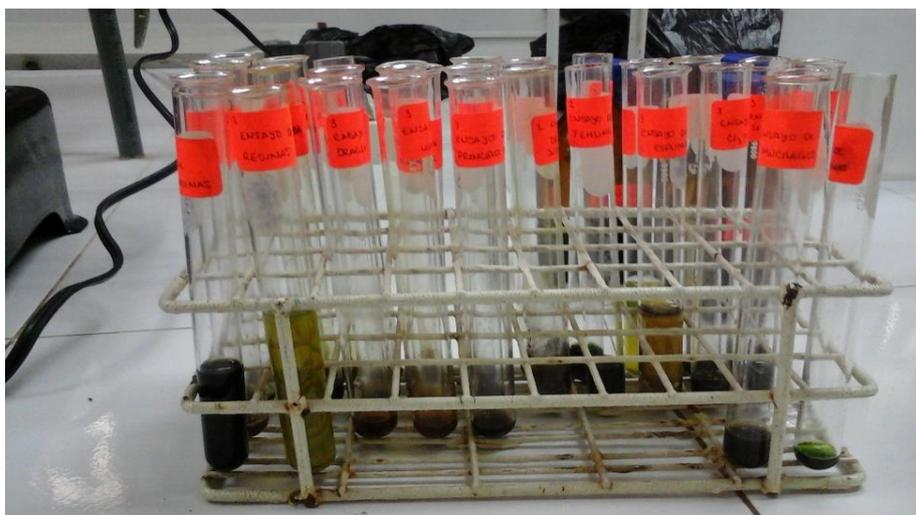
Anexo H. Tamizaje fitoquímico de los extractos de las hojas del Llantén de Páramo (*Plantago australis*).



Reactivos para el Tamizaje



Extractos etéreo, etanólico y acuoso



Tamizaje fitoquímico de los tres extractos de las hojas del llantén de páramo

Anexo I. Preparación de los extractos de las hojas del Llantén de Páramo (*Plantago australis*).



Maceración del material vegetal



Filtración del extracto



Concentración de extracto



Extracto concentrado.

Anexo J. Control de Calidad de los extractos de las hojas del Llantén de Páramo (*Plantago australis*).



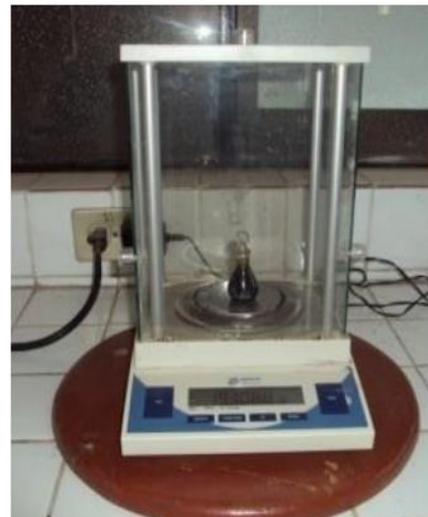
Determinación de pH



Índice de refracción

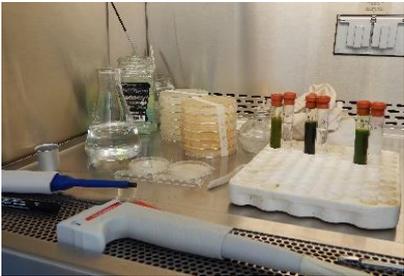
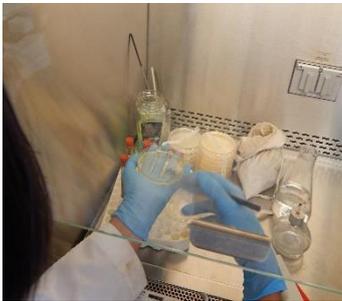
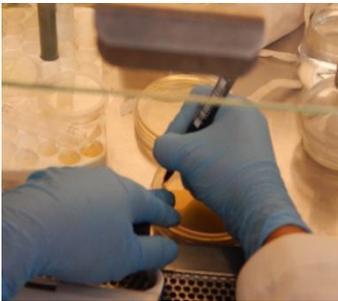
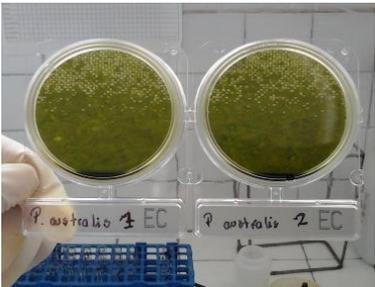
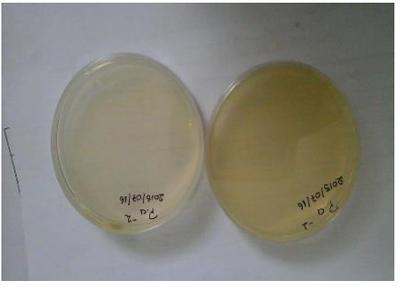


Sustancias solubles



Determinación de densidad

Anexo K. Control de Calidad Microbiológica de los extractos de las hojas del Llantén de Páramo (*Plantago australis*).

 <p>Preparación de medios de cultivo</p>	 <p>Preparación de diluciones</p>	 <p>Muestras y medios de cultivo</p>
 <p>Siembra en las cajas Petri</p>	 <p>Codificación de cajas Petri.</p>	 <p>Incubar los medios de cultivo</p>
Recuento microbiológico		
 <p><i>Escherichia. coli</i></p>	 <p>Aerobios mesófilos</p>	 <p>Mohos y levaduras</p>

Anexo L. Cuantificación de metabolitos secundarios de los extractos de las hojas del Llantén de Páramo (*Plantago australis*).



Anexo M. Evaluación de la actividad cicatrizante de los extractos de las hojas del Llantén de Páramo (*Plantago australis*) en ratones

Aclimatación



Depilación de los ratones



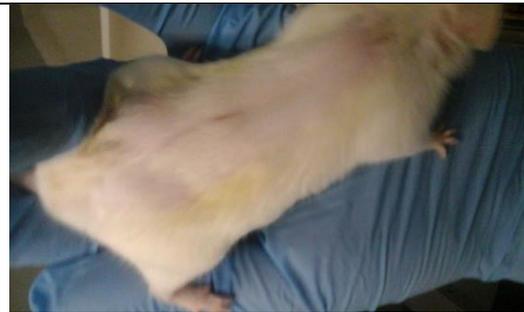
Inducción de la lesión



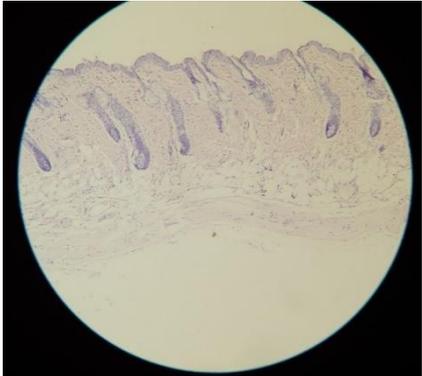
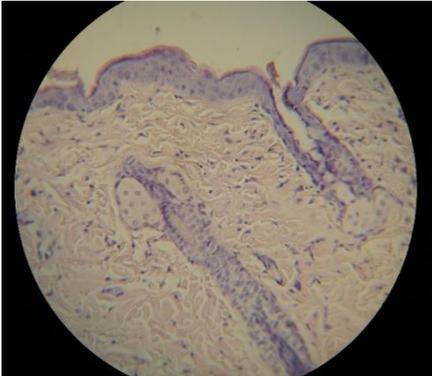
Aplicación del tratamiento



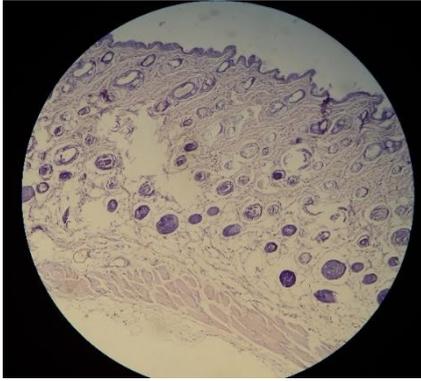
Final del tratamiento



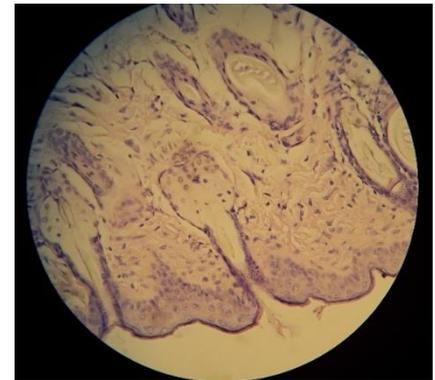
Anexo N. Estudio histopatológico de la piel de los animales de experimentación.

 <p>Eutanasia</p>	 <p>canastillas</p>
 <p>Muestra de piel</p>	 <p>Canastillas con muestra en formol</p>
FOTOGRAFÍAS DE LOS TEJIDOS	
10x	40x
CONTROL NEGATIVO	
	

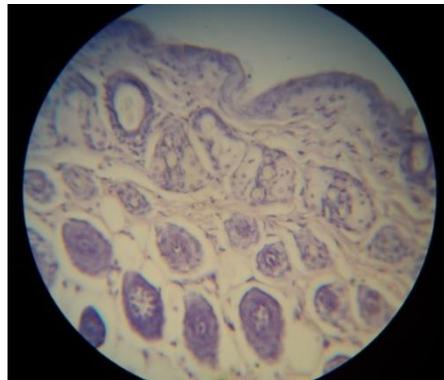
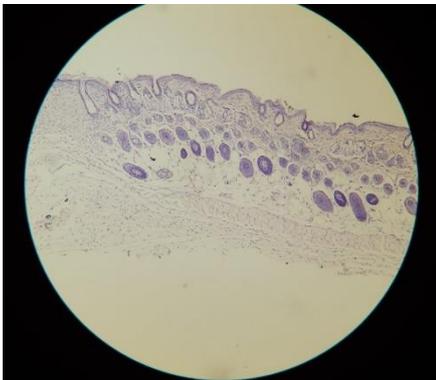
CONTROL POSITIVO A



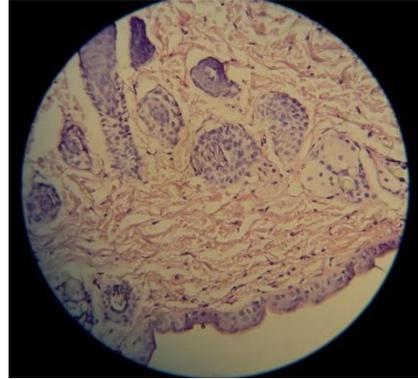
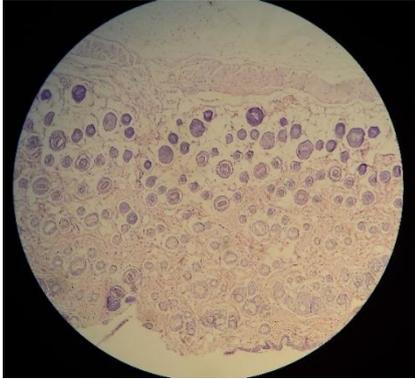
CONTROL POSITIVO B



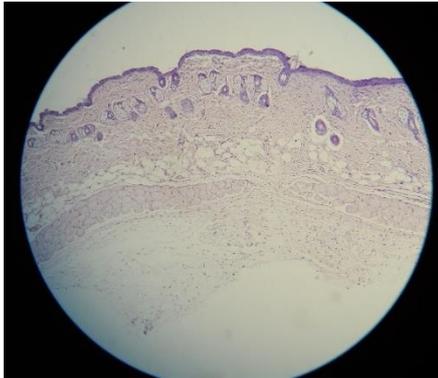
TRATAMIENTO 1



TRATAMIENTO 2



TRATAMIENTO 3



ANEXO O. Autorización de recolección del material vegetal del MAGAP



AUTORIZACION DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

No. 004 - IC - DPACH - MAE 2015
Riobamba, 13 de agosto del 2015

FLORA SILVESTRE

X

FAUNA

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere la Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre, autoriza a: SANDRA VIVIANA ASTO GUAMÁN, domiciliado en la ciudad de Riobamba, con cédula de ciudadanía N° 060553820-6 correo electrónico: svag_a@hotmail.com para llevar a cabo la investigación "EVALUACION DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE EXTRACTOS DE HOJAS DE LLANTEN DE PÁRAMO (*Plantago australis*) EN LESIONES, INDUCIDAS EN RATONES (*mus musculus*)," en la Provincia de Chimborazo, Cantón Guamote, Parroquia Cebadas, Parque Nacional Sangay sector de la Laguna Negra.

De acuerdo a las siguientes especificaciones:

- 1.- Solicitud de Sandra Asto.
- 2.- Valoración Técnica del Proyecto: Ing. Paúl Tito
- 4.- Contraparte del Ministerio del Ambiente: Dirección Provincial del Ministerio del Ambiente de Chimborazo, Ing. Christian Clavijo, Administrador del Parque Nacional Sangay Zona Alta.
- 5.- Se autoriza la colección de especímenes de flora según lo indicado en el proyecto:
1 kg de hojas de *Plantago australis*.
- 6.- Vigencia de esta Autorización: 13 de agosto del 2015 al 31 de octubre del 2015.

Obligaciones del investigador:

1. Entregar dos copias en formato impreso y digital (formato PDF) de los resultados finales de la investigación en castellano.
2. Entregar los resultados finales de la investigación al Parque Nacional Sangay Zona Alta
2. Entregar copias de las fotografías (impreso y digital) que formen parte de la investigación.
3. La autorización es válida para los sitios especificados en el proyecto cuyas coordenadas indicadas y citadas en los sitios de muestreo y toma de muestras se llevará a cabo la Investigación son:

SITIO	X	Y	Altitud
Laguna Negra	777785	9759205	3539

4. La Investigadora Sandra Viviana Asto Guamán, se compromete entregar al Ministerio del Ambiente dos documentos de los resultados finales de la investigación, así como para al área protegida, Parque Nacional Sangay Zona Alta;
5. Es de responsabilidad de la persona antes indicada la entrega del registro fotográfico de la especie fotografiada, objeto de su investigación, en formato digital, incluyendo la localización exacta de los especímenes observados o muestras colectadas, con las coordenadas UTM WGS 1984. y otra información según formato de la base de datos del Ministerio del Ambiente.

Obligaciones de la Institución solicitante:

1. Del cumplimiento de las obligaciones dispuestas en el numeral anterior se responsabiliza a la señorita SANDRA VIVIANA ASTO GUAMÁN, **Investigador Principal**. Con cédula de ciudadanía N° 060553820-6, y de cumplir con los plazos de entrega de informes finales o parciales físicos y digitales, hasta el 31 de Octubre del 2015.


Ing. Marcelo Pino

DIRECTOR PROVINCIAL DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO (E)


pt.

 Ministerio del Ambiente
DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL
MINISTERIO DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO

ANEXO P. Norma INEN 2 392:2007. Hierbas Aromáticas. Requisitos

CDU: 663.85
ICS: 67.140.10



CIU: 3121
AL 02.06-410

Norma Técnica
Ecuatoriana
Voluntaria

HIERBAS AROMÁTICAS.
REQUISITOS.

NTE INEN
2 392:2007
2007-01

1. OBJETO

1.1 Esta norma establece los requisitos que deben cumplir las plantas aromáticas, procedentes de las diversas especies que se destinan a la preparación de infusiones para el consumo humano.

2. ALCANCE

2.1 Esta norma se aplica a las hierbas aromáticas procedentes de las especies de plantas de las que se tiene su caracterización taxonómica, toxicológica y química (ver 6.1.1).

3. DEFINICIONES

3.1 Hierbas aromáticas. La denominación de hierbas aromáticas comprende ciertas plantas o partes de ellas (raíces, rizomas, bulbos, hojas, cortezas, flores, frutos y semillas) que contienen sustancias aromáticas (aceites esenciales), y que por sus aromas y sabores característicos, se destinan a la preparación de infusiones.

3.2 Té de hierbas. Con el nombre genérico de té de hierbas se conoce al procedente de especies vegetales procesadas con las que se prepara infusiones diferentes al té de las teáceas.

4. DISPOSICIONES GENERALES

4.1 Las hierbas aromáticas deben, corresponder taxonómicamente a la especie declarada, que cumplan condiciones higiénicas y presentar las características macroscópicas y microscópicas que les son propias.

4.2 Las hierbas aromáticas deben estar limpias y exentas de materia extraña.

4.3 No debe contener más de 15% de otras partes del vegetal exentas de propiedades aromatizantes y saborizantes.

4.4 Las hierbas aromáticas deben contener los aceites esenciales que caracteriza a cada una.

4.5 Las hierbas aromáticas pueden expendirse enteras o molidas, solas o mezcladas entre sí, adicionadas con frutas, azúcar o miel en una cantidad que no supere el 20 %.

4.6 Se permite la adición de saborizantes naturales y artificiales permitidos en la NTE INEN 2 074.

4.7 Las hierbas aromáticas se deben procesar bajo las condiciones establecidas en el Código de la Salud y sus Reglamentos que permita reducir la contaminación.

4.8 Los residuos de plaguicidas, pesticidas y sus metabolitos, no podrán superar los límites establecidos por el Codex Alimentario en su última edición.

4.9 No se permite la adición de colorantes.

4.10 Los procesadores de hierbas aromáticas deberán cumplir con buenas prácticas de manufactura y se exigirá paulatinamente a los productores el cumplimiento de los requisitos de Buenas Prácticas Agrícolas.

(Continúa)

DESCRIPTORES: Tecnología de alimentos, té, hierbas aromáticas, requisitos.

TABLA 1. Requisitos físicos-químicos

Requisitos	Máx	Método de ensayo
Humedad, %	12	NTE INEN 1114
Cenizas insolubles en HCl al 10 %, % m/m	2	NTE INEN 1118

TABLA 3. Requisitos Microbiológicos

REQUISITO	Máx	Método de ensayo
Aerobios totales ufc/g	1×10^7	NTE INEN 1529-5
Escherichia coli ufc/g	1×10^6	NTE INEN 1529-7
Enterobacteriaceas ufc/g	1×10^5	NTE INEN 1529-13
Mohos y levaduras upc/g	1×10^4	NTE INEN 1529-10
Clostridium, ufc/g	ausencia	NTE INEN 1529-18
Salmonella, en 1 g	ausencia	NTE INEN 1529-15
Shigella, en 1 g	ausencia	NTE INEN 1529-16

6.1.4 El contenido máximo de contaminantes presentes se especifican en la tabla 4.

TABLA 4. Contenido máximo de contaminantes

Contaminante	mg/kg
Arsénico, As	1,0
Plomo, Pb	0,5

ANEXO Q. Certificado de Control de Similitud

URKUND

Document [ESCRITO TESIS para presentar.docx](#) (D15682342)

Submitted 2015-10-14 14:09 (-05:00)

Submitted by Sandra Viviana Asto Guamán (svag_a@hotmail.com)

Receiver elizabeth.escudero.esepoch@analysis.orkund.com

Message Tesis Viviana Asto [Show full message](#)

4% of this approx. 36 pages long document consists of text present in 16 sources.