



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE *IN VITRO*
DEL GERANIO (*Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey) MEDIANTE
INHIBICIÓN DE HIALURONIDASA”

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: ANA SOLEDAD SÁNCHEZ CARRASCO

TUTOR: BQF. DIEGO VINUEZA TAPIA M.Sc.

Riobamba – Ecuador

2015

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de titulación certifica que el trabajo de investigación: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE *IN VITRO* DEL GERANIO (*Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey) MEDIANTE INHIBICIÓN DE HIALURONIDASA.” de responsabilidad de la señorita egresada Ana Soledad Sánchez Carrasco, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF Diego Vinueza Tapia M.Sc.

**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

BQF Fausto Contero Bedoya

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Susana Abdo

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DOCUMENTALISTA

SISBIB ESPOCH

Yo, Ana Soledad Sánchez Carrasco, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados, expuestos en este Trabajo de titulación y el patrimonio intelectual del trabajo de titulación pertenece exclusivamente a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

ANA SOLEDAD SÁNCHEZ CARRASCO

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo de titulación a Dios, quién ha sido mi guía y mi trascendental inspiración. Su bendición se convirtió en mi principal fortaleza en momentos de triunfo y alegría pero fundamentalmente cuando la derrota o la tristeza me invitaban a rendirme o desfallecer.

A mis papitos Jorgito y Anita ejemplo constante de superación, por su esfuerzo, abnegación y ternura, los llevo en mi corazón por sus consejos sabios, aliento y amor incondicional. A mis mejores amigas mis ñañas Tatiana y Pamela, fieles en la adversidad y muchas veces invisibles en la prosperidad, por su bondad estoy segura que su futuro será lleno de éxitos y satisfacciones.

A mi abuelita Anita, mi madrina querida que siempre ha estado pendiente de mí, le dedico mis más nobles sentimientos. A mi tía Angelita por esas palabras sabias que permanecerán por siempre vigentes en mi mente y en mi corazón, mi compromiso infinito es que jamás las defraudaré porque lo que soy también es consecuencia de su afecto y dedicación.

Sol

AGRADECIMIENTO

Nunca terminaré de agradecer el testimonio de amor que permanentemente ha mostrado Dios en mi vida, el presente trabajo de titulación representa una demostración adicional de su amor y bendición.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Facultad de Ciencias y a mi querida Escuela de Bioquímica y Farmacia por darme la oportunidad de utilizar sus instalaciones académicas y contribuir con mi formación axiológica y profesional.

A mi entrañable familia principal origen de inspiración, metas y anhelos.

A quienes guiaron con inteligencia y experiencia la presente investigación mi tutor B.Q.F Diego Vinuesa Tapia y colaborador B.Q.F Fausto Contero por el gran apoyo y aporte brindado en la elaboración del presente trabajo de investigación mi gratitud y respeto imperecedero.

A mis amigos y a todos aquellos que me brindaron su ejemplo y cariño y por supuesto a quienes colaboraron para la culminación de esta etapa académica y por todas las vivencias compartidas mi eterno afecto, respeto y lealtad.

Sol

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A	Absorbancia
AEA	Actividad estimuladora de ácido hialurónico
CAT	Catalasa
C5a	Convertasa
°C	Grados Celsius
dL	Decilitro
EGCG	Epigallocatequina-3-Galata
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ERO	Especies reactivas del oxígeno
g	Gramo
HA	Ácido hialurónico
INEC	Instituto Nacional de Estadísticas y Censos
Kg	Kilogramo
mg	Miligramo
Min	Minutos
mL_t	Mililitro
mm	Milímetro
Mm	Milimoles
M	Molar
N	Normal
NADPH:	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato reducido
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
p.a	Para análisis
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
ppm	Partes por millón
seg	Segundos
SOD	Superóxido dismutasa
uL	Microlitros
UV	Ultravioleta

TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
CERTIFICACIÓN.....	ii
DECLARACION DE RESPONSABILIDAD.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	vi
TABLA DE CONTENIDO.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
SUMARY	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	4
1 MARCO TEÓRICO	4
1.1 Fitoterapia.....	4
<i>1.1.1 Objetivos de la fitoterapia:</i>	<i>4</i>
1.2 Fitomedicina	4
1.3 Planta Medicinal.....	4
1.4 Generalidades de la planta	5
<i>1.4.1 Geranio</i>	<i>5</i>
<i>1.4.2 Género Pelargonium</i>	<i>5</i>
<i>1.4.3 Pelargonium x domesticum. L. H. Bailey.....</i>	<i>6</i>
1.5 Cicatrización	8
<i>1.5.1 Las fases de cicatrización de heridas.....</i>	<i>8</i>
<i>1.5.2 Efectos de la diabetes en la cicatrización de heridas</i>	<i>12</i>
<i>1.5.3 Efectos del tabaco en la cicatrización de heridas.....</i>	<i>13</i>
<i>1.5.4 Fitocompuestos esenciales en la cicatrización acelerada de heridas</i>	<i>13</i>

1.6	Los flavonoides	14
<i>1.6.1</i>	<i>Estructura química.....</i>	<i>14</i>
<i>1.6.2</i>	<i>Propiedades terapéuticas de los flavonoides</i>	<i>15</i>
1.7	Actividad cicatrizante in vitro.....	16
<i>1.7.1</i>	<i>Ácido Hialurónico</i>	<i>16</i>
<i>1.7.2</i>	<i>Utilidad terapéutica del ácido hialurónico.....</i>	<i>17</i>
1.8	Modelos in vitro.....	18
<i>1.8.1</i>	<i>Enzima Hialuronidasa</i>	<i>18</i>
<i>1.8.2</i>	<i>Hialuronato</i>	<i>20</i>
<i>1.8.3</i>	<i>Composición del veneno de cobra Naja naja.....</i>	<i>21</i>
 CAPÍTULO II		22
2	MARCO METODOLÓGICO.....	22
2.1	Lugar de recolección del material vegetal.....	22
2.2	Lugar de identificación taxonómica del geranio rey blanco.....	22
2.3	Lugar de investigación.....	22
2.4	Materiales, equipos y reactivos	22
<i>2.4.1</i>	<i>Material vegetal.....</i>	<i>22</i>
<i>2.4.2</i>	<i>Materiales</i>	<i>23</i>
<i>2.4.3</i>	<i>Equipos</i>	<i>24</i>
<i>2.4.4</i>	<i>Reactivos.....</i>	<i>24</i>
2.5	Técnicas y Métodos	26
<i>2.5.1</i>	<i>Determinación de los parámetros de calidad de la droga vegetal.....</i>	<i>26</i>
<i>2.5.2</i>	<i>Tamizaje fitoquímico.....</i>	<i>28</i>
2.6	Preparación del extracto de <i>Pelargonium x domesticum</i>.....	31
2.7	Cromatografía en capa fina (TLC).....	32
<i>2.7.1</i>	<i>Cromatografía de la fracción flavónica a partir del extracto metanólico 60% de (<i>Pelargonium x domesticum</i> L.H. Bailey).....</i>	<i>32</i>
2.8	Cuantificación de fenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu	33
2.9	Cuantificación de flavonoides totales mediante un método colorimétrico	33

2.10	Determinación de la actividad cicatrizante in vitro	34
2.10.1	<i>Determinación de la inhibición de la hialuronidasa.....</i>	34
CAPÍTULO III.....		37
3	MARCO DE RESULTADOS, ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS ..	37
3.1	Control de calidad de la materia vegetal.....	37
3.2	Tamizaje Fitoquímico	38
3.3	Cromatografía en capa fina.....	39
3.3.1	<i>Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica de hojas y flores</i>	<i>39</i>
3.4	Cuantificación de fenoles y flavonoides totales.....	41
3.4.1	<i>Cuantificación de fenoles totales</i>	<i>41</i>
3.4.2	<i>Cuantificación de flavonoides totales</i>	<i>42</i>
3.5	Actividad cicatrizante in vitro mediante inhibición de la hialuronidasa	43
3.5.1	<i>Inhibición de la hialuronidasa bovina</i>	<i>44</i>
3.5.2	<i>Inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra Naja naja.....</i>	<i>46</i>
3.5.3	<i>Análisis estadístico</i>	<i>50</i>
CONCLUSIONES.....		51
RECOMENDACIONES.....		53
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1	Taxonomía del <i>Pelargonium x domesticum</i> L.H. Bailey.....	7
Tabla 2-2	Lista de materiales empleados en los diferentes ensayos	23
Tabla 3-2	Lista de equipos empleados en las diferentes determinaciones.....	24
Tabla 4-2	Lista de reactivos empleados en la investigación.....	24
Tabla 5-2	Protocolo de tratamientos del <i>Pelargonium x domesticum</i> L.H. Bailey en inhibición de la hialuronidasa bovina.....	35
Tabla 6-2	Protocolo de tratamientos del <i>Pelargonium x domesticum</i> L.H. Bailey en inhibición de la hialuronidasa presente en el veneno de cobra <i>Naja naja</i>	36

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1-3	Control de calidad de las hojas y flores de la planta seca <i>Pelargonium x domesticum</i> L.H. Bailey.	37
Cuadro 2-3	Tamizaje fitoquímico de los extractos de hojas y flores de <i>Pelargonium x domesticum</i> L.H. Bailey. Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba Junio 2015.....	38
Cuadro 3-3	Resultados de la determinación de Rf de la cromatografía en capa fina de la fracción flavónica de hojas y flores de <i>Pelargonium x domesticum</i> L.H. Bailey.....	40
Cuadro 4-3	Curva de calibración de ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu.....	41
Cuadro 5-3	Curva de calibración de quercetina por el método de tricloruro de aluminio.....	42
Cuadro 6-3	Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa bovina por efecto de las fracciones flavónicas de las hojas y flores del <i>Pelargonium x domesticum</i> L.H. Bailey.....	44
Cuadro 7-3	Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra <i>Naja naja</i> por efecto de la fracción flavónica de hojas y flores del <i>Pelargonium x domesticum</i> L.H. Bailey.....	46
Cuadro 8-3	Efecto de la fracción flavónica de hojas del <i>Pelargonium x domesticum</i> L.H. Bailey en la inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra <i>Naja naja</i>	47
Cuadro 9-3	Efecto de la fracción flavónica de flores del <i>Pelargonium x domesticum</i> L.H. Bailey en la inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra <i>Naja naja</i>	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1	Geranio rey blanco <i>Pelargonium x domesticum L.H. Bailey</i>	6
Figura 2-1	Fase de la cicatrización de heridas.....	8
Figura 3-1	Estructura básica de los flavonoides con su respectiva numeración.....	14
Figura 4-1	Ejemplos de flavonoides agliconas.....	15
Figura 5-1	Ejemplos de flavonoides glicósidos.....	15
Figura 6-1	Estructura de hialuronato y los productos después de la escisión eliminativa realizada por un hialuronato liasa bacteriana.....	20
Figura 7-2	Diagrama de identificación taxonómica del geranio rey blanco realizado en el Herbario Nacional del Ecuador.....	22
Figura 8-2	Obtención de metabolitos secundarios para realizar el tamizaje fitoquímico.....	29.
Figura 9-2	Diagrama de flujo para obtención de extractos de <i>Pelargonium x domesticum L.H. Bailey</i>	32
Figura10-3	Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica de las hojas y flores de <i>Pelargonium x domesticum L.H. Bailey</i>	39
Figura11-3	Curva de calibración del estándar de ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu.....	41
Figura12-3	Curva de calibración del estándar de quercetina.....	43
Figura13-3	Curva del % de inhibición de la hialuronidasa bovina por efecto de las fracciones flavónicas de las hojas y flores del <i>Pelargonium x domesticum L.H. Bailey</i>	45
Figura14-3	Curva del % de inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra <i>Naja naja</i> por efecto de la fracción flavónica de las flores del <i>Pelargonium x domesticum L.H. Bailey</i>	47
Figura15-3	Curva del efecto de la fracción flavónica de hojas del <i>Pelargonium x domesticum L.H. Bailey</i> en inhibición de hialuronidasa del veneno de cobra.....	48
Figura16-3	Curva de calibración del efecto de la fracción flavónica de flores del <i>Pelargonium x domesticum L.H. Bailey</i> en inhibición de hialuronidasa del veneno de cobra <i>Naja naja</i>	49

INDICE DE ANEXOS

- ANEXO A** Materia prima *Pelargonium x domesticum L.H. Bailey*
- ANEXO B** Parámetros de calidad del material vegetal
- ANEXO C** Obtención de extractos de flores y hojas de *Pelargonium x domesticum L.H. Bailey*
- ANEXO D** Tamizaje fitoquímico de los extractos
- ANEXO E** Obtención de la fracción flavónica de las hojas y flores del *Pelargonium x domesticum L.H. Bailey*
- ANEXO F** Fracción flavónica de flores y hojas del *Pelargonium x domesticum L.H. Bailey*
- ANEXO G** Cromatografía en capa fina
- ANEXO H** Preparación del reactivo de Folin Ciocalteu
- ANEXO I** Cuantificación de compuestos fenólicos totales
- ANEXO J** Cuantificación de compuestos flavónicos
- ANEXO K** Ensayo de inhibición de la hialuronidasa bovina
- ANEXO L** Ensayo de inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra
- ANEXO M** Análisis estadístico de los resultados de la inhibición de la hialuronidasa bovina por efecto de las hojas
- ANEXO N** Análisis estadístico de los resultados de la inhibición de la hialuronidasa bovina por efecto de las flores
- ANEXO O** Análisis estadístico de los resultados de la inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra por efecto de las hojas
- ANEXO P** Análisis estadístico de los resultados de la inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra por efecto de las flores

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue evaluar la actividad cicatrizante *in vitro* del geranio (*Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey) mediante inhibición de hialuronidasa. Una muestra seca y prensada de la planta se identificó taxonómicamente en el Herbario Nacional del Ecuador, se realizó la recolección y secado de la materia vegetal, después se efectuó el control de calidad de las hojas y flores previamente pulverizadas, se desarrolló el tamizaje fitoquímico de los extractos hidroetanólicos, se obtuvo los extractos hidrometanólicos mediante un proceso de extracción por soxhlet y se efectuó la cuantificación de fenoles y flavonoides totales mediante espectrofotometría UV, se obtuvo la fracción flavónica y se realizó la cromatografía en capa fina (TLC) de hojas y de flores. Se utilizó distintos tratamientos para la fracción flavónica de las hojas y de flores, los cuales fueron (0.625; 1.5; 2.5; 5; 10 y 20 mg/mL) para los ensayos de inhibición de hialuronidasa; se empleó un blanco negativo y un control de actividad máxima de la enzima. Los resultados obtenidos en la inhibición de hialuronidasa bovina fueron satisfactorios en los tratamientos de hojas y de flores a la dosis de 0,625mg/mL con un 90,89% y 92,49% de inhibición respectivamente; los resultados alcanzados para la inhibición de hialuronidasa del veneno de cobra *Naja naja* fueron representativos en dosis más diluidas 0,00000009 mg/mL de hojas y de flores con más de un 50% de inhibición. Se concluyó que a menor dosis de fracción flavónica de hojas y de flores de *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey se obtuvo mayor porcentaje de inhibición de hialuronidasa y por ende ofrece un mejor efecto cicatrizante en heridas. Se recomienda realizar un estudio más exhaustivo sobre los constituyentes flavónicos presentes en las hojas y flores del *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey, para de este modo determinar que compuesto es causante de la actividad cicatrizante.

Palabras Clave: <ACTIVIDAD CICATRIZANTE>, <GERANIO [*Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey]>, <INHIBICIÓN DE HIALURONIDASA [enzima]>, <EXTRACTOS HIDROETANÓLICO>, <TAMIZAJE FITOQUÍMICO>, <EXTRACTOS HIDROMETANÓLICO>, <FRACCIÓN FLAVÓNICA>, <CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA [TLC]>, <VENENO DE COBRA [*Naja naja*]>, <EFECTO CICATRIZANTE>, <FARMACIA>.

SUMMARY

The objective of this research was to evaluate the wound healing activity *in vitro* of geranium (*Pelargonium x domesticum L.H. Bailey*) through hyaluronidase inhibition. A dry and pressed sample was taxonomically identified in the Ecuadorian National Herbarium. After the sample was collected, the plant material was dried and pulverized. After that, the quality of leaves and flowers were supervised and subject to the phytochemical screening of the hydro-ethanol extracts. The hydro-methanol extracts were obtained through an extraction process called Soxhlet. The quantification of total phenols and flavonoids was done with the spectrophotometry UV. The flavonic fraction was obtained, and the thin layer chromatography (TLC) of leaves and flowers was also performed. Different treatments for the flavonic fraction of leaves and flowers were used, and were as follows (0.625; 1.5; 2.5; 5; 10 and 20 mg/mL) for the essay of hyaluronidase inhibition. A negative white and some control of the maximum enzyme activity. The results obtained in bovine hyaluronidase inhibition were satisfactory for the treatments with leaves and flowers at 0.625 mg/mL dose with a 90.89% and 92.49% of inhibition respectively. The results reached for the cobra poison *Naja naja* hyaluronidase inhibition were representative in more diluted doses 0.000000009 mg/mL of leaves and flowers with more than 50% of inhibition. It was concluded that with lower doses of flavonic fraction of leaves and flowers of *Pelargonium x domesticum L.H. Bailey* a higher percentage of hyaluronidase inhibition was obtained; therefore, it offers a better wound healing effect. It is recommend to do a further study about the flavonic constituents present in leaves and flowers of *Pelargonium x domesticum L.H. Bailey* so that the agent that causes the wound healing can be determined.

Key words: <WOUND HEALING>, <GERANIUM [*Pelargonium x domesticum L.H. Bailey*]>, <HYALURONIDASE INHIBITION [enzyme]>, <HYDRO-ETHANOL EXTRACTS>, <PHYTOCHEMICAL SCREENING>, <HYDRO-METHANOL EXTRACTS>, <FLAVONIC FRACTION>, <THIN LAYER CHROMATOGRAPHY [TLC]>, <COBRA POISON [*Naja naja*]>, <HEALING EFFECT>, <PHARMACY>.

INTRODUCCIÓN

El 80% de la población mundial cuidan su salud por medio de medicinas basadas en plantas medicinales y sus productos derivados, utilizados milenariamente en la medicina tradicional y son cada vez más valiosos como materia prima en la preparación de medicamentos modernos (occidentales) para la industria farmacéutica y herbal, cuyo mercado sigue una tendencia hacia un aumento significativo. Más de las dos terceras partes de las especies de plantas del mundo, de las cuales al menos 35.000 tienen valor medicinal, se originan en los países en desarrollo. (Vallejo, 1998, pp.4-8)

En el Ecuador muchas de las plantas más utilizadas fueron introducidas por los españoles como el Geranio (*Pelargonium spp.*), la Manzanilla (*Matricaria chamomilla*), la Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*), pero hay otras también utilizadas que son nativas o son naturalizadas o domesticadas como la Sábila (*Aloe vera*) y la Chilca (*Bacharis spp.*); todas estas plantas crecen también en los jardines de las casas y se utilizan ornamentalmente o para consumo doméstico. (Buitrón, 1999, pp. 1-5)

Todas las personas somos propensos a sufrir una herida en la piel debido a accidentes laborales por ejemplo al manipular un cuchillo, una tijera, vidrios, al tropezar y tener una caída o un golpe fuerte. Las personas con mayor riesgo de sufrir infecciones de las heridas son aquellos cuyo sistema inmunológico dista de ser óptimo. Un factor importante es la edad, los niños recién nacidos y los ancianos corren un riesgo especial de infección uno de los problemas más relacionados con ellos es la diabetes mellitus mal controlada que interviene desfavorablemente tanto en el desarrollo de infecciones como en la cicatrización de la heridas. (Calne, 2005, pp.2-3).

El síndrome de pie diabético es una de las complicaciones crónicas que suscitan mayor morbimortalidad y discapacidad en individuos diabéticos; aproximadamente un 15% de los pacientes con Diabetes Mellitus tienden a desarrollar úlcera en cierto instante de su vida y que de estos, un 10 al 30% progresan a la amputación. (Zambrano, 2014, p. 4).

El gran número de pacientes con heridas crónicas graves es actualmente una preocupación mundial. A nivel mundial aproximadamente 6 millones de pacientes tienen heridas crónicas como úlceras del pie diabético, úlceras de decúbito, úlceras por estasis venosa, y las heridas quirúrgicas que no sanan. (Farzaei, Abbasabadi, & Shams, 2014, pp.26-30).

Los estudios sobre plantas medicinales a base de hierbas confirmaron que estos exhiben menos efectos secundarios en comparación con los agentes químicos, y son menos costosos. (Farzaei, Abbasabadi, & Shams, 2014, pp.26-30).

Todas estas razones impulsan a la búsqueda de bases teóricas por medio de la investigación del uso de la medicina natural con acción terapéutica en la cicatrización de heridas leves o complicadas.

El geranio género *Pelargonium* es utilizado por la sabiduría popular (etnobotánica) como remedio casero para las hemorragias externas porque las cesa, para afecciones pulmonares, inflamación de encías y otras padecimientos periodontales, también como analgésico, cicatrizante, antibacteriano, etc; su acción farmacológica depende de principios activos como los compuestos flavónicos ejercen el efecto cicatrizante, existiendo sinergismos y acciones coadyuvantes entre ellos. (Karolina, Huamán, & Laimé, 2008, pp. 85-97).

Este estudio busca contribuir de manera directa con el Plan Nacional del Buen Vivir, impulsando el interés de manejo de recursos naturales en este caso de una planta que tiene más uso ornamental como es el geranio rey blanco (*Pelargonium x domesticum L.H. Bailey*), planta introducida cuyos fitoconstituyentes como los flavonoides ayudan a la regeneración celular y a la vez la inhibición de la enzima hialuronidasa, permite desarrollar un método más confiable sin utilizar modelos experimentales *in vivo*, por medio del uso de modelos *in vitro* se puede comprender la respuesta de curación de las heridas. (Subalakshmi, y otros, 2014, pp. 127-131)

Esta investigación proporciona evidencia científica para su divulgado en cuanto a la cicatrización de heridas impulsando el interés de manejo de especies vegetales con fines terapéuticos en este caso de una planta que tiene uso ornamental, y permite un tratamiento de bajo costo siendo una opción accesible para los pacientes que sufren alguna alteración en la cicatrización de heridas evitando llegar a la necrosis o en la amputamiento lo que permitirá contribuir a una mejor estilo de vida.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la actividad cicatrizante *in vitro* del geranio (*Pelargonium x domesticum L.H. Bailey*) mediante inhibición de hialuronidasa.

Objetivos Específicos

1. Realizar el tamizaje fitoquímico de los extractos hidroetanólicos de las hojas y flores del *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey.
2. Obtener la fracción flavónica de los extractos hidrometanólicos y cuantificar fenoles y flavonoides totales de hojas y flores del *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey.
3. Identificar cualitativamente los compuestos presentes en la fracción flavónica de hojas y flores del *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey mediante cromatografía en capa fina.
4. Determinar la actividad inhibitoria de la fracción flavónica de hojas y flores del *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey en hialuronidasa.

CAPÍTULO I

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Fitoterapia

Actualmente la fitoterapia es definida como la ciencia que realiza el estudio sobre la utilización de plantas con propiedades terapéuticas o sus derivados para tener un efecto farmacológico en un estado patológico. (Hernández, 2004, <http://www.redalyc.org/pdf/856/85640404.pdf>).

1.1.1 *Objetivos de la fitoterapia:*

- Deshinchar la herida,
 - Ayudar a la cicatrización aumentando la regeneración celular,
 - Impedir las infecciones bacterianas en lesionadas provocadas por quemaduras, cortes, acné.
- (Hernández, 2004, <http://www.redalyc.org/pdf/856/85640404.pdf>).

1.2 Fitomedicina

Según la OMS, Organización Mundial de la Salud define a la Fitomedicina como la utilización de principios activos de plantas y vegetales medicinales en terapéutica, sustentados en el conocimiento científico actual base al actual en farmacodinamia, farmacología, farmacocinética, estudios pre-clínicos, clínicos; estos son divulgados mediante comunidades científicas. (Morales & Morales, 2009, pp.1-3).

1.3 Planta Medicinal

Es cualquier planta que en uno o varios órganos contiene sustancias que son utilizadas terapéuticamente o que son precursores para la hemisíntesis químico-farmacéutica. (Morales & Morales, 2009, pp.1-3).

Las plantas medicinales son valiosos no solo para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos, sino también como materiales de base o como modelos para elaborar compuestos farmacológicamente activos, gracias a los principios activos que contiene cada una de las partes u órganos de las plantas; éstas sustancias alteran o modifican el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal. (Morales & Morales, 2009, pp.1-3).

La investigación científica ha permitido descubrir una variada gama de principios activos, de los cuales los más importantes desde el punto de vista de la salud, son los aceites esenciales, los alcaloides, los glucósidos o heterósidos, los mucílagos y gomas, y los taninos. (Morales & Morales, 2009, pp.1-3).

1.4 Generalidades de la planta

1.4.1 Geranio

Cuando hablamos del geranio nos referimos a varias especies y dos géneros diferentes: *Pelargonium* y *Geranium*. Es decir, que se confunde los nombres de estos géneros debido a que el término ‘geranio’ es el nombre habitual de ciertas especies de *Pelargonium*. La diferencia entre ambos géneros fue descrita por L’Héritier, la característica principal que los distinguen son: presencia de un tubo nectario en el género *Pelargonium* y la diferencia en el número de estambres. (Alonso, 2002, p.8).

Los nombres vienen del griego y se refieren a las formas semejantes a picos de aves que obtienen sus frutos. Así la palabra “*Geranium*” deriva de geranos que significa grulla y “*Pelargonium*” procede de pelargos, que significa cigüeña. (Alonso, 2002, p.9).

1.4.2 Género *Pelargonium*

El género *Pelargonium* contiene alrededor de 280 especies y contiene una matriz de variación en la morfología y las formas de vida florales. Son un grupo de plantas anuales o perennes, arbustivas o arbustos que están característicamente erguidos o decumbentes, ramificadas o muy ramificadas. (Yvette, 2005, pp.28-29).

Su floración es corta pero a la vez abundante alcanza su florecimiento entre mayo y junio y prosigue hasta septiembre. Suele necesitar vernalización, para desarrollarse necesita abundante luz solar (doce horas al día) aunque soporta la semisombra. (Alonso, 2002, pp.5-6), Este genero es más conocido en cuanto a plantas de jardines.

Las flores de *Pelargonium* varían en color desde el blanco, tonos crema (amarillos), rosa, salmón, naranja, rojo y malva a morado, muchos poseen en el interior del pétalo una mancha coloreada intensamente. Faltan colores notables incluyen un verdadero amarillo y azul. Se encuentran flavonoides de acompañamiento en un rango de 3-O-mono-y-3-O-diglucósidos de kaempferol y quercetina y el 7-O-glucósido de kaempferol. (Mitchell, Markham, & Boase, 1998, p.355).

El color de la flor se deriva predominantemente a partir de derivados de antocianidina y flavonol. Las antocianidinas más comunes que se encuentran en pétalos con zonas interiores manchadas con un nivel de pigmentación de 5-10 veces mayores que la de la porción exterior son: delfinidina, petunidina y malvidina. (Mitchell, Markham, & Boase, 1998, p.356).

1.4.2.1 Distribución de especies *Pelargonium*

La mayoría de *Pelargonium* se encuentra en el hemisferio sur, donde casi el género entero (alrededor de 200 especies) se encuentra en África del Sur. Gran cantidad de las especies crecen en el amplio litoral que se extiende desde el desierto de Namib (norte) al cabo (sur) y a lo largo de la costa hacia el Mar Oriental, se presentan como grupos irregulares, aislados distribuidos dentro de la franja costera occidental. Se especula que la amplia distribución del género es el resultado de la deriva continental. (Yvette, 2005, p.30).

1.4.3 *Pelargonium x domesticum*. L. H. Bailey

Es un cultivo de origen híbrido complejo, generalmente de *P. cucullatum* y *P. grandiflorum*, con nombre de fantasía, utilizado principalmente por los floricultores. Conocido como geranio de pensamiento o pelargonio suelen tener porte rastrero y forma de mata. (Alonso, 2002, p.5).

Su floración es corta pero abundante alcanza su apogeo entre mayo y junio y prosigue hasta septiembre. Suele necesitar vernalización. Las flores son grandes semejantes a las de la azalea de muchos colores brillantes y normalmente con manchas en los pétalos en forma de pluma. Necesita abundante luz solar (doce horas al día) aunque soporta la semisombra y sus hojas son profundamente dentadas. (Alonso, 2002, p.6).



Figura 1-1: Geranio rey blanco *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey
Realizado por: Ana Sánchez, 2015

1.4.3.1 Clasificación taxonómica

Tabla 1-1: Taxonomía del *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey

Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden:	Geraniales
Familia:	Geraniaceae
Género:	Pelargonium.
Especie:	Pelargonium x domesticum LH Bailey –Pelargonium regio.

Fuente: (Center for Invasive Species and Ecosystem Health, 2010, <http://www.invasive.org/browse/subinfo.cfm?sub=55925>)

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

1.4.3.2 Composición química del género *Pelargonium*.

En las fracciones volátiles de *Pelargonium* predominan los monoterpenos oxigenados, seguido de los sesquiterpenos oxigenados. Diversos estudios han mostrado que el aceite de geranio contiene como constituyentes mayoritarios citronelol y geraniol. Hay una significativa variación en la composición del aceite esencial del *Pelargonium* depende de los cultivares y las condiciones de cultivo. (Mendivelso, Olivares, Martínez, & Stashenko, 2007, pp.183-184)

En un estudio realizado con hojas de 58 taxones de *Pelargonium* (Geraniaceae) se evidenció que la quercetina esta universalmente presente, los taninos son los componentes mayoritarios, es decir proantocianidinas y elagitaninos y el ácido gálico libre. Los constituyentes que usualmente se encuentran son miricetina, flavona C-glucósidos y luteolina. (Williams, Newman, & Gibby, 2000, pp. 119-132).

1.4.3.3 Propiedades medicinales

Tiene potente acción antiinflamatoria, corta las hemorragias, desinfecta y cicatriza (Acosta, 1992. p.136). De ahí sus propiedades benéficas en problemas dermatológicos como en heridas, abscesos, fiebre, cólicos, nefritis y supresión de orina, los catarros y dolores de garganta, hemorroides, gonorrea y también se utilizan para las infecciones antihelmínticas, como insecticida, enfermedades periodontales. Todas las partes de la planta son astringentes. (Karolina, Huamán, & Laime, 2008, pp.87-88)

1.5 Cicatrización

La cicatrización de heridas es un proceso complejo y dinámico de reemplazar estructuras celulares y capas de tejido desvitalizado y desaparecido donde ocurre una respuesta restauradora natural a la lesión tisular. (Simon, 2014,p.1).

Ocurre una interacción de una compleja cascada de eventos celulares que genera repavimentación, reconstrucción y restauración de la resistencia a la tracción de la piel lesionada. (Simon, 2014,p.1).

1.5.1 Las fases de cicatrización de heridas

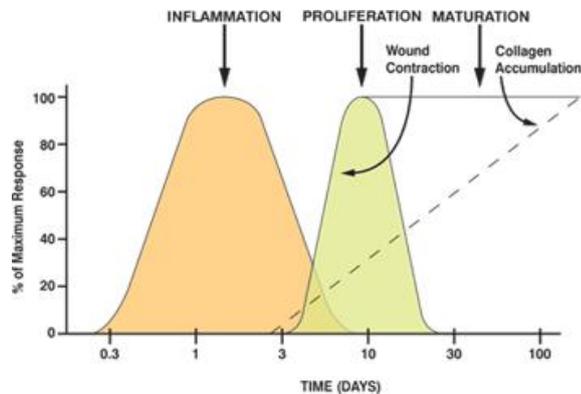


Figura 2-1: Fase de la cicatrización de heridas

Fuente: Simon, 2014,p.2

1.5.1.1 Hemostasia

Inicia dentro de los primeros momentos de la lesión, las plaquetas desempeñan un papel mediante la agregación, así como por la liberación de citocinas, quimiocinas, y hormonas. (Simon, 2014,p.2).

La vasoconstricción ocurre para limitar la pérdida de sangre bajo los efectos de mediadores vasoactivos (adrenalina, noradrenalina, prostaglandinas, serotonina y tromboxano), causando escaldado temporal de la herida. El subendotelio expuesto, incluyendo el colágeno y el factor tisular, activa la agregación de plaquetas y conduce a la formación de coágulos. (Simon, 2014,p.2).

La agregación y el apego a las superficies de colágeno expuestas activa las plaquetas para la degranulación y la liberación quimiotácticos y factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), proteasas, y agentes vasoactivos (por ejemplo,

serotonina, histamina). Las quimiocinas liberadas por la activación plaquetaria atraen células inflamatorias a la zona, lo que lleva a la siguiente fase en el proceso de curación. (Simon, 2014,p.2).

1.5.1.2 Fase inflamatoria

Además de la activación de la fibrina, la trombina activada por las cascadas de coagulación facilita la migración de células inflamatorias al sitio de la lesión mediante el aumento de la permeabilidad vascular. Los factores y las células necesarias para la curación de flujo desde el espacio intravascular y en el espacio extravascular. En este momento, la formación del coágulo se disipa como sus estímulos se disipan. El plasminógeno se convierte en plasmina, una enzima potente que ayuda en la lisis celular. (Mercandetti, 2015,p.5).

El período de vasoconstricción inicial, típicamente sólo 10-15 minutos de duración, es seguido por un período más persistente de la vasodilatación mediada por la histamina, prostaglandinas, quininas y leucotrienos. (Mercandetti, 2015,p.5).

La vasodilatación es un medio importante por el cual la herida puede estar expuesta a un mayor flujo de sangre, acompañado de las células inflamatorias y factores que combaten las infecciones y desbridar la herida de tejido desvitalizado. Las alteraciones en el pH (secundarias al tejido y la degradación bacteriana) hipoxemia tisular, inflamación y en el sitio de la lesión contribuyen a la sensación de dolor de la herida. (Mercandetti, 2015,p.5).

Los neutrófilos son el tipo celular predominante durante las primeras 48 horas después de la lesión, estas células limpian el sitio de la herida de las bacterias y el material necrótico y liberan los mediadores inflamatorios y radicales libres de oxígeno bactericidas. (Mercandetti, 2015,p.5).

Los macrófagos son esenciales para la cicatrización de heridas y son las células más importantes en la fase temprana de la cicatrización de heridas, fagocitan desechos y bacterias, segregan colagenasa y elastasa, rompen el tejido y la liberación de citoquinas lesionados; además liberan PDGF, una citocina importante que estimula la quimiotaxis y la proliferación de los fibroblastos y las células musculares lisas. Estos secretan sustancias que atraen a las células endoteliales a la herida y estimulan su proliferación para promover la angiogénesis. (Mercandetti, 2015,p.5).

Factores de crecimiento derivados de macrófagos juegan un papel fundamental en la formación de nuevo tejido, como se evidencia por el hecho de que la nueva formación de tejido en las heridas de los animales de macrófagos dañados demuestra reparación defectuosa. (Mercandetti, 2015,p.5)

Los linfocitos T migran en la herida durante la fase inflamatoria, aproximadamente 72 horas después de la lesión. Son atraídos a la herida por la liberación celular de la interleucina 1, contribuyen a la regulación de la colagenasa. Los linfocitos secretan linfoquinas tales como el factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina y el factor de crecimiento de fibroblastos básico. Los linfocitos también juegan un papel en la inmunidad celular y la producción de anticuerpos. (Mercandetti, 2015,p.5)

1.5.1.3 Fase proliferativa

La formación de tejido de granulación es un evento central durante la fase proliferativa. Su formación se produce 3-5 días después de la lesión y se solapa con la fase inflamatoria anterior. El tejido de granulación incluye células inflamatorias, fibroblastos y neovasculatura en una matriz de colágeno, fibronectina, glicosaminoglicanos, y proteoglicanos (Mercandetti, 2015,p.5).

Epitelización: Formación de epitelio, las células migran a los bordes de la herida a una distancia de 1 mm, de un lado de la incisión a la otra. El proceso de epitelización de la herida ocurre alrededor de 24-48 horas después de la lesión. Esta capa epitelial proporciona un sello entre la herida subyacente y el medio ambiente. (Mercandetti, 2015,p.5).

Las células epidérmicas en los bordes de la herida se someten a cambios estructurales, lo que les permite separar de sus conexiones con otras células epidérmicas y a su membrana basal. Se forman microfilamentos de actina intracelular, permitiendo que las células de la epidermis avancen a través de la superficie de la herida. (Mercandetti, 2015,p.5).

Las células epidérmicas secretan colagenasas que descomponen el colágeno y el activador del plasminógeno, que estimula la producción de plasmina. La plasmina promueve la disolución de coágulos en el camino de la migración de las células epiteliales, estas células interactúan con una matriz provisional de la fibrina reticulada a la fibronectina y colágeno. En particular, la fibronectina promueve la adhesión de los queratinocitos para guiar a estas células a través de la base de la herida. (Mercandetti, 2015,p.5).

Fibroplasia: El fibroblasto es un componente crítico de tejido de granulación. Los fibroblastos son responsables de la producción de colágeno, elastina, fibronectina, glicosaminoglicanos, y proteasas en la herida como el número de células a disminuir la inflamación. (Coursin, Connery, & Ketzler, 2004, p.30).

Inicia de 3-5 días después de la lesión y puede durar hasta 14 días. Los fibroblastos migran y proliferan en respuesta a la fibronectina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento transformante, y C5a. Sirve como un ancla para el miofibroblastos ya que migra dentro de la herida. (Coursin, Connery, & Ketzler, 2004, p.30).

El colágeno es secretada al espacio extracelular en forma de procolágeno. Esta forma es escindida de sus segmentos terminales y llamada tropocolágeno que puede agregarse con otras moléculas de tropocolágeno para formar filamentos de colágeno. (Coursin, Connery, & Ketzler, 2004, p.30).

Filamento, fibrillas, y la formación de fibras se producen dentro de una matriz de gel de glicosaminoglicanos, el ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatansulfato de heparina son producidos por los fibroblastos. (Coursin, Connery, & Ketzler, 2004, p.30)

Los enlaces intermoleculares cruzados dentro de la fibra de colágeno se estabilizan, por lo que es resistente a la destrucción. La síntesis de colágeno comienza aproximadamente 3 días después de la lesión y puede continuar a un ritmo rápido aproximadamente de 2-4 semanas. La síntesis de colágeno se controla por la presencia de colagenasas y otros factores que destruyen el colágeno se forma nuevo colágeno. (Coursin, Connery, & Ketzler, 2004, p.30).

Aproximadamente el 80% del colágeno en la piel normal es colágeno de tipo I; el restante es principalmente de tipo III. En contraste, el colágeno tipo III es el componente principal del tejido de granulación temprano y es abundante en el tejido embrionario. Las fibras de colágeno se depositan en un marco de fibronectina. (Coursin, Connery, & Ketzler, 2004, p.30).

Angiogénesis: Un rico suministro de sangre es vital para sostener el tejido recién formado y se aprecia en el eritema de una cicatriz recién formado. El macrófago es esencial para la estimulación de la angiogénesis y produce factor angiogénico, los cuales se derivan en respuesta a baja oxigenación de los tejidos. Este proceso cesa con la demanda de nuevos vasos sanguíneos que llegan a ser innecesarios desaparecen por apoptosis.(Coursin, Connery, & Ketzler, 2004, p.30).

Contracción: La contracción de la herida inicia casi simultáneamente con la síntesis de colágeno, se define como el movimiento centrípeto de bordes de la herida que facilita el cierre de un defecto de la herida, aproximadamente de 5-15 días después de la lesión. Como resultados se tiene una disminución del tamaño de la herida. La contracción de la herida depende de la

miofibroblastos situado en la periferia de la herida, su conexión a los componentes de la matriz extracelular, y la proliferación de miofibroblastos. (Coursin, Connery, & Ketzler, 2004, p.30).

1.5.1.4 Fase de Maduración

La remodelación del colágeno mientras continúa la síntesis de colágeno en presencia de la destrucción del colágeno. Las colagenasas y metaloproteinasas de la matriz ayudan a eliminar el exceso de colágeno mientras que la síntesis de nuevo colágeno persiste y los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas limitan estas enzimas colagenolíticas, de modo que existe un equilibrio entre la formación de nuevo colágeno y la eliminación de colágeno viejo. (Coursin, Connery, & Ketzler, 2004, p.30).

Durante la remodelación, el colágeno se organiza cada vez más. La fibronectina desaparece gradualmente, y el ácido hialurónico y glicosaminoglicanos se sustituyen por proteoglicanos. El colágeno tipo III se sustituye por colágeno tipo I. El agua de la cicatriz se reabsorbe, así las fibras de colágeno se encuentran más juntas, facilitando el entrecruzamiento del colágeno y, finalmente, la disminución del espesor de la cicatriz. (Coursin, Connery, & Ketzler, 2004, p.30)

Los enlaces cruzados del colágeno intramolecular e intermolecular aumentan la fuerza de la herida a reventar. La remodelación inicia aproximadamente 21 días después de la lesión, cuando el contenido neto de colágeno de la herida es estable y este proceso puede continuar indefinidamente. (Coursin, Connery, & Ketzler, 2004, p.30)

La resistencia a la tracción de la herida es la fuerza requerida para romper una herida, formando el tejido cicatricial. Una herida cicatrizada es sólo el 80% tan fuerte como el tejido original. (Coursin, Connery, & Ketzler, 2004, p.30)

Las heridas crónicas se estancan entre las fases inflamatorias y proliferativas, pueden estar presentes desde semanas hasta años. Las heridas crónicas son a menudo en peligro debido a la insuficiente vascularización. Esto provoca isquemia tisular y la hipoxia, que conducen a la pérdida de integridad de la membrana vascular, resulta un edema tisular, puede causar más insuficiencia vascular. (Coursin, Connery, & Ketzler, 2004, p.30)

1.5.2 Efectos de la diabetes en la cicatrización de heridas

La neuropatía periférica predispone a trauma del tejido y un mayor riesgo de infección. Además, la disminución de la función inmune, es más lenta la síntesis de colágeno y la

acumulación, la disminución de la angiogénesis, y menos resistencia a la tracción de las heridas, esto conduce a un alto riesgo de abertura de la herida. (Coursin, Connery, & Ketzler, 2004, p.30).

El control adecuado de los niveles de glucosa en la sangre juega un papel crucial en la curación de la herida diabética. Aunque los parámetros definitivos no han sido definidos, los niveles de glucosa superiores a 200 mg / dL se asocian con peores resultados. (Coursin, Connery, & Ketzler, 2004, p.30).

1.5.3 Efectos del tabaco en la cicatrización de heridas.

El fumar tiene un efecto negativo en la cicatrización de heridas debido a un efecto tóxico directo y la vasoconstricción inducida por la nicotina. La tasa de infección de la herida en los fumadores es de 12%, comparado con el 2% en los no fumadores. La abstinencia de fumar durante 4 semanas antes de la herida permite una disminución dramática en la infección, pero ningún cambio en la abertura de la herida. Curiosamente, las usuarias del parche de nicotina no tenían efectos adversos. (Sorensen, Karlsmark, & Gottrup, 2003, p.3).

El fumar también disminuye la función de los neutrófilos, inhiben la síntesis de colágeno, y aumentar los niveles de carboxihemoglobina, debido a los efectos de monóxido de carbono y cianuro de hidrógeno. (Sorensen, Karlsmark, & Gottrup, 2003, p.4).

Otros factores que contribuyen a la mala cicatrización de heridas incluyen la deficiencia nutricional, la radioterapia previa, infección de la herida, y la hipoxia tisular. (Sorensen, Karlsmark, & Gottrup, 2003, p.4).

1.5.4 Fitocompuestos esenciales en la cicatrización acelerada de heridas

- *Taninos:* Promueve la cicatrización de heridas a través de varios mecanismos celulares, quelante de los radicales libres y especies reactivas del oxígeno, la promoción de la contracción de la herida y el aumento de la formación de vasos capilares y fibroblastos. (Ponrasu & Suguna, 2012, pp.100-105)
- *Triterpenoides y flavonoides:* Promueve la cicatrización por sus propiedades astringentes y antimicrobianas. Los flavonoides son potente antioxidante, mejoras el nivel de enzimas antioxidantes en el tejido del granuloma y el efecto de captación de radicales libres. (Ponrasu & Suguna, 2012, pp.100-105)

- *Saponinas*: Responsable de la cicatrización de la herida y eleva la tasa de reepitelización, actividad antioxidante y antimicrobiana. (Ponrasu & Suguna, 2012, pp.100-105)

1.6 Los flavonoides

Los flavonoides son uno de los grupos más importantes de los compuestos que se generan del metabolismo secundario de las plantas a través de la ruta del ácido shikímico y policétidos y se distribuyen ampliamente sobre todo en las partes aéreas: hojas, flores, frutos. (Biesaga, 2011, pp.2505-2512).

Los flavonoides de importancia en la dieta exhiben una amplia gama de efectos biológicos: acción antibacterial, antiinflamatoria, antialérgica y antitrombótica. Estos compuestos se comportan como antioxidantes que capturan directamente las especies reactivas de oxígeno, inhibe las enzimas responsables de la producción del anión superóxido, quelación de los metales de transición que participan en los procesos de formación de radicales y prevención de la peroxidación por reducción de los radicales alcoxil y peroxil. (Biesaga, 2011, pp.2505-2512).

1.6.1 Estructura química

Químicamente los flavonoides están contruidos sobre un esqueleto flavona $C_6-C_3-C_6$ en el cual la cadena de tres carbonos entre los grupos fenilos forman un puente ciclado con oxígeno (anillo pirano glucósidos o en el estado libre como agliconas con grupos hidroxilo o metoxilo presentes en la aglicona). Según la insaturación y el grado de oxidación del segmento C_3 , varias familias de flavonoides pueden ser distinguidas como: flavonoles, flavanonas, flavonas, antocianinas e isoflavonas. (Ambiga, Narayanan, Durga, Sukumar, & Madhavan, 2007, pp.45-51).

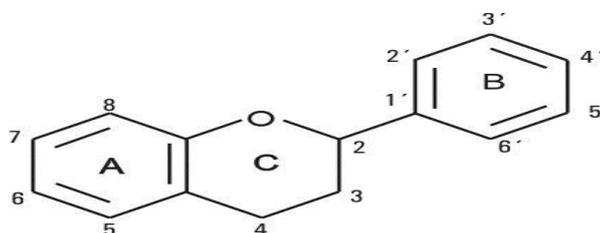


Figura 3-1: Estructura básica de los flavonoides con su respectiva numeración

Fuente: (Biesaga, 2011, pp.2505-2512)

La posición en el anillo benzeno B es la base para la categorización de la clase de flavonoides (posición 2) y la clase de isoflavonoides (posición 3). Adicionalmente una amplia variedad de

derivados que están presentes en cada familia de acuerdo a el número y naturaleza de los grupos sustituyentes unidos al grupo flavónico. (Biesaga, 2011,pp.2505-2512).

Los flavonoides que habitualmente están en las plantas son los flavonoides o-glicósidos, donde uno o más grupos hidroxilos del núcleo del flavonoide se encuentra unido a azúcares. La glicosilación de los flavonoides permite que estos sean menos reactivos y más solubles en agua. El azúcar presente en los flavonoides es la glucosa, pero también pueden estar galactosa, ramnosa y xilosa, y el disacárido rutinosa. (Cartaya & Reynaldo, 2001,pp.5-11)

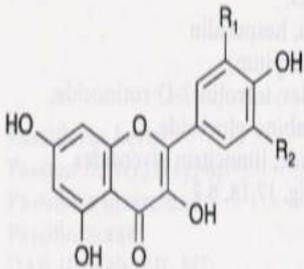
Flavonols	R ₁	R ₂	Aglycone
	OH	H	Quercetin
	H	H	Kaempferol
	OH	OH	Myricetin
	OCH ₃	H	Isorhamnetin

Figura 4-1: Ejemplos de flavonoides agliconas

Fuente: Wagner & Bladt, 2001, p. 204

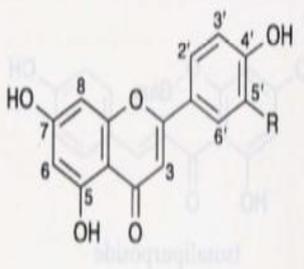
Flavones	Aglycone	Glycoside
	Apigenin	A-8-C-glucoside (vitexin)
	R = H	A-6-C-glucoside (isovitexin)
		A-7-O-aposyl-glucoside (apiin)
		A-6- α -L-arabinopyranoside-8-C-glucoside (schaftoside)
	Luteolin	L-5-O-glucoside (galuteolin)
	R = OH	L-8-C-glucoside (orientin)
	L-6-C-glucoside (iso-orientin)	

Figura 5-1: Ejemplos de flavonoides glicósidos

Fuente: Wagner & Bladt, 2001, p. 205

1.6.2 Propiedades terapéuticas de los flavonoides

1.6.2.1 Actividad antioxidante

Es por la combinación de las propiedades quelantes que posee de hierro y a la vez el secuestro de radicales libres. Además inhiben enzimas como las oxidasas, la lipoxigenasa, la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa y la mieloperoxidasa impidiendo que se de la

generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) *in vivo*, y los hidroperóxidos orgánicos. Estimulan otras enzimas con propiedades antioxidante y son la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD) (Pérez, 2003, pp.1-3).

1.6.2.2 *Actividad cicatrizante*

Algunos flavonoides frente a la vitamina C, aumenta la síntesis de fibronectina extracelular y colágeno, por la propagación de fibroblastos normales de la piel. Las antocianidinas benefician la angiogénesis en el lastimado y en la cicatrización acelerando la contracción de la herida con su subsiguiente cierre. Conjuntamente aumentando la expresión del factor de crecimiento endotelial del borde de la herida (Cartaya & Reynaldo, 2001, pp.5-11).

1.7 **Actividad cicatrizante in vitro.**

1.7.1 *Ácido Hialurónico*

El ácido hialurónico (HA) es un glicosaminoglicano de alto peso molecular, uno de los principales constituyentes de la matriz extracelular, tiene una estructura de disacárido repetida que está completamente conservado durante un gran lapso de evolución, lo que indica una importancia biológica fundamental (Chen & Abatangelo, 2002, pp.149-150).

Tiene propiedades higroscópicas, reológicas y viscoelásticas únicas, se une a muchas otras moléculas de la matriz extracelular, a las células del cuerpo a través de receptores de la superficie celular, y tiene un modo único de síntesis en la que la molécula se extruye inmediatamente en el espacio extracelular tras la formación. Se distribuye ampliamente en los tejidos conectivos y epiteliales (Chen & Abatangelo, 2002, pp.149-150).

El ácido hialurónico favorece a una matriz extracelular viable para la migración y diferenciación celular, siendo un elemento indispensable en la cicatrización de heridas, contribuye en:

- Hidratación y protección tisular.
- Difusión molecular.
- Movilidad celular.
- Control de la comunicación celular
- Proliferación celular y la migración (Stern, 2004, p.318).

Crece desde la base de una herida y promueve la migración de los fibroblastos y las células endoteliales en el sitio de la herida, es decir, facilita la movilidad celular, la proliferación celular y la regeneración (Chen & Abatangelo, 2002, p.150).

El ácido hialurónico es muy hidrófilo, mantiene la piel suave y lubricante debido a sus propiedades reológicas y viscoelásticas únicas. La dermis también contiene una hialuronidasa que despolimeriza el ácido hialurónico, la reducción de la viscoelasticidad de la dermis, lo que resulta en la pérdida de tensión, secado y formación de arrugas de la piel, dando lugar a envejecimiento de la piel. Existen fuertes asociaciones entre la degradación o alteración de ácido hialurónico y envejecimiento de la piel (Wanigasekera, Walimuni, & Chatura, 2014,p.960).

El deterioro de la actividad hialuronidasa es considerado como uno de los principales mecanismos de la piel contra el envejecimiento. Alrededor de 15 g de ácido hialurónico están presentes en un individuo de 70 kg. Desempeña un papel vital en el mantenimiento de la integridad estructural y funcional y ayuda a preservar la apariencia suave y juvenil de la piel humana (Wanigasekera, Walimuni, & Chatura, 2014, p.960).

1.7.1.1 El Ácido Hialurónico en la matriz extracelular

La matriz extracelular contiene grandes concentraciones de ácido hialurónico, un disacárido glicosaminoglicano de alto peso molecular, compuesto de D-ácido glucurónico (GlcUA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), las que forman largas cadenas lineales que a diferencia de otras moléculas similares, no contienen grupos sulfato. Esta molécula presenta una alta densidad de carga negativa lo cual le permite capturar cationes osmóticamente activos tales como el sodio y el potasio (Stern, 2004, p.319).

En el tejido conectivo el ácido hialurónico cumple la función de “cemento gelatinoso” garantizando la integridad estructural del tejido. Cuando este es hidrolizado por acción enzimática, se generan preferentemente, una gran cantidad de unidades tetraméricas consistentes en dos residuos de ácido L-glucurónico y dos residuos de N-acetilD-glucosamina (Stern, 2004, p.319).

1.7.2 Utilidad terapéutica del ácido hialurónico.

- En otorrinolaringología, lo han utilizado para modular la cicatrización después de cirugía de la mucosa nasal y en el tratamiento de la perforación de la membrana timpánica (Ramírez, Quiroz, Báez, & Martínez, 2006, p.42).

- En reumatología, dermatología y ortopedia (Ramírez, Quiroz, Báez, & Martínez, 2006, p.42).

1.8 Modelos in vitro

1.8.1 Enzima Hialuronidasa

Las hialuronidasas son enzimas hidrolíticas (hidrolasas) que están presentes en los fluidos de variedad de organismos tales como mamíferos, lagartos, abejas y serpientes siendo la más abundante y estudiada, la de origen testicular bovino; esta enzima cataliza la ruptura de los enlaces internos glicosídicos de ciertos mucopolisacáridos ácidos de tejidos conectivos animales tales como el ácido hialurónico y el condroitin sulfato. Enzima considerada como factor difusor debido porque facilita la penetración de componentes de mediano y alto peso molecular (Lerma, 2006, p.9)

En otras palabras las hialuronidasas son enzimas que degradan al ácido hialurónico (AH), posee una elevada actividad en procesos inflamatorios crónicos tales como artritis reumatoidea, donde la degradación de ácido hialurónico está implicada en la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, los agentes con actividad antihialuronidasa podrían contribuir cicatrización de la herida (Sgariglia, Soberón, Sampietro, Quiroga, & Vattuone, 2007, pp.274-275).

La hialuronidasa juega un papel crucial en las reacciones alérgicas (mediante la estimulación de la expresión de genes anti-inflamatorias, la granulación de los mastocitos y la liberación de mediadores químicos) y envenenamiento de serpiente, abeja de la miel, avispa, escorpión, peces piedra o lagarto toxinas (Wanigasekera, Walimuni, & Chatura, 2014, p.960).

Además, los inhibidores de hialuronidasa potentes poseen efectos antialérgicas fuertes y el uso de ellos se propone como agentes de primeros auxilios en la terapia de mordedura de serpiente para aumentar el tiempo de supervivencia de las víctimas. Dado que el ácido hialurónico forma la columna vertebral de la matriz del cartílago, su degradación por hialuronidasa es el enlace con la patogénesis de enfermedades de las articulaciones tales como, la artritis, la osteoartritis (Wanigasekera, Walimuni, & Chatura, 2014, pp. 959-963).

Se considera que esta alta concentración de ácido hialurónico se debe a la presencia de una glicoproteína llamada actividad estimuladora de ácido hialurónico (AEAH), dicho factor está presente en la herida fetal por periodos prolongados, lo cual resulta en una respuesta prolongada rica en ácido hialurónico de la herida fetal, mecanismo completamente ausente en la herida del adulto (DePalma, y otros, 1989,p.225).

1.8.1.1 Clasificación de las hialuronidasas según análisis bioquímico

1. Las hialuronato-4-glicanohidrolasas (EC. 3.2.1.35) actúa como una endo- β -N-acetil-hexosaminidasas que degradan tanto el ácido hialurónico como los condroitin sulfato A y C, la condroitina y el sulfato de dermatano, hasta fragmentos menores, en primer lugar un tetrasacárido con el resto de hexosamina en el extremo reductor libre; este es el caso de la **hialuronidasa testicular bovina**. (Lerma, 2006, p.10).
2. Las hialuronato-3-glicanohidrolasas (EC. 3.2.1.36) o endo- β -glucoronidasas, esta enzima es absolutamente específica para el ácido hialurónico capaces de generar tetrasacaridos con el ácido glucurónico en el extremo reductor libre; como ejemplo tenemos a las hialuronidasas de las glándulas salivales de las sanguijuelas. (Lerma, 2006, p.10).
3. Las hialuronato liasas (EC. 4.2.99.1) o endo- β - N-acetil hexosaminidasas cuya acción hidrolítica degrada al sustrato hasta generar disacáridos Δ -4,5-insaturados siendo el caso típico el de las hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.2.1), microbianas. (Lerma, 2006, p.10).

1.8.1.2 Hialuronidasas de las bacterias gram-positivas

Las bacterias gram-positivas no tienen endotoxinas, pero la presencia de esas bacterias en la piel o mucosas provoca una respuesta inflamatoria

Las hialuronidasas bacterianas son enzimas capaces de hidrolizar el ácido hialurónico (cemento intercelular). Esto facilita la diseminación de los microorganismos en el hospedero y se le llama también "factor de diseminación". Se originan por una serie de bacterias Gram-positivas patógenas que inician las infecciones en la piel o las superficies mucosas; el término hialuronidasa ha sido sinónimo de factores de propagación. (Wanigasekera, Walimuni, & Chatura, 2014, pp.959-963).

Esta enzima hidrolítica también provee a la bacteria de fuentes de carbono y energía fragmentando los polímeros del hospedero en azúcares y aminoácidos de bajo peso molecular. A pesar de que las enzimas hidrolíticas producidas por bacterias causan daño a los tejidos, dichas enzimas no son clasificadas como toxinas porque habitualmente no matan a las células del hospedero o no causan un daño metabólico identificable (Wanigasekera, Walimuni, & Chatura, 2014, pp.959-963).

1.8.1.3 Metabolitos secundarios inhibidores de la hialuronidasa.

Flavonoides tales como catequinas, quercetina, EGCG, galotaninos, taninos, apigenina, kaempferol, ácido ascórbico y algunos alcaloides de son inhibidores potentes de la hialuronidasa. Además, los polifenoles de alto peso molecular voluminosos son reclamados para actuar como inhibidores de hialuronidasa. (Wanigasekera, Walimuni, & Chatura, 2014, pp.959-963).

1.8.2 Hialuronato

El hialuronato es un polímero glicosaminoglicano no sulfatado lineal, con una masa molecular media superior a 10 000. El polímero se compone de N-acetil-glucosamina y residuos de ácido glucurónico unidos por enlaces glicosídicos alternados. Pero a diferencia de otros glicosaminoglicanos, carece de un péptido unido covalentemente (Chen & Abatangelo, 2002, pp.149-150).

Este polímero se encuentra en muchos tejidos del cuerpo y fluidos de los organismos superiores, tales como el cordón umbilical, líquido sinovial, cartílago, cerebro, músculo, y es un componente principal de la matriz extracelular, especialmente en el tejido conectivo blando (Chen & Abatangelo, 2002, pp.149-150).

Un 50% del hialuronato en el cuerpo se encuentra en la piel. También está presente en altas concentraciones en crestas de gallo y es producida por ciertas bacterias tales como los estreptococos. El hialuronato aislado de todas estas diversas fuentes posee una estructura química idéntica (Chen & Abatangelo, 2002, pp.149-150).

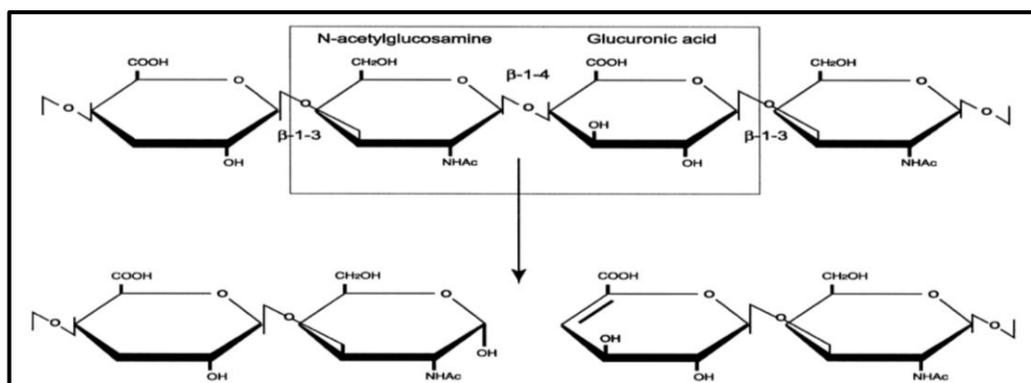


Figura 6-1: Estructura de hialuronato y los productos después de la escisión eliminativa realizada por un hialuronidasa bacteriana

Fuente: (Pérez, Solís, Ruiz, & Cerezo, 2008, pp.100-104)

1.8.3 Composición del veneno de cobra *Naja naja*.

El veneno de cobra *Naja naja* contienen polipéptidos que incluyen enzimas, toxinas y pequeños péptidos capaces de modificar la fisiología de los animales envenenados, es decir está formado por una compleja mezcla de proteínas. Estas proteínas contienen componentes tóxicos y no tóxicos. Entre todos los componentes tóxicos las neurotoxinas y las cardiotoxinas las más letales, pero además están las citotoxinas, toxinas hemorrágicas y miotoxinas, las cuales son componentes menos tóxicos. (Sierra & Pérez, 2001,pp.66-74)

Se han identificado más de 20 enzimas diferentes de las cuales, 12 se encuentran en la mayoría de los venenos pero la hialuronidasa (factor difusor) en todos los venenos; la función de esta enzima es facilitar la distribución del veneno (toxinas) por los distintos tejidos de las víctimas. La forma pura no ha sido aislada (Pérez, Solís, Ruiz, & Cerezo, 2008,pp.100-104).

Entre las muchas serpientes venenosas en estos países, la cobra (*Naja sp.*) es uno de los mordedores más comunes capaces de transportar gran cantidad de veneno letal - por lo que se clasifica como Categoría I una serpiente médicamente peligrosa según la OMS. (Yi, Hock, Yee, & Hong, 2015, pp.106-122)

El envenenamiento puede causar un rápido inicio de la parálisis neuromuscular en sus víctimas, y un tratamiento inadecuado puede conducir a insuficiencia respiratoria y la muerte. La necrosis tisular extensa provoca una incapacidad invalidante o paralizante, añadiendo a la cifra de los sufrimientos por la familia de las víctimas. (Yi, Hock, Yee, & Hong, 2015, pp.106-122)

CAPÍTULO II

2 MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de recolección del material vegetal

El geranio rey blanco (*Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey), se recolectó en Ecuador, provincia Tungurahua, cantón Ambato, parroquia Izamba, sector la Victoria, avenida Rodrigo Pachano y Batalla de Jambelí en el Vivero “El trébol”.

2.2 Lugar de identificación taxonómica del geranio rey blanco

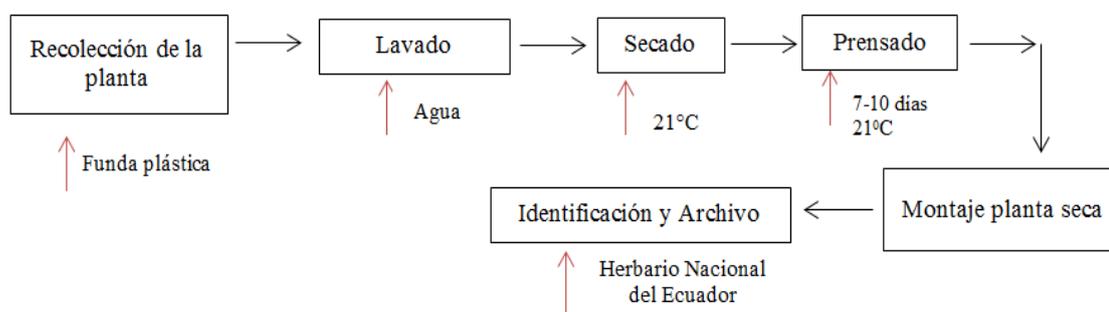


Figura 7-2: Diagrama de identificación taxonómica del geranio rey blanco realizado en el Herbario Nacional del Ecuador

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

2.3 Lugar de investigación

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Productos Naturales y en el laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, localizado en la provincia Chimborazo, cantón Riobamba.

2.4 Materiales, equipos y reactivos

2.4.1 Material vegetal

Las partes que se utilizó de la planta (*Pelargonium x domesticum*) son las flores y las hojas que se secaron a temperatura ambiente bajo sombra y se trituraron en el molino marca Arthur H. Thomas C.O para los diferentes análisis físicos químicos

2.4.2 Materiales

Tabla 2-2: Lista de materiales empleados en los diferentes ensayos

MATERIAL	CANTIDAD
CONTROL DE CALIDAD DE MATERIA PRIMA	
Cápsulas de porcelana	2
Pisceta	1
Reverbero	1
Pinzas para cápsulas	2
TAMIZAJE FITOQUÍMICO	
Refrigerante de bolas	2
Balones esmerilados de 250mL	2
Pinzas universales	4
Mangueras	3
Reverbero	2
Embudos simples	2
Trípodes	2
Vasos de precipitación de 250mL	2
Tubos de ensayo	10
Gradilla	1
Pipeta de 5mL	1
Pipeta de 1mL	1
CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)	
Cuba cromatográfica	1
Capilares	4
Aspersor	1
EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN (ESPECTRO UV)	
Frasco de vidrio ámbar de 250mL	5
Vaso de 30mL	2
Balones aforados de 10mL	5
Balones aforados de 50mL	2
Balones aforados de 100mL	2
Probeta de 50mL	1
Micropipeta automática de 1000uL	1
Micropipeta automática de 100uL	1
Tubos de vidrio de 10mL	10
Puntas azules de 1000uL	20
Puntas amarillas de 100uL	20
Paquete de papel aluminio	1
DETERMINACIÓN DE INHIBICIÓN DE LA HIALURONIDASA	
Micropipeta automática de 1000uL	1
Micropipeta automática de 100uL	1
Embudo de separación de 250mL	2

Embudo buchner	1
Kitasato de 250mL	1
Puntas azules de 1000uL	30
Puntas amarillas de 100uL	30
Gradilla	1
Frasco de vidrio ámbar de 100mL	2
Frasco de vidrio ámbar de 250mL	4
Frasco de vidrio ámbar de 50mL	4
Espátula pequeña	1
Reverbero	1
Termómetro	1

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

2.4.3 Equipos

Tabla 3-2: Lista de equipos empleados en las diferentes determinaciones

ANÁLISIS	EQUIPOS
Control de calidad materia prima y Tamizaje Fitoquímico	Molino
	Sonicador
	Estufa
	Mufla
	Desecador
	Balanza analítica
Cromatografía en capa fina (TLC)	Agitador magnético
	Cámara UV
Extracción y cuantificación de fenoles y flavonoides totales (espectro UV) y determinación de inhibición de hialuronidasa	Balanza analítica
	Refrigerador
	Espectrofotómetro
	Estufa
	Cronómetro
	pH-chímetro

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

2.4.4 Reactivos

Tabla 4-2: Lista de reactivos empleados en la investigación

ANÁLISIS	REACTIVOS
Tamizaje fitoquímico	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reactivo de Dragendorff ▪ Reactivo de Mayer

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reactivo de Wagner ▪ Reactivo de Baljet ▪ Reactivo de Lieberman Buchard ▪ Reactivo para Catequinas ▪ Reactivo para resinas ▪ Reactivo de Fehling ▪ Reactivo de FeCl₃ ▪ Reactivo de Borntrager ▪ Reactivo de Shinoda ▪ Reactivo de Antocianidinas ▪ Cloruro férrico ▪ Magnesio metálico ▪ Cloruro de sodio (polvo)
Cromatografía en capa fina (TLC)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Papel cromatográfico ▪ Acetato de etilo ▪ Ácido acético glacial ▪ Ácido fórmico ▪ Metil isobutil cetona ▪ Agua destilada ▪ Amoniac
Extracción y cuantificación de fenoles y flavonoides totales (espectro UV)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Soluciones de ácido gálico ▪ Metanol 98% ▪ Etanol 96% ▪ Agua destilada ▪ Nitrito de Sodio 5% ▪ Tricloruro de aluminio 10% ▪ Hidróxido de sodio 1M ▪ Soluciones de quercetina ▪ Carbonato de sodio saturado ▪ Reactivo de Folin-Ciocalteu 20%
Determinación de inhibición de hialuronidasa	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Agua bidestilada ▪ Buffer acetato 0.1M ▪ Solución de hialuronidasa bovina ▪ Di metil sulfóxido 5% ▪ Cloruro de calcio 12.5mM ▪ Hialuronato de sodio ▪ Hidróxido de sodio 0.4M ▪ Borato de sodio 0.2M ▪ p-dimetil amino benzaldehído ▪ Ácido clorhídrico 10N ▪ Ácido acético glacial
Determinación de inhibición de hialuronidasa del veneno de cobra <i>Naja naja</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Agua bidestilada ▪ Solución salina ▪ Solución de veneno de cobra <i>Naja naja</i>

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ácido hialurónico ▪ Buffer acetato ▪ Cloruro de sodio 0.15N ▪ Dimetilsulfóxido 5%
--	--

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

2.5 Técnicas y Métodos

2.5.1 Determinación de los parámetros de calidad de la droga vegetal

2.5.1.1 Determinación del contenido de humedad

El contenido de humedad se efectuó por un método gravimétrico, en el cual se pesaron 2g de la especie vegetal con desviación permitida de 0.5mg y se trasladan a una cápsula de porcelana previamente tarada y se colocó en la estufa a 105°C por 3 horas para desecar la muestra. La cápsula se colocó en el desecador donde se deja enfriar a temperatura ambiente y se pesa, seguidamente se coloca en la estufa durante 1 hora, y después de pesa, hasta obtener una masa constante. (Miranda, 2006, pp. 32-62).

Expresión de los resultados:

$$Hg = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

Hg = pérdida en peso por desecación (%).

M₂ = masa de la cápsula con la muestra de ensayos (g)

M₁ = masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g)

M = masa de la cápsula vacía.

100 = factor matemático.

2.5.1.2 Determinación de cenizas totales.

El ensayo para determinar cenizas totales se realizó por un método gravimétrico, se fija la masa de una fracción de muestras pulverizada y tamizada entre 2.0g a 3.0g con una desviación permitida de 0.5mg en un crisol de porcelana anteriormente tarado. En un reverbero primeramente se carboniza la muestra para eliminar el residuo orgánico, subsiguientemente se incinere en un horno mufla a una temperatura de 700 a 750°C, durante 2 horas hasta obtener

como resultado un polvo blanco. El crisol con las cenizas se colocó en el desecadora hasta que se enfríe después se pesa hasta obtener un valor constante donde dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0.5mg por gramo. (Miranda, 2006, pp. 32-62).

Expresión de los resultados:

$$C = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

C = porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M = masa del crisol vacío (g)

M₁ = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M₂ = masa del crisol con la ceniza (g)

100 = factor matemático para los cálculos.

2.5.1.3 Determinación de cenizas solubles en agua

La determinación de cenizas solubles en agua se realizó por un método gravimétrico. a las cenizas totales obtenidas en el ensayo anterior, se le añaden de 15 a 20 mL de agua. Al crisol se tapó y se calentó en un baño de agua hirviente durante 5min. La solución obtenida se filtró a través del papel de filtro libre de cenizas. El filtro con el residuo se colocó en el crisol inicial, se carbonizó en un reverbero y luego se incineró en un horno mufla de 700-750°C, durante 2h. Ulteriormente se colocó en el desecador hasta que se enfríe y se pesó. Se repite el procedimiento hasta alcanzar peso constante. (Miranda, 2006, pp. 32-62).

Expresión de los resultados:

$$Ca = \frac{M_2 - Ma}{M_1 - M} \times 100$$

Ca = porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada.

M₂ = masa del crisol con las cenizas totales (g).

Ma = masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

M₁ = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío.

100 = factor matemático.

2.5.1.4 *Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico*

La determinación de las cenizas insolubles en ácido clorhídrico se realizó por un método gravimétrico, a las cenizas totales obtenidas según la técnica, se le añadió 3mL de ácido clorhídrico al 10%. El crisol se tapó con un vidrio reloj y se calentó en un baño de agua hirviendo por 10min. Se lavó el vidrio reloj con 5mL de agua caliente y se une al contenido del crisol. La solución se filtró a través de un papel de filtro libre de cenizas; el residuo se lavó con agua caliente hasta que el filtrado acidulado con ácido nítrico p.a se le añadió una o dos gotas de solución de nitrato de plata 0.1mol/L, es decir, no muestre presencia de cloruros. El filtrado con el residuo se desecó a 105°C, y se transfirió al crisol inicial y se incineró en un horno mufla a una temperatura de 750°C durante 2 horas. Posteriormente se colocó en el desecador hasta que se enfríe y luego se pesó. Se repitió el procedimiento hasta obtener masa constante. (Miranda, 2006, pp. 32-62).

Expresión de los resultados:

$$B = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

B= porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada.

M₁= masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío (g)

M₂= masa del crisol con las cenizas ácido clorhídrico (g)

100= factor matemático.

2.5.2 *Tamizaje fitoquímico*

La planta fresca, seca o el residuo de una extracción; se sometió a una extracción según el esquema de la Figura 8-2, se obtuvo el extracto de las hojas y flores por separado y se midió el volumen obtenido y se calculó la concentración, esto es, gramos de sustancias extraídas por mL de extracto.

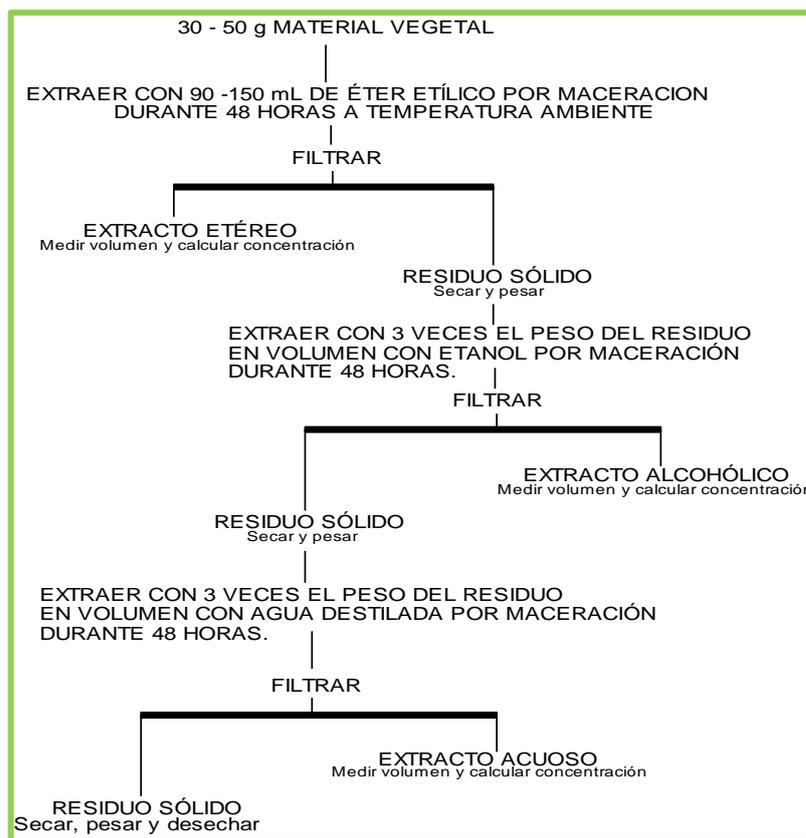


Figura 8-2: Obtención de metabolitos secundarios para realizar el tamizaje fitoquímico.

Fuente: (Miranda, 2006, pp. 32-62).

2.5.2.1 *Ensayo de Dragendorff*

Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, se evapora en baño de agua y el residuo se redissuelve en 1mL de ácido clorhídrico al 1% en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1gota de ácido clorhídrico concentrado. Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, se añade 3 gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++).

2.5.2.2 *Ensayo de Mayer*

Se procede de la forma descrita anteriormente, hasta que se obtiene la solución ácida. Se añade una pizca de cloruro de sodio en polvo, se agita y se filtra. Se añade 2 ó 3 gotas del reactivo de Mayer, si se observa opalescencia (+), turbidez definida (++) , precipitado coposo (+++).

2.5.2.3 *Ensayo de Wagner*

Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, se añade 2 ó 3 gotas del reactivo, se clasifica los resultados de la misma forma.

2.5.2.4 *Ensayo de Baljet*

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Coumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1 mL). En estas condiciones se adiciona 1mL del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++) y (+++) respectivamente.

2.5.2.5 *Ensayo de Borntrager*

Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++).

2.5.2.6 *Ensayo de Liebermann-Burchard*

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por ambos tipos de productos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayos se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado *sin agitar*. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:

- 1- Rosado-azul muy rápido.
- 2- Verde intenso-visible aunque rápido.
- 3- Verde oscuro-negro-final de la reacción.

2.5.2.7 *Ensayo de catequinas*

Para ello, tome de la solución alcohólica obtenida una gota, con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel de filtro. Sobre la mancha aplique solución de carbonato de sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica un ensayo positivo.

2.5.2.8 *Ensayo de resinas*

Para detectar este tipo de compuesto, adicione a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo.

2.5.2.9 *Ensayo de Fehling*

Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo.

2.6 Preparación del extracto de *Pelargonium x domesticum*

La obtención de los extractos tanto para hojas y flores de *Pelargonium x domesticum* se realizó de acuerdo al siguiente diagrama.

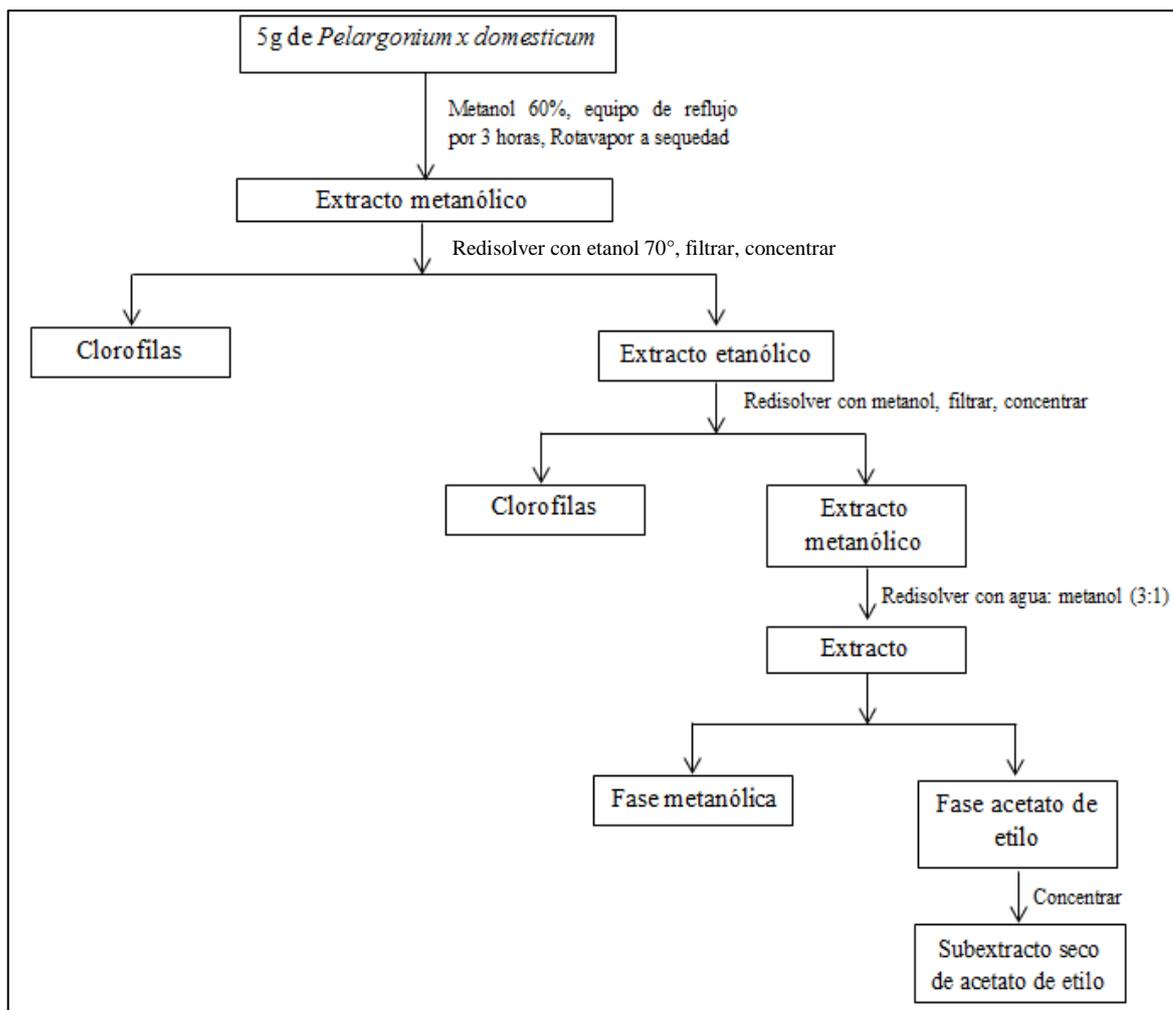


Figura 9-2: Diagrama de flujo para obtención de extractos de *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

2.7 Cromatografía en capa fina (TLC)

2.7.1 Cromatografía de la fracción flavónica a partir del extracto metanólico 60% de (*Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey)

- Al subextracto seco de acetato de etilo reconstituir con el mismo solvente
- Utilizar para realizar la cromatografía
- Aplicar con la ayuda de un capilar 20uL del concentrado en la placa cromatográfica de sílica gel
- Introducir la placa en la cuba cromatográfica, y permitir correr la fase móvil hasta las tres cuartas partes de la placa.
- Retirar la placa de la cuba, secar al ambiente y observar en la lámpara UV.
- Revelar, secar la placa y medir el Rf.

2.8 Cuantificación de fenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu

Se procede a cuantificar los fenoles totales presentes en el extracto metanólico 98%, para lo cual se prepara una curva de calibración con un estándar ácido gálico a determinadas concentraciones: 5; 10; 20; 40 y 60 mg/L.

- Tomar 2mL de muestra o estándar diluido
- Añadir 0.5mL de reactivo Folin-Ciocalteu 20%
- Después de 5 minutos añadir 0.5mL de solución de carbonato de sodio saturado (75g/L)
- Inmediatamente añadir 5mL de agua destilada
- Dejar reposar la mezcla por una hora bajo sombra a temperatura ambiente
- Efectuar las lecturas a una longitud de onda de 765nm
- Trazar la curva de calibración (concentración vs absorbancia). (Hua & Teik, 2012, pp.122-127)

Los resultados se expresan como miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramos de muestra seca.

2.9 Cuantificación de flavonoides totales mediante un método colorimétrico

Se procede a cuantificar los flavonoides totales presentes en el extracto metanólico 98%, para lo cual se prepara una curva de calibración con un estándar quercetina a determinadas concentraciones: 20; 40; 60; 80 y 100 mg/L.

- Tomar 1mL de la muestra o estándar diluido
- Añadir 4mL de agua destilada.
- A tiempo cero añadir 0.3mL de NaNO₂ al 5%.
- Después de 5 minutos añadir 0.3mL de AlCl₃ al 10%
- Esperar 6 minutos y añadir 2mL de NaOH 1M.
- Mezclar y dejar en reposo por 5 minutos a temperatura ambiente bajo sombra
- Leer la absorbancia de la mezcla caracterizada por un color rosado a 510 nm.
- Trazar la curva de calibración (concentración vs absorbancia) (Boukhris, Simmonds, Sayadi, & Bouaziz, 2012, pp.1-8)

Los flavonoides totales se expresan como miligramos equivalentes de quercetina (QE) por gramos de muestra seca.

2.10 Determinación de la actividad cicatrizante in vitro

2.10.1 Determinación de la inhibición de la hialuronidasa.

Para la evaluación de la actividad inhibitoria de la hialuronidasa de la fracción flavónica obtenido del *Pelargonium x domesticum* se realiza dos ensayos.

2.10.1.1 Inhibición de hialuronidasa bovina

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

- Tomar 50uL de hialuronidasa bovina, la cual se disuelve en buffer acetato 0.1M (pH 3.6)
- Mezclar la solución con 50uL de las fracciones flavónicas en diferentes concentraciones: 0.625; 1.5; 2.5; 5; 10; 20 mg/mL de hojas y flores de la materia vegetal disueltos en dimetilsulfóxido al 5%. Para el grupo control se toma 50uL de dimetilsulfóxido al 5%.
- La mezcla someter a incubación a 37°C por 20 minutos.
- Después añadir 50uL de CaCl₂ 12.5mM para activar la enzima e incubar a 37°C por 20 minutos.
- Seguidamente agregar a la mezcla 250uL de hialuronato de sodio (1.2mg/mL) e incubar a 37°C por 40 minutos.
- Posteriormente añadir 50uL de NaOH 0.4M y 100uL de borato de sodio 0.2M, someter a la mezcla a un baño de agua hirviendo por 3 minutos.
- Después de enfriar inmediatamente agregar 1.5mL de p-dimetilaminobenzaldehido (4g de p-dimetilaminobenzaldehido disolver en 50mL de HCl 10N con 350 mL de ácido acético glacial) e incubar a 37°C por 20 minutos hasta desarrollar color.
- Medir la absorbancia a 585nm en un espectrofotómetro, se expresa como el porcentaje de inhibición. (Suntar, Tumen, Ustun, Keles, & Akkol, 2012, pp. 533-540)

Cálculo del porcentaje de inhibición:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\text{Ac} - \text{As}}{\text{Ac}} \times 100$$

Ac = Absorbancia del control

As = Absorbancia de la muestra a diferentes concentraciones

Tabla 5-2: Protocolo de tratamientos del *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey en inhibición de la hialuronidasa bovina.

Inhibición de hialuronidasa bovina														
BLANCO	CONTROL MÁXIMA ACTIVIDAD	FLORES						HOJAS						REACTIVOS
		K1	K2	K3	K4	K5	K6	K1	K2	K3	K4	K5	K6	
50uL														Buffer acetato pH 3,6
	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	hialuronidasa bovina en buffer acetato pH 3.6
	50uL													DMSO 5%
50uL		50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	Concentraciones flavónicas+DMSO 5%
Incubación a 37°C por 20 minutos														
50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	CaCl ₂ 12.5mM
Incubación a 37°C por 20 minutos														
	250uL	250uL	250uL	250uL	250uL	250uL	250uL	250uL	250uL	250uL	250uL	250uL	250uL	Hialuronato de sodio
Incubación a 37°C por 40 minutos														
50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	NaOH 0.4M
100uL	100uL	100uL	100uL	100uL	100uL	100uL	100uL	100uL	100uL	100uL	100uL	100uL	100uL	Borato de sodio 0.2M
Baño de agua hirviendo por 3 minutos y enfriar														
1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL	p-dimetilaminobenzaldehido
Incubar a 37°C por 20 minutos														
Leer la absorbancia a 585 nm														

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

2.10.1.2 Inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra *Naja naja*

- Disolver en 20uL solución salina 100ug de veneno de cobra e incubar a 37°C con 50ug de ácido hialurónico en 250uL de buffer acetato 0.2M (pH 5.0) contenidos en cloruro de sodio 0.15N.
- Leer la absorbancia de dicha mezcla a 585nm
- Las fracciones flavónicas de las hojas y flores del material vegetal se disuelven como en el ensayo anterior.
- Expresar como el porcentaje de inhibición. (Suntar, Tumen, Ustun, Keles, & Akkol, 2012, pp. 533-540)

Cálculo del porcentaje de inhibición:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{Ac - As}{Ac} \times 100$$

Ac = Absorbancia del control

As = Absorbancia de la muestra a diferentes concentraciones

Tabla 6-2: Protocolo de tratamientos del *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey en inhibición de la hialuronidasa presente en el veneno de cobra *Naja naja*

Inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra <i>Naja Naja</i>														
BLANCO	CONTROL MÁXIMA ACTIVIDAD	FLORES K1	FLORES K2	FLORES K3	FLORES K4	FLORES K5	FLORES K6	HOJAS K1	HOJAS K2	HOJAS K3	HOJAS K4	HOJAS K5	HOJAS K6	REACTIVOS
250uL														Buffer acetato pH 5
	20uL	20uL	20uL	20uL	20uL	20uL	20uL	20uL	20uL	20uL	20uL	20uL	20uL	Veneno de cobra + solución salina
	250uL	250uL	250uL	250uL	250uL	250uL	250uL	250uL	250uL	250uL	250uL	250uL	250uL	Ácido hialurónico en buffer acetato 0.2M (pH 5) contenidos en NaCl 0,15N
50uL														DMSO 5%
		50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	50uL	Fracciones flavónicas en DMSO 5%
Incubar a 37°C														
Leer absorbancia a 585 nm														

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

CAPÍTULO III

3 MARCO DE RESULTADOS, ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Después de haber realizado los diferentes ensayos las hojas y flores de *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey se obtuvieron los siguientes resultados.

3.1 Control de calidad de la materia vegetal

CUADRO 1-3: Control de calidad de las hojas y flores de la planta seca *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey.

PARÁMETRO	<i>Pelargonium x domesticum</i> <i>L.H. Bailey</i>		Especificaciones USP # 28
	HOJAS	FLORES	
HUMEDAD	11,13±0,08	13,31±0,02	7-14%
CENIZAS TOTALES	8,47±0,19	6,54±0,13	Hasta 12%
CENIZAS SOLUBLES EN AGUA	3,25±0,08	2,51±0,25	Hasta 7%
CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO	1,38±0,12	0,21±0,07	Hasta 5%

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

En el cuadro N°1-3 se expresa los resultados que indican el % de humedad de la planta seca en hojas 11,13% y en flores 13,31%, los valores obtenidos se encuentra dentro de los rangos establecidos para materia vegetal según tesis realizadas anteriormente y según la USP # 28, lo cual indica que las condiciones de secado, conservación y almacenamiento son óptimas, el contenido de humedad nos ayuda a conocer sobre la estabilidad de la materia vegetal, si se tiene una pequeña cantidad de agua se evita el crecimiento bacteriano y micótico.

La determinación de cenizas totales es un indicativo del contenido de minerales en la muestra vegetal, considerada como una medida general de calidad porque la materia mineral puede estar inmiscuida en alguna acción farmacológica; si existe un porcentaje elevado de cenizas insolubles en ácido quiere que la materia prima no se recolectó adecuadamente y puede estar contaminada con arena, tierra silícea.

Como se observan en el mismo cuadro, el porcentaje de cenizas totales para hojas fue 8,47%; de cenizas solubles en agua un 3,25% y de cenizas insolubles en ácido clorhídrico fue de 1,38%. Mientras que para las flores un 6,54% para cenizas totales; 2,51% de cenizas solubles en agua; y 0,21% de cenizas insolubles en ácido clorhídrico, valores que están dentro de los establecidos por la USP # 28, lo que significa que la recolección de la materia prima fue adecuada.

3.2 Tamizaje Fitoquímico

Se efectuó el tamizaje fitoquímico según la técnica indicada en bibliografía (Miranda, 2006, pp. 32-62) para la determinación de los metabolitos secundarios principales en hojas y flores del *Pelargonium x domesticum*, los extractos analizados presentaron los siguientes resultados..

CUADRO 2-3: Tamizaje fitoquímico de los extractos de hojas y flores de *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey.

<i>Pelargonium x domesticum</i> L.H. Bailey			
Ensayo	Compuesto	Hojas	Flores
Dragendorff	Alcaloides	++	+
Mayer	Alcaloides	++	++
Wagner	Alcaloides	++	+
Baljet	Cumarinas	-	-
Borntrager	Quinonas	-	+++
Lieberman-Buchard	Terpenos	+	+
Fehling	Azúcares reductores	+	+
Resinas	Resinas	-	-
Espuma	Saponinas	+++	++
Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	+	+
Shinoda	Flavonoides	++	+++
Antocianidina	Antocianidinas	+	++
Catequinas	Catequinas	+	+

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

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

Los resultados observados del tamizaje de los extractos de hojas y flores de la materia vegetal, demuestran cualitativamente la presencia de los siguientes metabolitos: las hojas contienen

alcaloides, terpenos, azúcares reductores, saponinas, taninos pirocatecólicos, flavonoides, antocianidinas y catequinas; mientras que las flores presentan alcaloides, quinonas, terpenos, azúcares reductores, saponinas, taninos pirogalotánicos, flavonoides, antocianidinas y catequinas.

Se puede evidenciar la presencia de compuestos de naturaleza fenólica tanto en hojas como en flores, lo cual permite deducir que estos compuestos actúan principalmente en la cicatrización, como se ha citado que poseen propiedades astringentes, antioxidantes y antimicrobianas, antiinflamatoria, antialérgica y antitrombótica comprobada. Los flavonoides están en mayor cantidad, por esta razón se decidió trabajar con esta fracción para caracterizar los posibles compuestos presentes mediante cromatografía en capa fina.

3.3 Cromatografía en capa fina

3.3.1 Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica de hojas y flores

Se procedió a eluir la fracción flavónica previamente preparada en la fase móvil de cloroformo: metanol: agua, en proporciones (40:9:1), se puede observar que presentó buena resolución, presencia de manchas separadas los cuales son los compuestos de la fracción. Al no encontrar en bibliografía valores de Rf de los flavonoides aislados en esta fase móvil, se eluyó los estándares luteolina, quercetina y apigenina.

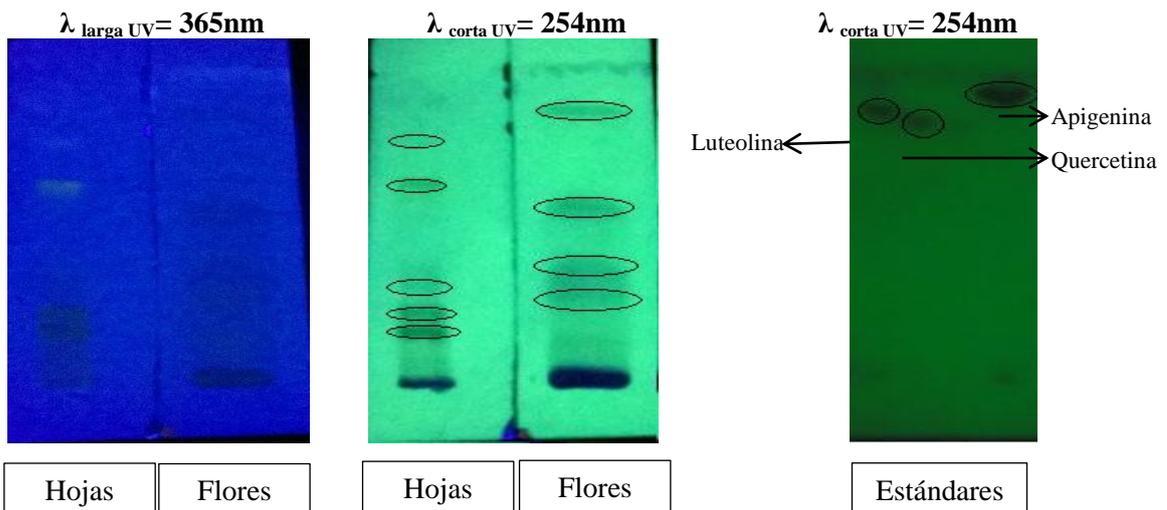


Figura 10-3: Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica de las hojas y flores de *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

CUADRO 3-3: Resultados de la determinación de Rf de la cromatografía en capa fina de la fracción flavónica de hojas y flores de *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey

MUESTRAS	OBSERVADAS	Rf	COMPUESTO IDENTIFICADO
Hojas	1	0,17	Miricetina
	2	0,22	-
	3	0,32	-
	4	0,64	Isoquercitrina
	5	0,76	Quercetina
Flores	1	0,29	Rutina
	2	0,35	Kaempferol- 7-neohesperidósido
	3	0,58	-
	4	0,82	Luteolina
Estándares	1	0,77	Quercetina
	2	0,82	Luteolina
	3	0,87	Apigenina

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

Adsorbentes: Sílica gel 60PF 254 (Sigma Aldrich)

Sistema de solventes: Cloroformo-metanol-agua (40-9-1)

Revelador: UV λ larga λ corta

La constante dieléctrica de la fase móvil utilizada es 11,44 y al calcular los Rf para los estándares y extractos, se puede indicar que la quercetina, miricetina e isoquercitrina están presentes en la fracción flavónica de las hojas, lo cual coincide con un estudio realizado con hojas de especies de *Pelargonium* donde resaltan la presencia de constituyentes flavónicos donde la quercetina y la miricetina esta universalmente presente, excepto en *P. dichondrifolium* y *P. sidoides*. (Williams, Newman, & Gibby, 2000, p.120)

En las flores se detectó la presencia de kaempferol- 7-neohesperidósido, rutina y luteolina, así podemos confirmar lo enunciado en un estudio realizado con los pétalos de las flores de *Pelargonium* donde indican que las antocianidinas están acompañadas por los flavonoides glicósidos del kaempferol y luteolina como compuestos mayoritarios. (Mitchell, Markham, & Boase, 1998, p. 356).

Según Wagner & Bladt, 2001, los Rf para la fase móvil de cloroformo: acetona: ácido acético (75:16,5:8,5) cuya constante dialéctrica es 11,99 la cual es muy cercana a la polaridad de la fase móvil que se utilizo, señala que posiblemente pueden corresponder a la presencia de miricetina

(flavonoide aglicona) e isoquercitrina para hojas; rutina y kaempferol- 7-neohesperidósido para flores, los tres últimos compuestos identificados pertenecen a los flavonoides glicosilados.

3.4 Cuantificación de fenoles y flavonoides totales

3.4.1 Cuantificación de fenoles totales

Se cuantificó los fenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu, primero se elaboró la curva de calibración del estándar ácido gálico y se obtuvo la ecuación de la recta cuyo coeficiente de correlación $R^2 = 0,9919$.

CUADRO 4-3: Curva de calibración de ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu.

CURVA DE CALIBRACIÓN ÁCIDO GÁLICO	
Concentración (ppm)	Absorbancia
5	0,139
10	0,145
20	0,157
40	0,176
60	0,191

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

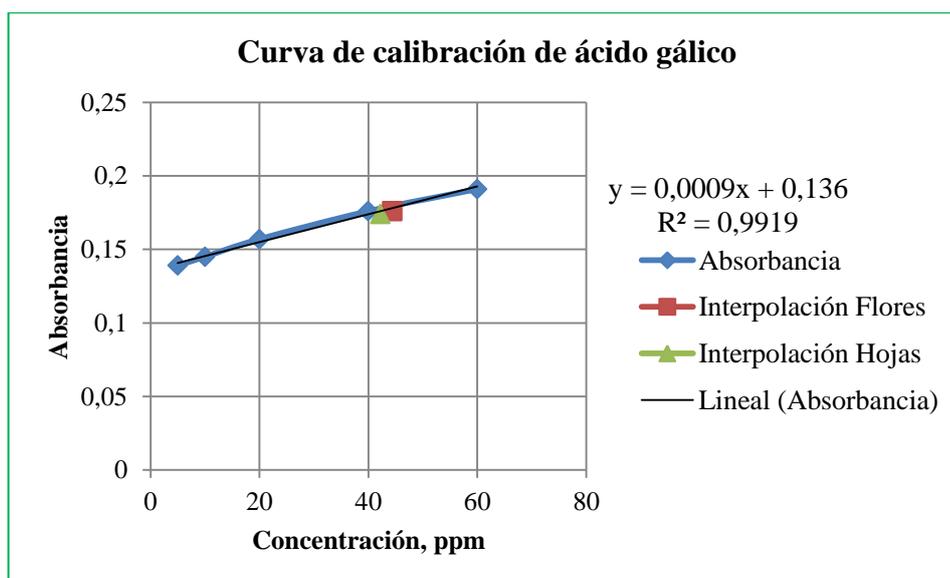


Figura 11-3: Curva de calibración del estándar de ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu.

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

Al tomar la lectura de las absorbancias de los dos extractos hojas y flores de *Pelargonium x domesticum* encontramos que las diluciones de mayor concentración presentan mayor coloración y por ende mayor absorbancia y estas son: extracto de hojas metanólico 60% con una A= 0,174 y extracto de flores metanólico 60% con una A= 0,176.

Podemos observar en la gráfica de la curva de calibración la interpolación de los datos de las dos muestras leídas en espectrofotómetro, de la cual se obtuvo la concentración de 8,89mg de ácido gálico/g de flores secas y la concentración de 12,67mg de ácido gálico/g de hojas secas. Los valores obtenidos demuestran la presencia de compuestos fenólicos expresados como miligramos de ácido gálico por gramos de muestra seca de hojas y flores del *Pelargonium x domesticum*, en una cantidad significativa.

3.4.2 Cuantificación de flavonoides totales

Se cuantificaron los flavonoides totales mediante un método colorimétrico, primero se elaboró la curva de calibración del estándar quercetina y se obtuvo la ecuación de la recta cuyo coeficiente de correlación $R^2 = 0,9916$

CUADRO 5-3: Curva de calibración de quercetina por el método de tricloruro de aluminio

CURVA DE CALIBRACIÓN DE QUERCETINA	
Concentración (ppm)	Absorbancia
20	0,019
40	0,041
60	0,061
80	0,075
100	0,091

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

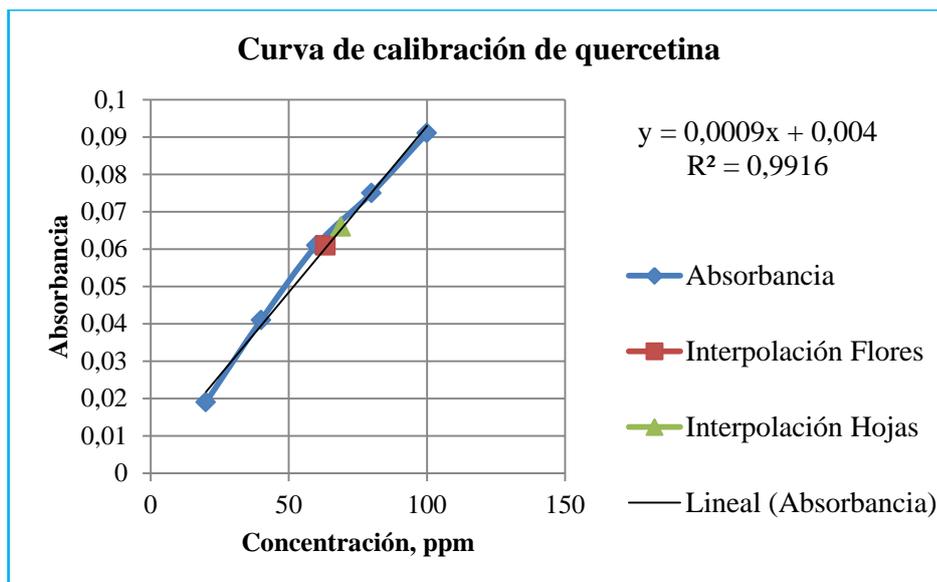


Figura 12-3: Curva de calibración del estándar de quercetina
 Realizado por: Ana Sánchez, 2015

De igual forma al tomar la lectura de las absorbancias de los dos extractos hojas y flores de *Pelargonium x domesticum* encontramos que las diluciones de mayor concentración presentan mayor coloración y por ende mayor absorbancia y estas son: extracto de hojas metanólico 60% con una A= 0,066 y extracto de flores metanólico 60% con una A= 0,061.

Podemos observar en la gráfica de la curva de calibración la interpolación de los datos de las dos muestras leídas en espectrofotómetro, de la cual se obtuvo la concentración de 3,17mg de quercetina/g de flores secas y la concentración de 3,44mg de quercetina/g de hojas secas. Los valores obtenidos demuestran la presencia de flavonoides totales expresados como miligramos de quercetina por gramos de muestra seca de hojas y flores del *Pelargonium x domesticum*, en una cantidad significativa.

3.5 Actividad cicatrizante in vitro mediante inhibición de la hialuronidasa

Para comprobar la actividad cicatrizante in vitro de la fracción flavónica tanto de hojas como flores se utilizó el ácido hialurónico y la hialuronidasa tanto bovina como del veneno de cobra para el desarrollo de los ensayos.

El ácido hialurónico es un componente principal de la matriz extracelular, está distribuido a lo largo del tejido conectivo y epitelial, juega un papel esencial en la actividad cicatrizante, este contribuye significativamente en la proliferación y migración celular, crece desde la base de la herida y promueve la migración de fibroblastos y células endoteliales dentro del sitio de la herida. (Subalakshmi, y otros, 2014, pp.127-131).

3.5.1 Inhibición de la hialuronidasa bovina

CUADRO 6-3: Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa bovina por efecto de las fracciones flavónicas de las hojas y flores del *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey

MATERIAL VEGETAL	FRACCIÓN FLAVONICA	CONCENTRACIÓN mg/ml	% INHIBICIÓN
<i>Pelargonium x domesticum</i>	Hojas	0,625	90,89
		1,500	66,20
		2,500	39,36
		5,000	16,47
		10,000	10,35
		20,000	2,77
	Flores	0,625	92,49
		1,500	66,55
		2,500	42,71
		5,000	22,23
		10,000	13,63
		20,000	4,81

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

En el cuadro N° 3-3 se puede observar que en los diferentes tratamientos empleados con la fracción flavónica de hojas y flores del *Pelargonium x domesticum* se evidenció una actividad inhibitoria sumamente interesante, en hojas se obtuvo un 90,89% de inhibición de la hialuronidasa bovina en la dosis de 0,625mg/mL y para flores un 92,49% de inhibición a la misma dosis, esto quiere decir que a menor dosis mayor efecto inhibitorio.

Con estos resultados se puede demostrar la especificidad de la fracción flavónica, es decir cuanto mayor es la potencia de los compuestos flavónicos se requiere una menor dosis porque actúa exclusivamente en la hialuronidasa y menor son las probabilidades de que tengan gran importancia otros lugares de acción.

Al comparar los resultados con los de Monge (2015, pp. 24-26) se puede ver que la fracción flavónica solo de las hojas de *Plectranthus amboinicus* presentan una inhibición de hialuronidasa bovina del 82,5% en la dosis de 20 mg/mL lo que aquí se demostro que a mayor dosis mejor efecto inhibitorio, debido al sinergismo que existe entre los compuestos flavónicos de esta planta.

Al comparar los resultados de Sahasrabudhe & Deodhar (2010, pp. 299-303) que realizaron la inhibición de la hialuronidasa bovina con fracción de acetato de etilo de hojas de *Garcinia indica* partiendo de un extracto metanólico, indican que ha muy bajas concentraciones de la fracción inhiben significativamente a la hialuronidasa a 0,025 mg/mL inhiben un 88,03%. Se puede decir que a dosis bajas mejor efecto inhibitorio, de igual manera ocurre con el *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey.

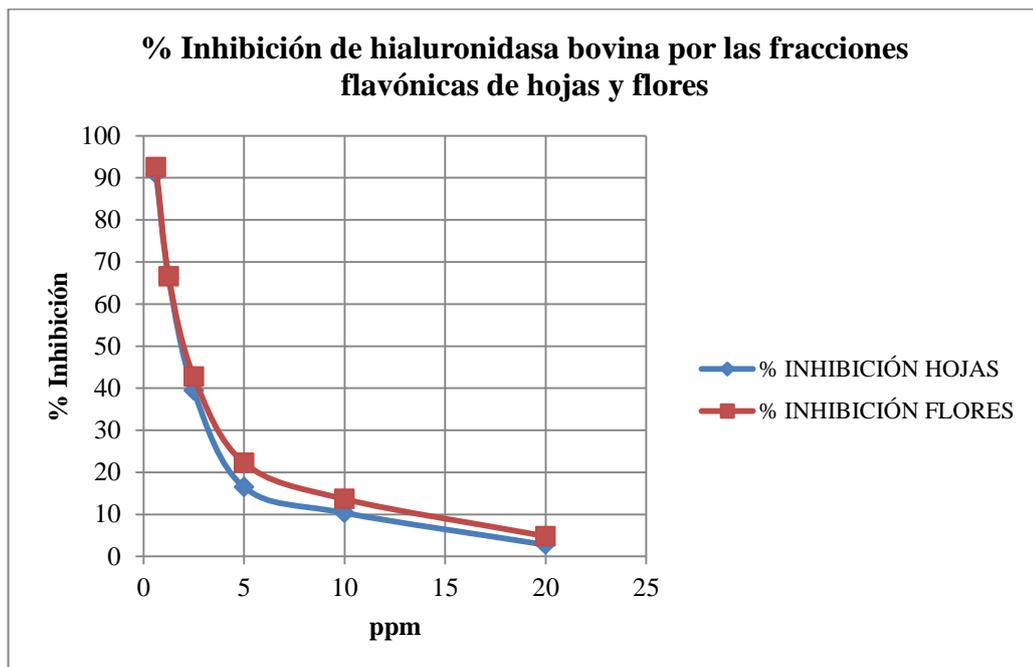


Figura 13-3: Curva del % de inhibición de la hialuronidasa bovina por efecto de las fracciones flavónicas de hojas y flores del *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey

Fuente: Ana Sánchez, 2015

En la Figura 13-3, se puede observar que la fracción flavónica de la flores del *Pelargonium x domesticum* presenta un mayor porcentaje de inhibición de la hialuronidasa bovina a una menor concentración o dosis la cual es 0,625mg/mL, ocurre de igual manera con la fracción de las hojas; es decir, a una menor concentración se logra un mayor porcentaje de inhibición para esta enzima.

Se puede decir que a concentraciones mayores de fracción flavónica sea de hojas o flores tienden a formar complejos lo que dificulta la inhibición enzimática pero mientras la dosis sea menor los compuestos están más libres y pueden actuar de mejor manera inhibiendo mayor porcentaje de hialuronidasa bovina.

3.5.2 Inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra *Naja naja*.

CUADRO 7-3: Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra *Naja naja* por efecto de la fracción flavónica de hojas y flores del *Pelargonium x domesticum L.H. Bailey*.

FRACCIÓN FLAVONICA	CONCENTRACIÓN mg/ml	% INHIBICIÓN
Hojas	0,625	28,17
	1,500	17,23
	2,500	13,43
	5	10,57
	10	8,13
	20	2,67
Flores	0,000000009	60,67
	0,000005	37,89
	0,625	30,70
	1,5	19,19
	2,5	15,59
	5	12,47
	10	10,07
	20	4,80

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

Según el cuadro 7-3, la fracción flavónica de las flores presenta mejores resultados en cuanto a los tratamientos de las hojas. La fracción flavónica de las flores de *Pelargonium x domesticum L.H. Bailey* a la dosis de 0,000000009mg/mL permite el 60,67% de inhibición de hialuronidasa encontrada en dicho veneno, las demás dosis realizadas en esta investigación son aceptables, es decir, que a dosis bajas se inhibe significativamente la hialuronidasa del veneno de cobra. Para las hojas, a una concentración de 0,625mg/mL admite un 28,17% de inhibición, es decir, si se diluye aún más la concentración se puede llegar a un significativo efecto inhibitorio.

La mezcla del veneno de cobra con el ácido hialurónico produce una turbidez, precipitación o floculación del medio; indicativo de la máxima actividad de la hialuronidasa en degradar al ácido hialurónico, una vez que las fracciones flavónicas actúan sobre dicha mezcla no permiten el progreso de la reacción, es decir, la presencia del precipitado disminuye y va aumentando la actividad inhibitoria de la fracción flavónica.

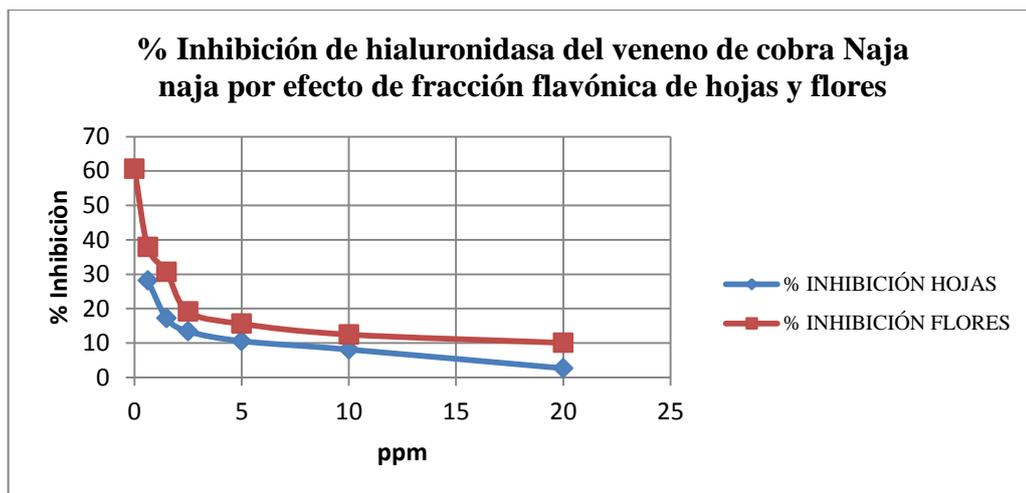


Figura 14-3: Curva del % de inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra *Naja naja* por efecto de fracción flavónica de flores del *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

En la Figura 14-3 se observa que la fracción flavónica de la flores del *Pelargonium x domesticum* L.H Bailey a 0,000000009mg/mL presenta un 60,67% inhibición de la hialuronidasa del veneno, mientras que a una dosis alta de 20mg/mL presenta solo el 4,80% de inhibición. En las hojas se presenta un 28,17% de inhibición de la hialuronidasa a 0,625mg/mL y un 2,67% de inhibición a una concentración mayor de 20mg/mL, si se seguiría diluyendo la concentración se obtendría mayor porcentaje de inhibición. Tanto para flores y hojas existe una mayor inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra *Naja naja* a pequeñas concentraciones.

CUADRO 8-3: Efecto de la fracción flavónica de hojas del *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey en la inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra *Naja naja*.

Tiempo seg	Actividad Máxima	0,625 mg/ml	1,5 mg/ml	2,5 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml
0	0,040	0,023	0,027	0,030	0,034	0,038	0,041
30	0,060	0,032	0,035	0,045	0,050	0,056	0,058
60	0,077	0,044	0,048	0,059	0,065	0,077	0,077
90	0,096	0,062	0,073	0,077	0,083	0,091	0,095
120	0,112	0,078	0,092	0,097	0,099	0,105	0,111
150	0,127	0,099	0,105	0,109	0,112	0,117	0,124
180	0,139	0,099	0,115	0,120	0,124	0,128	0,135
210	0,139	0,097	0,115	0,121	0,124	0,128	0,136
240	0,139	0,087	0,115	0,121	0,124	0,127	0,136
270	0,139	0,075	0,093	0,111	0,114	0,117	0,127
300	0,139	0,057	0,076	0,090	0,090	0,098	0,119

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

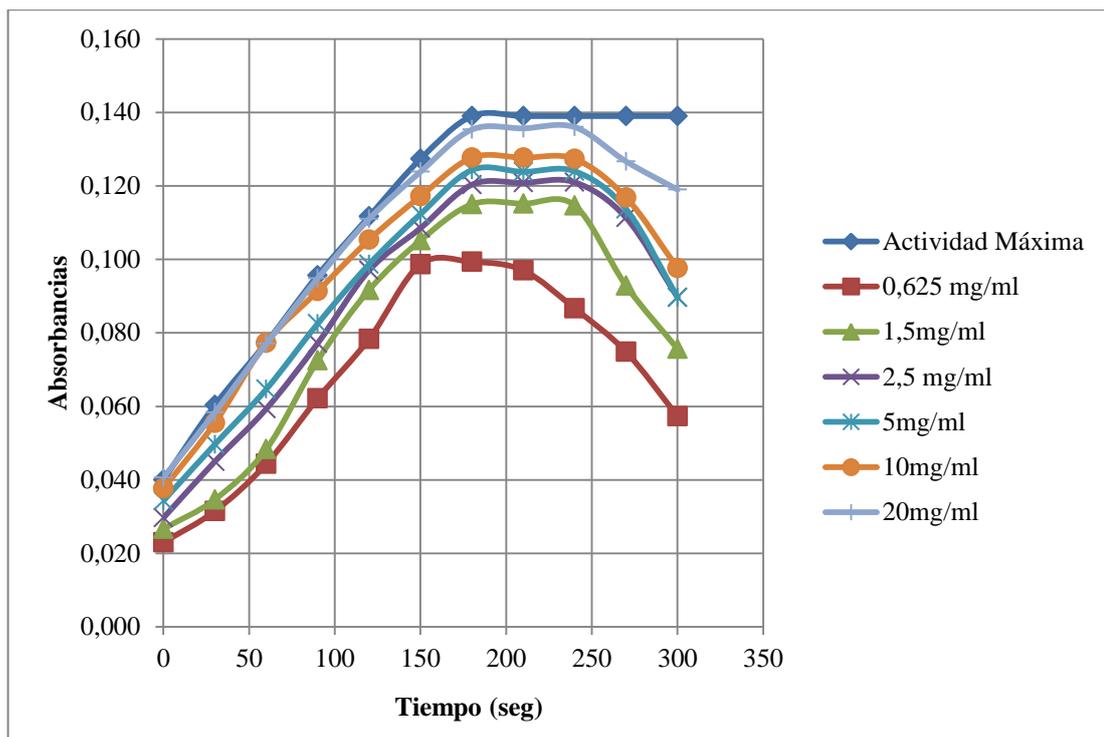


Figura 15-3: Curva del efecto de la fracción flavónica de hojas del *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey en inhibición de hialuronidasa del veneno de cobra
 Realizado por: Ana Sánchez, 2015

En la Figura 15-3, se puede observar la curva de máxima actividad de la hialuronidasa presente en el veneno de cobra, la cual interviene en la degradación del ácido hialurónico liberando N-acetilglucosamina y ácido glucurónico.

Cuando esta enzima interacciona con la fracción flavónica de las hojas se ve inhibida de manera competitiva, se puede decir que se mantendría el balance entre el ácido hialurónico generado y el que se degrada. A una concentración de 0,625mg/mL de compuestos flavónicos de las hojas se liberaría menor cantidad de N-acetilglucosamina a los 150 segundos de la reacción por que la absorbancia se mantiene y luego empieza la curva a decrecer, se demuestra que a menor concentración de fracción flavónica, menor cantidad de N-acetilglucosamina y por ende mayor porcentaje de inhibición de la enzima hialuronidasa.

Al comparar los resultados de Monge (2015, pp. 24-26) obtenidos en el ensayo de inhibición de hialuronidasa de veneno de cobra *Naja naja* por efecto de la fracción flavónica de las hojas de *Plectranthus amboinicus* presenta una excelente inhibición de la hialuronidasa a una dosis de 20 mg/mL a los 180 segundos de la reacción, siendo a mayor dosis mejor efecto inhibitorio.

CUADRO 9-3: Efecto de la fracción flavónica de flores del *Pelargonium x domesticum* L.H.

Bailey en la inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra *Naja naja*.

Tiempo seg	Máxima actividad	0,000000009 mg/ml	0,000005 mg/ml	0,003 mg/ml	0,625 mg/ml	1,5 mg/ml	2,5 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml
0	0,039	0,006	0,013	0,019	0,022	0,025	0,029	0,032	0,036	0,038
30	0,060	0,012	0,021	0,032	0,030	0,034	0,046	0,048	0,052	0,056
60	0,077	0,028	0,037	0,041	0,043	0,048	0,058	0,062	0,074	0,077
90	0,095	0,051	0,059	0,062	0,068	0,071	0,075	0,080	0,088	0,092
120	0,111	0,065	0,071	0,076	0,081	0,088	0,096	0,096	0,101	0,106
150	0,124	0,071	0,086	0,092	0,096	0,100	0,106	0,110	0,114	0,120
180	0,139	0,071	0,086	0,092	0,096	0,112	0,117	0,122	0,125	0,132
210	0,139	0,071	0,086	0,092	0,096	0,112	0,118	0,122	0,125	0,132
240	0,139	0,053	0,060	0,073	0,084	0,112	0,118	0,120	0,125	0,129
270	0,139	0,029	0,035	0,052	0,067	0,095	0,101	0,097	0,102	0,109
300	0,139	0,005	0,015	0,036	0,054	0,078	0,091	0,086	0,088	0,097

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

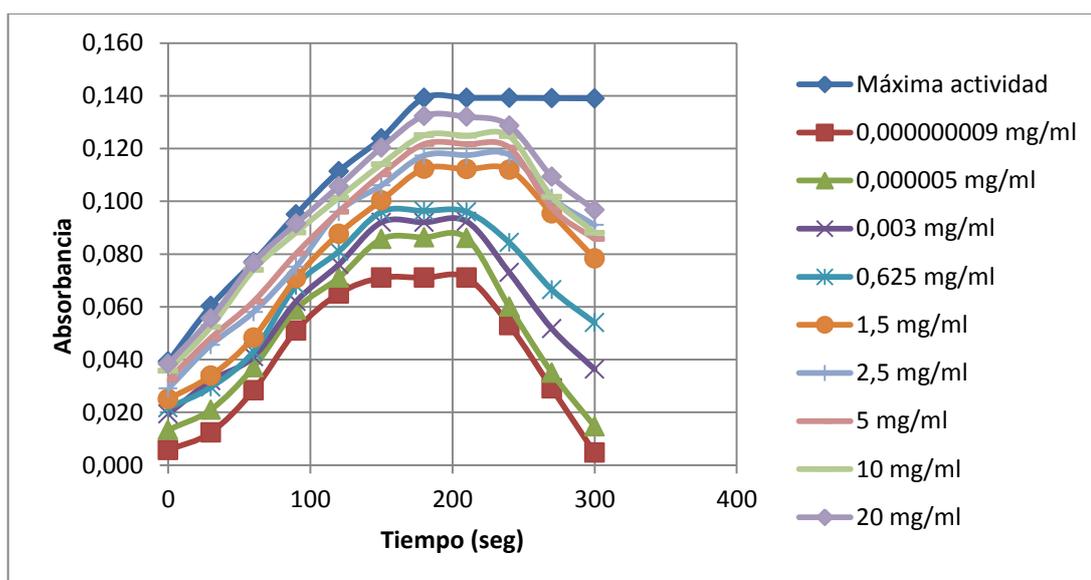


Figura 16-3: Curva del efecto de la fracción flavónica de flores del *Pelargonium x domesticum* L.H. *Bailey* en inhibición de hialuronidasa del veneno de cobra

Realizado por: Ana Sánchez, 2015

En la Figura 16-3, de igual manera se observa la curva de máxima actividad de la hialuronidasa presente en el veneno de cobra la cual interviene en la degradación del ácido hialurónico liberando N-acetilglucosamina y ácido glucurónico.

Cuando la hialuronidasa interacciona con 0,000000009 mg/ml de fitocompuestos flavónicos de flores se liberaría en menor cantidad de N-acetilglucosamina y a los 150 segundos de la reacción se mantiene la absorbancia y después empieza a decrecer la curva. Se demuestra que a

menor concentración de fracción flavónica, menor cantidad de N-acetilglucosamina liberada y por ende mayor porcentaje de inhibición de la enzima hialuronidasa.

3.5.3 Análisis estadístico

Con los datos obtenidos del porcentaje de inhibición de la hialuronidasa bovina por efecto de los tratamientos de la fracción flavónica de las hojas y flores, se analizó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk. Para los tratamientos de las hojas se obtuvo un p evaluate=0,659 y para las flores un p evaluate =0,227 al comparar con el nivel de significancia (0,05) podemos observar que los p evaluate son mayores al nivel de significancia, afirmando la normalidad de los datos.

De igual manera con los datos obtenidos del porcentaje de inhibición de la hialuronidasa presente en el veneno de cobra por efecto de los tratamientos de fracción flavónica de las hojas y flores, se analizó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk. Para los tratamientos de las hojas se obtuvo un p evaluate=0,239 y para las flores un p evaluate =0,167 al comparar con el nivel de significancia (0,05) podemos observar que los p evaluate son mayores al nivel de significancia, afirmando la normalidad de los datos.

Con los mismo datos se realizó un análisis de varianza y un post-test de TUKEY, para comprobar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos como $p < 0.05$ se consideró que existe una diferencia muy significativa tanto para hojas y flores.

CONCLUSIONES

1. Se realizó el control de calidad del *Pelargonium x domesticum L.H. Bailey* tanto de las hojas como de las flores secas que posteriormente se emplearon en las diferentes ensayos, tanto la humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua, cenizas insolubles en ácido clorhídrico, estos parámetros de calidad están dentro de los valores establecidos por la USP # 28, indicando que existió adecuada recolección de la materia prima sin ningún tipo de contaminación; a la vez las condiciones de secado, conservación y almacenamiento fueron correctas.
2. Se realizó la caracterización fitoquímica de los extractos de las hojas y flores del *Pelargonium x domesticum L.H. Bailey*, en ambos extractos resaltó la presencia de fitoconstituyentes fenólicos sobre todo flavonoides y taninos en su mayoría, sin descarta la presencia de compuestos como alcaloides, terpenos, azúcares reductores, saponinas.
3. Se obtuvieron los extractos metanólicos al 60% de las dos partes aéreas hojas y flores del *Pelargonium x domesticum L.H. Bailey* utilizando el método de reflujo, se sometieron a la separación de los compuestos fenólicos obteniendo así la fracción flavónica de coloración verde oscuro y amarillo verdoso respectivamente.
4. Se identificó cualitativamente los compuestos presentes en la fracción flavónica mediante cromatografía en capa fina utilizando una fase móvil cloroformo-metanol-agua (40:9:1), se confirmó la presencia de quercetina, isoquercitrina y miricetina en hojas mientras que en flores se encontró rutina, luteolina y kaempferol- 7-neohesperidósido.
5. Se determinó la actividad inhibitoria de la fracción flavonica del *Pelargonium x domesticum L.H. Bailey* en la hialuronidasa bovina, tanto en hojas y flores la dosis de 0,625mg/mL dio un mayor porcentaje de inhibición teniendo mejores resultados en flores, en este caso a menor dosis mayor efecto inhibitorio.
6. Se comprobó el efecto inhibitorio de la fracción flavonica del *Pelargonium x domesticum L.H. Bailey* en la enzima hialuronidasa encontrada en el veneno de cobra, donde las dos partes aéreas de la materia vegetal se le atribuye más del 50% de inhibición a dosis más diluidas 0,000000009 mg/mL, cabe destacar que el mejor tratamiento se obtiene de las flores.

7. Por medio de esta investigación se puede concluir que los extractos de las hojas y flores del *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey poseen actividad inhibitoria sobre la hialuronidasa a pequeñas concentraciones, lo cual ofrece un mejor efecto cicatrizante en pacientes con heridas complicadas o que sufren de pie diabético.

RECOMENDACIONES

- Cuando se realiza un ensayo enzimático es recomendable trabajar sobre una área totalmente limpia para evitar algún tipo de contaminación, a la vez se debe respetar los tiempos establecidos de medición porque estos métodos son muy sensibles.
- Se recomienda continuar con el estudio de la evaluación de la actividad cicatrizante realizando una formulación farmacéutica en modelos de experimentación in vivo.
- Es aconsejable realizar un estudio más exhaustivos sobre los constituyentes flavónicos presentes en las hojas y flores del *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey, para de este modo determinar que compuesto es causante de la actividad biológica.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, Misael. *Vademécum de las plantas medicinales del Ecuador*. 2° ed. Quito-Ecuador: EC. Abya-Ayala, 1992, pp.136-95-77

ALONSO, Mercedes. *Bioteconología aplicada a la mejora de Pelargonium* (Tesis) (Doctoral). Universidad Complutense de Madrid , Departamento de Genética. Madrid, España. 2002. pp 5-9

AMBIGA, S., NARAYANAN, R., DURGA, G., SUKUMAR, D., & MADHAVAN, S.. "Evaluation of wound healing activity of flavonoids from Ipomoea carnea Jacq". *Ancient Science of Life*, vol. 26, n° 3 (2007), (India) pp. 45-51.

BIESAGA, M. "Influence of extraction methods on stability of flavonoids". *Journal of Chromatography*, vol. 1, n° 2(2011), (Europa) pp. 2505-2512.

BOUKHRIS, M., SIMMONDS, M., SAYADI, S., & BOUAZIZ, M. "Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented geranium, *Pelargonium graveolens*". *Phytotherapy research*, vol 1, n° 1 (2012), pp. 1-8.

BUITRÓN, X.. "ECUADOR: uso y comercio de plantas medicinales". *TRAFFIC International*, vol.1, n°1 (1999), (Ecuador) pp. 1-5.

CALNE, S. "Identificación de los criterios de infección en heridas". *European Wound Management Association*, vol 4, n° 1 (2005), (Londres) pp. 2-3.

CARTAYA, O., & REYNALDO, I. "Flavonoides: Características químicas y aplicaciones". *Cultivos Tropicales*, vol. 22, n°2 (2001), (Cuba) pp. 5-11.

CENTER FOR INVASIVE SPECIES AND ECOSYSTEM HEALTH. *Invasive.Org* [blog] 2010 [Consultado 05 de Agosto 2015]. Disponible en: <http://www.invasive.org/browse/subinfo.cfm?sub=55925>

CHEN, J., & ABATANGELO, G. "Functions of hyaluronan in wound repair. Wound Repair and Regeneration". *Biomedical [en línea]*, 2002, vol. 12, n° 20 pp.147–156. [Consulta: 10 de Marzo 2015]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0124-81462010000100008&script=sci_arttext

COURSIN, D., CONNERY, L., & KETZLER, J. "Perioperative diabetic and hyperglycemic management issues". *Medline*, vol. 32, n° 4 (2004), pp. 25-116.

DEPALMA, R., KRUMMEL, T., DURHAM, L., MICHNA, B., THOMAS, B., NELSON, J., & DIEGELMANN, R. "Characterization and quantitation of wound matrix in the fetal rabbit". *Pubmed*, vol. 9, n° 3 (1989), pp. 224-231.

FARZAEI, M., ABBASABADI, Z., & SHAMS, M. "A Comprehensive Review of Plants and Their Active Constituents With Wound Healing Activity in Traditional Iranian Medicine". *Woundsresearch*, vol. 26, n° 7 (2014), pp. 26-30.

HERNÁNDEZ, A. "Fitoterapia. Bases legales y científicas para su aplicación ". *Redalyc* [en línea], 2004, (Chile) vol. 4, n° 4, pp. 71-74. [Consulta: 05 Marzo 2015]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/856/85640404.pdf>

HUA, S., & TEIK, L. "Quantification of polyphenolic content and bioactive constituents of some commercial rice varieties in Taiwan". *Journal of Food and Analysis*, vol. 1, n° 22 (2012), (China) pp. 122-127.

KAROLINA, V., HUAMÁN, F., & LAIME, S. "Crema dental a base de las propiedades medicinales y terapéuticas del aceite esencial del Geranio (*Pelargonium x hortorum*)". *Revista CIEN DES*, vol. 9, n° 86 (2008), (Perú) pp. 85-97.

LERMA, L. *Evaluación Bioquímica y Biológica de una Hialuronidasa del Veneno de la serpiente peruana Lachesis muta* (Tesis) (pregrado). [en línea] Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Ciencias Biológicas. Lima (Perú). 2006, pp. 9-10 [Consulta: 12 Abril 2015]. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/820/1/lerma_rl.pdf

MENDIVELSO, D., OLIVARES, M., MARTÍNEZ, J., & STASHENKO, E. "Composición química de los metabolitos secundarios volátiles de pelargonium graveolens, en función del método de extracción y época de recolección del material vegetal". *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, vol. 13, n° 33 (2007), (Colombia) pp. 183-184.

MERCANDETTI, M. "Wound Healing and Repair". *Medscape* [en línea], 2015, (Estados Unidos) 1(1), p. 5. [Consulta: 20 Agosto 2015]. Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/1298129-overview#a5>

MIRANDA, M. *Farmacognosia y productos naturales. (Normas Ramales, De drogas crudas y extractos y tinturas.)*, 6^o ed. La Habana-Cuba: Félix Varela, 2006 pp. 32-62

MITCHELL, K., MARKHAM, K., & BOASE, M. "Pigment chemistry and colour of pelargonium flowers". *Phytochemistry*, vol. 47, n^o 3(1998), (Nueva Zelanda) pp. 355-361.

MONGE, D. *Actividad cicatrizante de los extractos metanólicos de Justicia chlorostachya y Plectranthus amboinicus mediante ensayos in vitro de inhibición de hialuronidasa y veneno de cobra (Naja naja).* (Tesis) (pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba (Ecuador). 2015, pp. 24-26

MORALES, M., & MORALES, J. "Plantas medicinales, fitofármacos y fitomedicamentos: hacia una fitomedicina (Fitoterapia moderna y racional), basada en el conocimiento científico actual". *Chile: Sociedad Chilena de Fitoterapia*, vol. 2 (2009), (Chile), pp. 1-3

PÉREZ, G. "Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes". *Cubana Invest Biomed*, vol. 22, n^o 1 (2003), (Cuba) pp.1-3.

SIMON, P. " Skin Wound Healing". *Medscape* [en línea], 2014, (Estados Unidos) 1 (1), pp. 1-2. [Consulta: 20 Agosto 2015]. Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/884594-overview#a4>

SORENSE, L., KARLSMARK, T., & GOTTRUP, F. "Abstinence from smoking reduces incisional wound infection: a randomized controlled trial". *Medline*, vol. 238, n^o 1 (2003), (España) pp.1-5.

STERN, R. "Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway". *European Journal of cell Biology*, vol. 83 (2004), (España) pp. 317-325.

SUBALAKSHMI, M., SARANYA, M., MAHESWARI, U., JARINA, A., KAVIMANI, S., & MURALI, R. "An overview of the current methodologies used for the evaluation of drugs having wound healing activity". *International Journal of Experimental Pharmacology*, vol. 4, n^o 2 (2014), (India) pp. 127-131.

SUNTAR, I., TUMEN, I., USTUN, O., KELES, H., & AKKOL, E. "Appraisal on the wound healing and anti-inflammatory activities of the essential oils obtained from the cones and needles of Pinus species by in vivo and in vitro experimental models". *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 1, n° 139 (2012), (Turquía) pp. 533-540.

VALLEJO, A. "Conservación ¿Gasto o inversión? ECUADOR, terra incógnita". *Revista Ecológica*, vol.1, n° 1 (1998), (Ecuador) pp. 4-8.

WAGNER, H., & BLADT, S. *Plant Drug Analysis a Thin Layer Chromatography*. 2° ed. Germany-Europa: Verlag Berlin Heidelberg, 2001 pp. 220-232

WANIGASEKERA, D., WALIMUNI, K., & CHATURA, D. "In vitro anti-hyaluronidase activity of Sri Lankan low grown orthodox orange pekoe grade black tea (*Camellia sinensis* L)". *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 4, n°12 (2014), (Sri Lanka) pp. 959-963.

WILLIAMS, C., NEWMAN, M., & GIBBY, M. "The application of leaf phenolic evidence for systematic studies within the genus *Pelargonium* (Geraniaceae)". *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 28, n°1 (2000), pp. 119-132.

YI, K., HOCK, C., YEE, S., & HONG, N. "Venomics, lethality and neutralization of *Naja kaouthia* (monocled cobra) venoms from three different geographical regions of Southeast Asia". *Journal of proteomics*, vol. 120, n° 1 (2015),(Tailandia) pp. 106-122.

YVETTE LALLI, J. *In vitro pharmacological properties and composition of leaf essential oils and extracts of selected indigenous *Pelargonium* (Geraniaceae) species* (Tesis) (Maestría). University of the Witwatersrand, Faculty of Health Science. Johannesburg. (2005). pp. 28-29

ZAMBRANO, Y. *Frecuencia de Amputaciones Mayores en Pacientes Atendidos en la Unidad de Pie Diabético que recibieron como terapia coadyuvante Factor de Crecimiento Epidérmico Humano Recombinante en el Hospital Guayaquil " Dr. Abel Gilbert Pontón," de Enero a Diciembre.* (Tesis) (pregrado). Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Facultad de Ciencias Médicas. Guayaquil (Ecuador), 2014. p. 4

ANEXOS

ANEXO A: Materia prima *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey



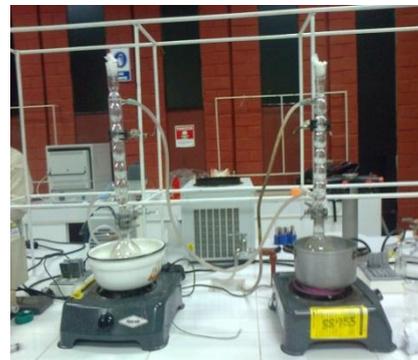
Fuente: Ana Sánchez, 2015

ANEXO B: Parámetros de calidad del material vegetal



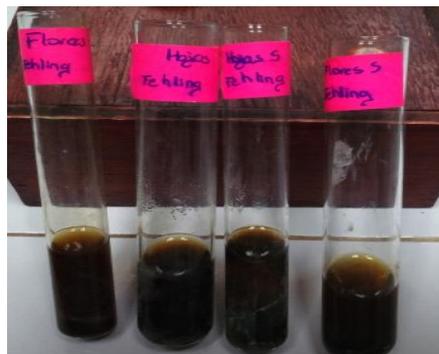
Fuente: Ana Sánchez, 2015

ANEXO C: Obtención de extractos de flores y hojas del *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey



Fuente: Ana Sánchez, 2015

ANEXO D: Tamizaje fitoquímico de los extractos



Fuente: Ana Sánchez, 2015

ANEXO E: Obtención de la fracción flavónica de las hojas y flores del *Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey



Fuente: Ana Sánchez, 2015



Fuente: Ana Sánchez, 2015

ANEXO F: Fracción flavónica de flores y hojas



Fuente: Ana Sánchez, 2015

ANEXO G: Cromatografía en capa fina



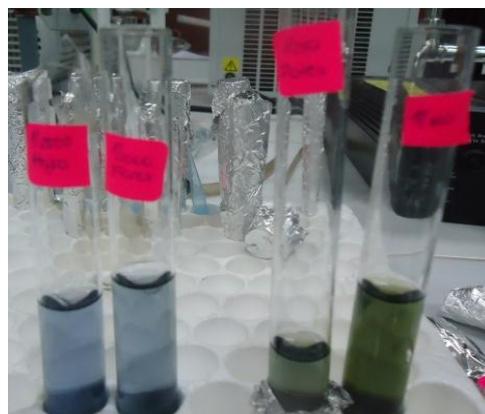
Fuente: Ana Sánchez, 2015

ANEXO H: Preparación del reactivo de Folin Ciocalteu



Fuente: Ana Sánchez, 2015

ANEXO I: Cuantificación de compuestos fenólicos totales



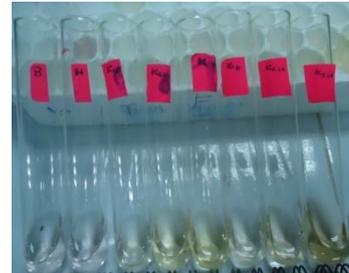
Fuente: Ana Sánchez, 2015

ANEXO J: Cuantificación de compuestos flavónicos



Fuente: Ana Sánchez, 2015

ANEXO K: Ensayo de inhibición de la hialuronidasa bovina



Fuente: Ana Sánchez, 2015

ANEXO L: Ensayo de inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra



Fuente: Ana Sánchez, 2015

ANEXO M: Análisis estadístico de los resultados de la inhibición de la hialuronidasa bovina por efecto de las hojas

One Way Analysis of Variance						Martes, octubre 06, 2015, 12:36:59
Data source: Data 1 in Notebook1						
Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,659)						
Equal Variance Test: Passed (P = 0,336)						
Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM	
Col1	3	0	90,889	0,139	0,0803	
Col2	3	0	66,204	0,223	0,129	
Col3	3	0	39,359	0,0995	0,0575	
Col4	3	0	16,471	0,734	0,424	
Col5	3	0	10,349	0,492	0,284	
Col6	3	0	2,770	0,339	0,196	
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P	
Between Groups	5	18189,398	3637,880	22371,445	<0,001	
Residual	12	1,951	0,163			
Total	17	18191,349				
The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).						
Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000						
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):						
Comparisons for factor:						
Comparison	Diff of Means	p	q	P	P < 0,050	
Col1 vs. Col6	88,119	6	378,489	<0,001	Yes	
Col1 vs. Col5	80,540	6	345,934	<0,001	Yes	
Col1 vs. Col4	74,418	6	319,639	<0,001	Yes	
Col1 vs. Col3	51,530	6	221,333	<0,001	Yes	
Col1 vs. Col2	24,685	6	106,025	<0,001	Yes	
Col2 vs. Col6	63,434	6	272,463	<0,001	Yes	
Col2 vs. Col5	55,855	6	239,908	<0,001	Yes	
Col2 vs. Col4	49,733	6	213,614	<0,001	Yes	
Col2 vs. Col3	26,846	6	115,308	<0,001	Yes	
Col3 vs. Col6	36,589	6	157,156	<0,001	Yes	
Col3 vs. Col5	29,009	6	124,601	<0,001	Yes	
Col3 vs. Col4	22,887	6	98,306	<0,001	Yes	
Col4 vs. Col6	13,701	6	58,849	<0,001	Yes	
Col4 vs. Col5	6,122	6	26,295	<0,001	Yes	
Col5 vs. Col6	7,579	6	32,555	<0,001	Yes	

Fuente: Ana Sánchez, 2015

ANEXO N: Análisis estadístico de los resultados de la inhibición de la hialuronidasa bovina por efecto de las flores

One Way Analysis of Variance						Martes, octubre 06, 2015, 12:38:38
Data source: Data 1 in Notebook1						
Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,227)						
Equal Variance Test: Passed (P = 0,159)						
Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM	
Col1	3	0	92,493	0,131	0,0758	
Col2	3	0	66,546	1,337	0,772	
Col3	3	0	42,712	0,376	0,217	
Col4	3	0	22,230	0,313	0,181	
Col5	3	0	13,630	0,451	0,260	
Col6	3	0	4,810	0,213	0,123	
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P	
Between Groups	5	17148,055	3429,611	8975,542	<0,001	
Residual	12	4,585	0,382			
Total	17	17152,640				
The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).						
Power of performed test with alpha=0,050: 1,000						
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):						
Comparisons for factor:						
Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050	
Col1 vs. Col6	87,682	6	245,686	<0,001	Yes	
Col1 vs. Col5	78,863	6	220,974	<0,001	Yes	
Col1 vs. Col4	70,263	6	196,876	<0,001	Yes	
Col1 vs. Col3	49,781	6	139,487	<0,001	Yes	
Col1 vs. Col2	25,947	6	72,703	<0,001	Yes	
Col2 vs. Col6	61,736	6	172,983	<0,001	Yes	
Col2 vs. Col5	52,916	6	148,272	<0,001	Yes	
Col2 vs. Col4	44,316	6	124,173	<0,001	Yes	
Col2 vs. Col3	23,834	6	66,784	<0,001	Yes	
Col3 vs. Col6	37,901	6	106,200	<0,001	Yes	
Col3 vs. Col5	29,082	6	81,488	<0,001	Yes	
Col3 vs. Col4	20,481	6	57,389	<0,001	Yes	
Col4 vs. Col6	17,420	6	48,810	<0,001	Yes	
Col4 vs. Col5	8,600	6	24,099	<0,001	Yes	
Col5 vs. Col6	8,819	6	24,712	<0,001	Yes	

ANEXO O: Análisis estadístico de los resultados de la inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra por efecto de las hojas

One Way Analysis of Variance						Martas, octubre 06, 2015, 12:28:25
Data source: Data 1 in Notebook 1						
Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P= 0,239)						
Equal Variance Test: Passed (P= 0,186)						
Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM	
Col 1	3	0	28,167	0,503	0,291	
Col 2	3	0	17,233	0,702	0,406	
Col 3	3	0	13,433	0,462	0,267	
Col 4	3	0	10,567	0,404	0,233	
Col 5	3	0	8,133	0,404	0,233	
Col 6	3	0	2,667	0,404	0,233	
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P	
Between Groups	5	1151,140	230,228	952,668	<0,001	
Residual	12	2,900	0,242			
Total	17	1154,040				
The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P= <0,001).						
Power of performed test with alpha= 0,050: 1,000						
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):						
Comparisons for factor:						
Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050	
Col 1 vs. Col 6	25,500	6	89,845	<0,001	Yes	
Col 1 vs. Col 5	20,033	6	70,584	<0,001	Yes	
Col 1 vs. Col 4	17,600	6	62,010	<0,001	Yes	
Col 1 vs. Col 3	14,733	6	51,910	<0,001	Yes	
Col 1 vs. Col 2	10,933	6	38,522	<0,001	Yes	
Col 2 vs. Col 6	14,567	6	51,323	<0,001	Yes	
Col 2 vs. Col 5	9,100	6	32,062	<0,001	Yes	
Col 2 vs. Col 4	6,667	6	23,489	<0,001	Yes	
Col 2 vs. Col 3	3,800	6	13,389	<0,001	Yes	
Col 3 vs. Col 6	10,767	6	37,934	<0,001	Yes	
Col 3 vs. Col 5	5,300	6	18,674	<0,001	Yes	
Col 3 vs. Col 4	2,867	6	10,100	<0,001	Yes	
Col 4 vs. Col 6	7,900	6	27,834	<0,001	Yes	
Col 4 vs. Col 5	2,433	6	8,573	<0,001	Yes	
Col 5 vs. Col 6	5,467	6	19,261	<0,001	Yes	

ANEXO P: Análisis estadístico de los resultados de la inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra por efecto de las flores

One Way Analysis of Variance						Martes, octubre 06, 2015, 12:20:23
Data source: Data 1 in Notebook1						
Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,167)						
Equal Variance Test: Passed (P = 0,171)						
Group Name	N	Missing	Mean	Std. Dev	SEM	
Col 1	3	0	60,671	1,099	0,634	
Col 2	3	0	37,890	0,415	0,240	
Col 3	3	0	30,695	0,415	0,240	
Col 4	3	0	19,185	0,415	0,240	
Col 5	3	0	15,588	0,831	0,480	
Col 6	3	0	12,470	0,415	0,240	
Col 7	3	0	10,072	0,719	0,415	
Col 8	3	0	4,796	0,415	0,240	
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P	
Between Groups	7	7116,523	1016,646	2481,173	<0,001	
Residual	16	6,556	0,410			
Total	23	7123,079				
The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).						
Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000						
Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method):						
Comparisons for factor:						
Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0,050		
Col 1 vs. Col 8	55,875	106,908	<0,001	Yes		
Col 1 vs. Col 7	50,600	96,813	<0,001	Yes		
Col 1 vs. Col 6	48,201	92,225	<0,001	Yes		
Col 1 vs. Col 5	45,084	86,260	<0,001	Yes		
Col 1 vs. Col 4	41,487	79,378	<0,001	Yes		
Col 1 vs. Col 3	29,976	57,354	<0,001	Yes		
Col 1 vs. Col 2	22,782	43,589	<0,001	Yes		

Fuente: Ana Sánchez, 2015