



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

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO CICATRIZANTE DEL EXTRACTO  
DE LAS HOJAS *Bauhinia tarapotensis Benth* (PATA DE VACA)  
MEDIANTE LESIONES INDUCIDAS EN RATONES (*Mus musculus*)”**

Trabajo de titulación presentado para optar el grado académico de:

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTORA: JIMENA DE LAS MERCEDES CHAGLLA CRIOLLO**

**TUTORA: DRA. ELIZABETH ESCUDERO**

**Riobamba- Ecuador**

**2015**

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

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: Trabajo de Titulación: **EVALUACIÓN DEL EFECTO CICATRIZANTE DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS *Bauhinia tarapotensis Benth* (PATA DE VACA) MEDIANTE LESIONES INDUCIDAS EN RATONES (*Mus musculus*)**, de responsabilidad de la señorita Jimena de las Mercedes Chaglla Criollo, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

**FIRMA**

**FECHA**

**Dra. Elizabeth Escudero**

**DIRECTORA DEL TRABAJO  
DE TITULACIÓN**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**BQF. Cecilia Toaquiza**

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**DOCUMENTALISTA**

**SISBIB ESPOCH**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Yo, Jimena de las Mercedes Chaglla Criollo soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

---

**JIMENA DE LAS MERCEDES CHAGLLA CRIOLLO**

## **DEDICATORIA**

Después de haber culminado mis estudios universitarios en la carrera de Bioquímica y Farmacia quiero dedicar mi trabajo de titulación a mis queridos padres quien me han sabido guiarme por un buen camino, por su apoyo incondicional moralmente y económico y a mis hermanos por estar junto a mi durante mi etapa estudiantil.

Jimena

## **AGRADECIMIENTO**

Mi agradecimiento eterno a todas las personas que me ayudaron en la realización de mi proyecto de titulación y poder culminarlo con éxito.

A mi directora de tesis Doctora Elizabeth Escudero y colaborador Dr. Feliz Andueza por dirigirme en la realización de mi trabajo y brindarme sus valiosos conocimientos.

A mis padres y hermanos por incentivarne a culminar una de mis metas trazadas.

<b>TABLA DE CONTENIDO</b>	<b>Páginas</b>
<b>CERTIFICACIÓN</b> .....	ii
<b>DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDADES</b> .....	iii
<b>DEDICATORIA</b> .....	iv
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	v
<b>TABLA DE CONTENIDO</b> .....	vi
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	xii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xiv
<b>ÍNDICE DE GRÁFICOS</b> .....	xv
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b> .....	xvi
<b>RESUMEN</b> .....	xvii
<b>SUMMARY</b> .....	xviii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1

## **CAPÍTULO I**

<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	4
<b>1.1. Antecedentes de la investigación</b> .....	4
<b>1.2. Plantas medicinales</b> .....	5
<b>1.3. Extracción de materias primas vegetales</b> .....	6
<i>1.3.1. Métodos de Extracción</i> .....	6
<i>1.3.1.1. Percolación</i> .....	6
<i>1.3.1.2. Maceración</i> .....	7
<i>1.3.1.3. Decocción</i> .....	8
<i>1.3.1.4. Infusión</i> .....	8
<i>1.3.1.5. Digestión</i> .....	8
<b>1.3.2. Extractos</b> .....	8
<b>1.3.3. Fitoterapia</b> .....	9
<b>1.4. La piel</b> .....	9
<i>1.4.1. Epidermis</i> .....	10
<i>1.4.2. Dermis</i> .....	12
<i>1.4.2.1. Células de la dermis</i> .....	13
<i>1.4.2.2. Anexos de la piel</i> .....	13

1.4.2.2.1.	<i>Pelo</i> .....	13
1.4.2.2.2.	<i>Glándulas sebáceas</i> .....	13
1.4.2.2.3.	<i>Glándulas sudoríparas</i> .....	13
1.4.2.2.4.	<i>Uñas</i> .....	14
<b>1.4.3.</b>	<i>Hipodermis</i> .....	14
<b>1.5.</b>	<b>Cicatrización de la herida</b> .....	14
<b>1.5.1.</b>	<b><i>Proceso de cicatrización en la Piel</i></b> .....	15
1.5.1.1.	<i>Fase de hemostasia y coagulación</i> .....	16
1.5.1.2.	<i>Fase de Inflamación</i> .....	18
1.5.1.3.	<i>Fase de proliferación</i> .....	20
1.5.1.4.	<i>Fase de maduración</i> .....	20
<b>1.5.2.</b>	<b><i>Formas de Cicatrización</i></b> .....	22
1.5.2.1.	<i>Cicatrización por primera intención</i> .....	22
1.5.2.2.	<i>Cicatrización por segunda intención</i> .....	22
1.5.2.3.	<i>Cicatrización por tercera intención</i> .....	23
<b>1.6.</b>	<b>Vegetal <i>Bauhinia tarapotensis Benth (Pata de Vaca)</i></b> .....	23
<b>1.6.1.</b>	<b><i>Taxonomía</i></b> .....	24
<b>1.6.2.</b>	<b><i>Propiedades Terapéuticas</i></b> .....	26
<b>1.7.</b>	<b>Metabolitos secundarios que intervienen en la cicatrización</b> .....	27
<b>1.7.1.</b>	<b><i>Derivados Fenólicos</i></b> .....	27
1.7.1.1.	<i>Taninos</i> .....	27
1.7.1.1.1.	<i>Tipos de Taninos</i> .....	28
1.7.1.2.	<i>Flavonoides</i> .....	30
1.7.1.2.1.	<i>Estructura</i> .....	30
1.7.1.2.2.	<i>Clasificación de los Flavonoides</i> .....	31
<b>1.8.</b>	<b>Animales de experimentación</b> .....	33
<b>1.8.1.</b>	<b><i>Ratón (<i>Mus musculus</i>)</i></b> .....	34
<b>1.8.2.</b>	<b><i>Macroambientes y Microambientes</i></b> .....	34

## CAPÍTULO II

2	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	36
2.1.	<b>Lugar de la investigación</b> .....	36
2.2.	<b>Materiales, equipos y reactivos</b> .....	37
2.2.1.	<i>Material vegetal</i> .....	37
2.2.2.	<i>Reactivo biológico</i> .....	37
2.2.3.	<i>Material farmacológico</i> .....	38
2.2.4.	<i>Materiales</i> .....	38
2.2.5.	<i>Equipos</i> .....	39
2.2.6.	<i>Reactivos</i> .....	39
2.3.	<b>Técnicas y Métodos</b> .....	40
2.3.1.	<i>Recolección del material vegetal</i> .....	40
2.3.2.	<i>Limpieza y desinfección del material vegetal</i> .....	40
2.4.	<b>Control de calidad del material vegetal</b> .....	41
2.4.1.	<i>Determinación del contenido de Humedad</i> .....	41
2.4.2.	<i>Determinación de Cenizas totales</i> .....	42
2.4.3.	<i>Determinación de Cenizas Solubles en Agua</i> .....	44
2.4.4.	<i>Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico</i> .....	45
2.5.	<b>Elaboración de extractos</b> .....	46
2.6.	<b>Tamizaje Fitoquímico</b> .....	48
2.6.1.	<i>Reacciones de los metabolitos secundarios presentes en el extracto etéreo..</i>	48
2.6.2.	<i>Reacciones de los metabolitos secundarios presentes en el extracto alcohólico</i> .....	50
2.6.3.	<i>Reacciones de los metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso</i> .....	53
2.7.	<b>Análisis Cromatográfico</b> .....	55
2.8.	<b>Cuantificación de metabolitos secundarios</b> .....	56
2.8.1.	<i>Cuantificación de Flavonoides Totales en el extracto de hojas Bauhinia tarapotensis Benth (Pata de Vaca)</i> .....	56
2.8.2.	<i>Cuantificación de Fenoles totales en el extracto de hojas Bauhinia tarapotensis Benth (Pata de Vaca)</i> .....	57

2.9.	Control de calidad del extracto.....	58
2.10.	Análisis Microbiológico del extracto.....	62
2.10.1.	<i>Método de extensión en placa para Aerobios mesófilos</i> .....	62
2.10.2.	<i>Método de extensión en placa para Mohos y Levaduras</i> .....	63
2.10.3.	<i>Método vertido en placa para Coliformes totales y Fecales</i> .....	64
2.11.	Evaluación de la actividad cicatrizante del extracto <i>Bauhinia tarapotensis Benth. Protocolo Farmacológico de Cicatrización</i> .....	64
2.11.1.	<i>Fase de Climatización</i> .....	64
2.11.2.	<i>Fase de Lesión Inducida</i> .....	65
2.11.3.	<i>Fase del Tratamiento</i> .....	66
2.11.4.	<i>Fase de Evaluación</i> .....	67
2.12.	Análisis Histopatológico.....	67

### CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	68
3.1.	Control de calidad del material vegetal.....	68
3.1.1.	<i>Determinación del Contenido de Humedad</i> .....	68
3.1.2.	<i>Determinación de Cenizas Totales</i> .....	69
3.1.3.	<i>Determinación de Cenizas Solubles en Agua</i> .....	69
3.1.4.	<i>Determinación de Cenizas Insolubles en HCl</i> .....	70
3.2.	Tamizaje Fitoquímico.....	70
3.3.	Cromatografía en Capa Fina (TLC).....	71
3.4.	Cuantificación de Flavonoides Totales.....	72
3.5.	Cuantificación de Fenoles Totales.....	73
3.6.	Determinación de las propiedades Físico – Químicas, Organolépticas y Análisis Microbiológico del extracto ( <i>Bauhinia tarapotensis Benth</i> ).....	74
3.6.1.	<i>Características organolépticas</i> .....	74
3.6.2.	<i>Determinaciones Físico-químicas</i> .....	74
3.6.3.	<i>Análisis Microbiológico extracto alcohólico de Bauhinia tarapotensis Benth (Pata de Vaca)</i> .....	75
3.7.	Evaluación de la Actividad Cicatrizante del extracto alcohólico de <i>Bauhinia tarapotensis Benth (Pata de Vaca)</i> .....	76

3.7.1.	<i>Tiempo de cicatrización</i> .....	76
3.7.1.1.	<i>Análisis estadístico de los días de cicatrización</i> .....	78
3.7.2.	<i>Eficiencia de cicatrización de heridas comparando los grupos de investigación con los grupos control</i> .....	80
3.7.3.	<i>Longitud de la herida al finalizar el tratamiento para cada uno de los grupos investigativos</i> .....	81
3.1.7.2.	<i>Examen Histopatológico</i> .....	83
<b>CONCLUSIONES</b> .....		85
<b>RECOMENDACIONES</b> .....		86
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		
<b>ANEXOS</b>		

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-2</b>	Taxonomía de la Especie <i>Bauhinia tarapotensis Benth</i> (Pata de Vaca)....	25
<b>Tabla 2-2</b>	Protocolo Experimental.....	66
<b>Tabla 3-3</b>	Resultados de la Determinación del contenido de Humedad del material vegetal de <i>Bauhinia tarapotensis Benth</i> (Pata de Vaca).....	68
<b>Tabla 4-3</b>	Resultados de la Determinación de Cenizas Totales del material vegetal de <i>Bauhinia tarapotensis Benth</i> (Pata de Vaca).....	69
<b>Tabla 5-3</b>	Resultados de la Determinación de Cenizas solubles en agua del material vegetal de <i>Bauhinia tarapotensis Benth</i> (Pata de Vaca).....	69
<b>Tabla 6-3</b>	Resultados de la Determinación de Cenizas insolubles en HCl del material vegetal seco y molido de <i>Bauhinia tarapotensis Benth</i> (Pata de Vaca).....	70
<b>Tabla 7-3</b>	Resultados del Tamizaje Fitoquímico del extracto etéreo, alcohólico y acuoso de las hojas <i>Bauhinia tarapotensis Benth</i> (Pata de Vaca)...	70
<b>Tabla 8-3</b>	Resultados de la Determinación de los Rf de la muestra de hojas <i>Bauhinia tarapotensis Benth</i> (Pata de Vaca).....	72
<b>Tabla 9-3</b>	Resultados de la Cuantificación de Flavonoides Totales de la muestra de hojas <i>Bauhinia tarapotensis Benth</i> (Pata de Vaca).....	72
<b>Tabla 10-3</b>	Resultados de la Cuantificación de Fenoles Totales de la muestra de hojas <i>Bauhinia tarapotensis Benth</i> (Pata de Vaca).....	73
<b>Tabla 11-3</b>	Resultados de los requisitos Organolépticos del extracto alcohólico de <i>Bauhinia tarapotensis Benth</i> (Pata de Vaca).....	74
<b>Tabla 12-3</b>	Resultados de las Propiedades Físico – Químicas del extracto alcohólico de <i>Bauhinia tarapotensis Benth</i> (Pata de Vaca).....	75
<b>Tabla 13-3</b>	Resultados del Análisis microbiológico de Aerobios Mesófilos, Mohos y Levaduras, Coliformes fecales en las hojas del extracto alcohólico de <i>Bauhinia tarapotensis Benth</i> (Pata de Vaca).....	74
<b>Tabla 14-3</b>	Resultados del tiempo de cicatrización de heridas inducidas en ratones obtenidos de los grupos investigativos.....	76
<b>Tabla 15-3</b>	Análisis de Varianza (ANOVA) del efecto cicatrizante en los grupos	

	tratados considerando los días de cicatrización.....	78
<b>Tabla 16-3</b>	Prueba de comparaciones múltiples Tukey del efecto cicatrizante en los grupos tratados considerando los días de cicatrización.....	78
<b>Tabla 17-3</b>	Porcentaje de eficiencia de cicatrización de heridas comparando los grupos de investigación con los grupos controles.....	80
<b>Tabla 18-3</b>	Longitud de la herida al finalizar el tratamiento de los grupos investigativos.....	81
<b>Tabla 19-3</b>	Examen Histopatológico de ratones ( <i>Mus musculus</i> ) a los cuales se administró extracto alcohólico de las hojas <i>Bauhinia tarapotensis Benth</i> (Pata de Vaca) a diferentes concentraciones (25 %, 50% y 75%), control positivo y negativo.....	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1</b>	Estructura de la piel.....	10
<b>Figura 2-1</b>	Estratos de la piel.....	12
<b>Figura 3-1</b>	Fases del proceso de cicatrización.....	16
<b>Figura 4-1</b>	Fase de coagulación.....	18
<b>Figura 5-1</b>	Fase de Inflamación Temprana.....	19
<b>Figura 6-1</b>	Fase de Maduración.....	21
<b>Figura 7-1</b>	Cicatrización por primera intención.....	22
<b>Figura 8-1</b>	Cicatrización por segunda intención.....	22
<b>Figura 9-1</b>	Cicatrización por tercera intención.....	23
<b>Figura 10-1</b>	Vegetal <i>Bauhinia tarapotensis Benth</i> (Pata de Vaca).....	24
<b>Figura 11-1</b>	Taxonomía del vegetal <i>Bauhinia tarapotensis Benth</i> .....	24
<b>Figura 12-1</b>	Estructura molecular base de los Flavonoides.....	31
<b>Figura 13-1</b>	Estructura química de la quercetina.....	32
<b>Figura 14-1</b>	Microambientes y Macroambientes.....	35
<b>Figura 15-2</b>	Ratón albino ( <i>Mus musculus</i> ).....	37
<b>Figura 16-2</b>	Recolección del vegetal Pata de Vaca.....	40
<b>Figura 17-2</b>	Extracción sucesiva del material vegetal <i>Bauhinia tarapotensis Benth</i> para aplicar el Tamizaje Fitoquímico.....	47
<b>Figura 18-2</b>	Esquema de las reacciones a realizar en el extracto de éter etílico.....	48
<b>Figura 19-2</b>	Esquema de las reacciones a realizar en el extracto alcohólico.....	50
<b>Figura 20-2</b>	Esquema de las reacciones a realizar en el extracto acuoso.....	53

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3</b>	Gráfico Días de cicatrización.....	77
<b>Gráfico 2-3</b>	Gráfico de eficiencia de cicatrización.....	88
<b>Gráfico 3-3</b>	Disminución de la longitud de la herida durante el tratamiento.....	82

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO A</b>	PESO DE RATÓNES PARA EL ESTUDIO
<b>ANEXO B</b>	SEGUIMIENTO DIARIO DEL PROCESO DE CICATRIZACION EN RATONES ( <i>Mus musculus</i> )
<b>ANEXO C</b>	CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)
<b>ANEXO D</b>	CONTROL DE CALIDAD DE LA MUESTRA VEGETAL
<b>ANEXO E</b>	PREPARACIÓN DE EXTRACTOS
<b>ANEXO F</b>	TAMIZAJE FITOQUIMICO
<b>ANEXO G</b>	PARÁMETROS DE CALIDAD DE DEL EXTRACTO ( <i>Bauhinia tarapotensis Bent</i> )
<b>ANEXO H</b>	CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y FENOLES TOTALES
<b>ANEXO I</b>	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO
<b>ANEXO J</b>	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE
<b>ANEXO K</b>	EXAMEN HISTOPATOLÓGICO
<b>ANEXO L</b>	NORMA TECNICA ECUATORIANA NTE INEN 2 392:2007
<b>ANEXO M</b>	RESULTADO URKUND

## RESUMEN

Evaluar el efecto cicatrizante de *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca) mediante lesiones inducidas en ratones (*Mus musculus*), el estudio se realizó en los laboratorios de Productos Naturales y Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Se realizó el control de calidad del material vegetal los mismos que se encuentran dentro de las normas establecidas. Los extractos al 75%, 50% y 25%, se elaboraron por el método de maceración con alcohol al 96%, se determinó el perfil fitoquímico para identificar los metabolitos presentes en la especie, se aisló flavonoides por Cromatografía en Capa Fina y se cuantificó la concentración de flavonoides y compuestos fenólicos totales por Espectrofotometría. Para garantizar la calidad del extracto se determinó parámetros físico-químicas, características organolépticas y microbiológicas. Se evaluó la actividad cicatrizante mediante lesiones inducidas en el dorso de 24 ratones (*Mus musculus*), distribuidos en 6 grupos: (Sin tratamiento) Control-; (Acetato de Prednisolona-Neomicina Sulfato) Control + y (Alcohol al 40%) Control +; Tratamiento con extracto al 75 %; Tratamiento con extracto al 50 % y Tratamiento con extracto al 25 %, el cual fueron administradas por vía tópica. Por medio del análisis estadístico se evaluaron los resultados con un intervalo de confianza del 95%, se comprobó que los extractos poseen actividad cicatrizante, reduciendo el proceso de cicatrización. Se concluyó que el extracto alcohólico al 75 % es efectivo en comparación a los demás grupos de investigación ya que su día de cicatrización fue de 8 días, siendo el tratamiento más efectivo. Se recomienda a los estudiantes de Bioquímica y Farmacia realizar más estudios sobre *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca), debido que presenta otras propiedades farmacológicas como diuréticas, digestivas, antioxidantes.

**PALABRAS CLAVES:** <PATA DE VACA [*BAUHINIA TARAPOTENSIS BENTH*]>  
<ACTIVIDAD CICATRIZANTE> < RATONES [*MUS MUSCULUS*]><PERFIL  
FITOQUÍMICO><COMPUESTOS FENÓLICOS>

## SUMMARY

To evaluate the healing effect of *Bauhinia tarapotensis Benth* (Cow Leg) by induced in mice (*Mus musculus*) injuries, this study was conducted in the laboratories of Natural Products and Bioterio from Science Faculty at the Polytechnic School of Chimborazo. Quality control of plant material were carried out which have the established standards. Extracts of 75%, 50% and 25% were prepared by the method of maceration with 96% alcohol, the phytochemical profile was determined in order to identify metabolites in the species, flavonoids were isolated by chromatography thin layer, in which quantified the total concentration of flavonoids and phenolic compounds by spectrophotometry. To ensure the quality of the extract were determined physicochemical parameters, organoleptic and microbiological characteristics. The healing activity was assessed by induced injuries on the backs of 24 mice (*Mus musculus*), they were divided into 6 groups: (untreated) Control -; (prednisolone acetate- neomycin sulfato) control + and (40% alcohol) Control +; extract treatment with 75%; 50% and 25%, which were administered topically. By statistical analysis were evaluated results with a confidence interval of 95%, it was found that extracts having healing activity, reducing the healing process. It concluded that 75% of alcoholic extract is effective compared to other research groups as their day of healing was 8 days, being this the most effective treatment. It suggests to Students from biochemistry and pharmacy carry out studies about *Bauhinia tarapotensis Benth* (Cow Leg), due to it has other pharmacological properties as a diuretic, digestive and antioxidants.

**KEY WORDS:** <COW LEG [*BAUHINIA TARAPOTENSIS BENTH*]> <HEALING ACTIVITY>  
<MICE [*MUS MUSCULUS*]> <PHYTOCHEMICAL PROFILE> <PHENOLIC COMPOUNDS>

## INTRODUCCIÓN

Anualmente, alrededor de 100 millones de personas adquieren cicatrices de diferentes formas causales, tenemos por ejemplo provocadas por quemaduras, accidentes de diferentes índoles, ruptura de tejidos; las cicatrices necesitan de un tratamiento seguro y rápido lo cual hace que la actividad cicatrizante sea un desafío terapéutico. Desde hace algún tiempo atrás investigadores y comunidades médicas han averiguado como optimizar el tratamiento para la cicatrización (Velandia, D. 2009, pp. 13-14).

En todo el mundo, hace más de 30 años se ha retomado nuevamente la utilización de Fitomedicamentos que se han elaborados a base de plantas medicinales para tratamientos fitoterapéutico, enfermedades comunes como resfríos, hipertensión, etc. La gran diversidad de estudios científicos ha venido a sostener que este tipo de enfermedades pueden ser tratadas con la Fitoterapia, en nuestros días se estima que el 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional para atender necesidades básicas de asistencia médica (Chateauneuf, R. 2012, pp. 3-5)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido a la Fitomedicina como el estudio de principios activos de origen vegetal en terapéutica, fundando en el conocimiento científico moderno, esto es un pilar fundamental para la farmacología, la terapia moderna como la farmacodinamia, farmacocinética, además implica estudios preclínicos, clínicos por medios reconocidamente validados por la comunidad científica (Chateauneuf, R. 2012, pp. 3-5).

Tradicionalmente los productos naturales y la medicina han estado vinculados con el uso directo de plantas medicinales, basados en conocimientos empíricos sobre las plantas curativas por los diferentes grupos étnicos a lo largo de todo el mundo. Actualmente el tema de salud en Ecuador es un aspecto de prioridad es por ello que resulta fundamental conocer actividades biológicas de las plantas medicinales, para tratar enfermedades, en nuestro país no existe suficiente información sobre la inmensa cantidad de plantas medicinales y menos sobre las propiedades terapéuticas. Por este motivo es indispensable evitar el desgaste del conocimiento tradicional que poseen los pueblos aborígenes de nuestro país, mejorar las condiciones socioeconómicas de las comunidades que usan y comercializan sus propias plantas (Hauad Marroquin, 2010, pp. 10-20), con ayuda del Plan Nacional del

Buen vivir y su objetivo del cambio de la matriz productiva, su propósito es reducir al máximo los ingresos de otros países, mejoramiento del talento mediante el cambio de educación y grandes inversiones, además, este Plan quiere consolidar el sistema social, solidario y económico; garantizar el trabajo digno; impulsar la transformación de la matriz productiva; asegurar la soberanía y eficiencia de los sectores estratégicos para la transformación industrial (Bonifaz, C. 2009, <http://periodicoexpectativa.com>).

De lo expuesto se puede sustentar que las plantas medicinales y sus derivados forman parte del 25% de los fármacos actuales, otro 50% son de origen sintético pero relacionado con los principios aislados de plantas medicinales (Montealegre, 2012; Turner, 2012).

Por lo mencionado el presente estudio tuvo como objetivo comprobar la actividad cicatrizante del extracto de hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca) en heridas inducidas en ratones (*Mus musculus*).

*Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca) es una planta medicinal que encontramos en la Amazonía Ecuatoriana, conocida por la población por sus diversas propiedades curativas para el ser humano, los nativos de la Provincia de Orellana y Pastaza usan las hojas de forma interna y externa en heridas de toda forma causal, mejorando el proceso de cicatrización, también es utilizada para tratar problemas gástricos, diuréticas, antiinflamatorias, diarreicas, antisépticas y la propiedad más investigada por todo el mundo hipoglucemiante.

Este estudio confirmó el efecto cicatrizante de hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* siendo un aporte a la ciencia; en base a este trabajo se podrá procesar fitofármacos con el principio activo responsable de esta propiedad que se cree que son los taninos. Así se contribuirá a las investigaciones en Ecuador, aportar conocimientos al campo farmacéutico y su aplicación en la medicina clínica, a su vez en el desarrollo científico y económico, al permitir que las empresas nacionales crezcan con la elaboración de los productos, en lugar de importarlos, generando de esta manera fuentes de trabajo.

Para lograr el objetivo planteado, se elaboró extractos alcohólico de hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* al 75%, 50% y 25% en heridas en el área dorsal de ratones, frente a controles positivos como

Acetato de Prednisolona-Sulfato de Neomicina y Alcohol al 40%, evidenciando un poder cicatrizante del vegetal *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca).

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Evaluar el efecto cicatrizante del extracto de las hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca) mediante lesiones inducidas en ratones (*Mus musculus*)”.

### **Objetivo Específicos**

- Identificar los metabolitos secundarios de las hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de vaca).
- Determinar la presencia de flavonoides mediante cromatografía en capa fina (TLC).
- Cuantificar el contenido de flavonoides y fenoles totales presentes en las hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de vaca).
- Establecer las propiedades Físico-Químicas y Microbiológicas del extracto de hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de vaca).
- Comprobar el efecto cicatrizante del extracto *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de vaca) a diferentes concentraciones en heridas inducidas en ratones (*Mus musculus*).

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Antecedentes de la Investigación

Todas las actividades que se encuentran relacionadas con el desarrollo industrial y el progreso de las actividades económicas vinculadas a la actual sociedad dan lugar a la pérdida de cultura tradicional, un quebranto de la biodiversidad, por este motivo el gobierno y autoridades competentes a nivel mundial han rescatado el estudio de los productos naturales, aceptando las sugerencias de la Asamblea Mundial de la Salud, para rescatar el empleo de la medicina tradicional en la asistencia médica (Satyendra, 2012, pp 138-142).

No hay registrada una fecha exacta desde el momento que las plantas comenzaron a utilizarse como medicinales para curar enfermedades, se aprecia que las plantas empezaron a utilizarse hace unos 60.000 años atrás (Gracia, 2013).

Ecuador es uno de los países donde la mayoría de la población utiliza plantas medicinales para aliviar enfermedades, esto ocurre en la población rural como también suburbana, la razón es que estas zonas se encuentran lejos de centros urbanos donde existe la atención médica, y el número de centros de salud son escasos.

Nuestro país siendo muy diverso en cuanto a fauna y principalmente flora son escasos los estudios fitoquímicos y farmacológicos realizados con sus diversas plantas medicinales, es decir que están siendo subutilizadas, y se está derrochando todo el potencial de las mismas (Kohler, 1999, pp. 60-69).

Los problemas más frecuentes de nuestra población es la generación de heridas producidas por diferentes agentes causales, es una lesión física que tiene como consecuencia la rotura en la estructura del cuerpo. Puede localizarse por debajo de la piel, en la superficie o en las dos áreas. Además podemos mencionar a heridas causadas por cirugías, accidentes o caídas (Vaca, 2011).

Conociendo la información bibliográfica acerca de la especie *Bauhinia sp.* (Pata de Vaca) se ha realizado una investigación en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo sobre su propiedad adelgazante en el extracto hidroalcohólico comparado con un medicamento homeopático en el cual se obtuvieron excelentes resultados, en el estudio fitoquímico se identificaron metabolitos como: saponinas, taninos, terpenoides, trazas de fenoles, alcaloides, flavonoides, triterpenoides, esto nos orienta a seguir buscando más propiedades que nos brinda esta especie de la Amazonia Ecuatoriana, por ello la investigación se proyecta en investigar el efecto cicatrizante del vegetal que comúnmente se utiliza en la Provincia de Pastaza.

También, la actividad antiinflamatoria fue estudiada en la Universidad de Tolima Colombia, en el año 2012 con el tema “Actividad antiinflamatoria y antioxidante de *Bauhinia kalbreyeri Harms* en un modelo de inflamación intestinal agudo en ratas”. Como datos previos a esta investigación se ha determinado la composición química de algunas especies del género *Bauhinia*; se han encontrado lactonas, terpenoides, esteroides, triterpenos, flavonoides, taninos y quinonas el cual nos ayuda a determinar con claridad las bondades que nos brinda este vegetal de la Amazonia.

Una vez identificado los metabolitos se puede determinar la diversidad de efectos farmacológicos como es el proceso de recuperación de heridas, antiinflamatoria, antioxidante, antineoplásica, cardiotónica, entre otros, siendo una alternativa para el sistema de salud público (Montealegre, 2012; Turner, 2012).

Estudios realizados han demostrado que plantas del género *Bauhinia* se ha mencionado que las sustancias antioxidantes presentes en el vegetal puedan promover la recuperación de una lesión y su epitelización, como se ha reportado en otras plantas de este género, en las cuales las cantidades elevadas de taninos pueden ser posiblemente la responsable de la curación de lesiones (Montealegre, 2012; Turner, 2012).

## **1.2. Plantas Medicinales**

Las plantas medicinales contienen en mayor o menor proporción principios activos, el cual va a brindar la acción farmacológica, tienen como objetivo inducir una acción en el organismo, pueden

ser metabolitos primarios y secundarios; los estudios se encuentran direccionados en los metabolitos secundarios.

Los principios activos se encuentran en hojas, flores, tallos, fruto, raíces y semillas. Las hojas son ricas en heterósidos y alcaloides, el tallo pueden poseer los principios activos en la corteza o en la albura. La raíz extrae el agua junto con sales minerales del suelo y la bombea hacia las hojas, acumula a menudo azúcares, otras veces vitaminas y alcaloides; la flor contiene principios activos sobre todo es rica en pigmentos. El conjunto de pequeñas hojas y pedúnculos florales constituye las sumidades florales. Los frutos carnosos constituyen una reserva de vitaminas, ácidos orgánicos y azúcares. (Carrión, A y García, C, 2010, p.633).

### **1.3. Extracción de materias primas vegetales**

Para la elaboración de formas farmacéuticas a base de material vegetal se debe tomar en cuenta que existen diferentes métodos para extraer las sustancias activas contenidos en dichas plantas, los cuales necesitan de un líquido extractivo que va a depender de la escala de producción, de la naturaleza, calidad de la materia prima, del procedimiento técnico, naturaleza del solvente y de la naturaleza química del principio activo. (Carrión, A y García, C, 2010, p.633).

#### ***1.3.1. Métodos de Extracción***

##### ***1.3.1.1. Percolación***

El método de Percolación se encuentran descritos en la mayoría de Farmacopeas (Valverde, 2000, p.41).

Es un método que consiste en pasar el solvente a través de la droga, hasta una extracción exhaustica completa, donde el solvente (generalmente alcohólico o mezcla hidroalcohólico) atraviesa la masa de droga pulverizada siempre en un solo sentido, alcanzando concentraciones crecientes de tal modo que el equilibrio entre el solvente dentro y fuera del marco nunca se alcanza, por lo que la droga bañada siempre por nuevas proporciones de mensturo acaba por ceder todos sus componentes solubles de manera progresiva (Selles citado en Carrión, A y García, C, 2010, p.648).

Éste tipo de extracción se realiza en recipientes denominados percoladores, pueden ser cilíndricos o cónicos que poseen dispositivos de carga y descarga, lográndose una extracción total de los principios activos (95% de sustancias extraíbles); se debe tomar en cuenta que el tiempo en el que la droga permanece en contacto con el solvente y la relación existente entre la droga y el líquido extractivo (cantidad de disolvente), son dos factores decisivos dentro de la percolación.

Cabe recalcar que antes de realizar la extracción es necesario humectar la droga con el disolvente, permitiendo su esponjamiento con el fin de facilitar la entrada del solvente en las membranas celulares durante la percolación (Selles citado en Carrión, A y García, C, 2010, p.638).

### *1.3.1.2. Maceración*

La Maceración consiste en poner en contacto la droga y el solvente, durante varios días. Se trata de un proceso que da como resultado un equilibrio de concentración entre la droga y el solvente, va a depender de factores relacionados a la droga, por ejemplo: su naturaleza, su contenido de humedad y cantidad, el tamaño de partículas y factores que están relacionados con el solvente, por ejemplo: selectividad y cantidad (Valverde, 2000, p.41).

El hinchamiento de la droga es un factor importante, ya que aumenta la permeabilidad de la pared celular y la difusión del solvente (Valverde, 2000, p.41).

Es el procedimiento de extracción más simple, al conjunto de droga más el solvente se lo protege de la luz, para evitar posibles reacciones y debe agitarse continuamente (tres veces por día, aproximadamente); el tiempo de maceración es diverso, las distintas Farmacopeas prescriben tiempos que oscilan entre cuatro y diez días (Selles citado en Carrión, A y García, 2010, p.600).

“Cuanto mayor sea la relación entre el líquido extractivo y la droga, tanto más favorable será el rendimiento” (Voigt citado en Carrión, A y García, C, 2010, p.548).

### *1.3.1.3. Decocción*

Denominado también cocimiento, este método consiste en llevar a la mezcla de droga más el solvente a la temperatura de ebullición del agua, manteniendo esta temperatura durante un período variable que suele oscilar de 15 a 30 minutos (Selles citado en Carrión, A y García, 2010, p.633).

### *1.3.1.4. Infusión*

Se somete a la droga previamente humedecida al contacto con el solvente a una temperatura igual a la de ebullición del agua por 5 minutos, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se prepara al 5% (Carrión, A y García, C, 2010, p. 29).

### *1.3.1.5. Digestión*

“Es una maceración realizada a una temperatura suave que oscila alrededor de los 50 o 60° C” (Selles citado en Carrión, A y García, C, 2010, p. 29).

Al aumentar regularmente la temperatura se consigue un mayor rendimiento de la extracción, puesto que disminuye la viscosidad del solvente lo que hace que éste pueda ingresar más rápidamente al interior de las células y así extraer los principios activos.

## *1.3.2. Extractos*

Al extracto podemos considerarlo como un tipo de maceración, donde el solvente de extracción es una mezcla de diferentes solventes, en el cual se disuelve las sustancias activas que se encuentran presentes en las plantas medicinales. O de otra manera podemos mencionar que es el poder de una Planta Vegetal (Darr, A. <http://www.laboratorio.takiwasi.org>).

Encontramos diferentes extractos según la consistencia y la concentración de sustancia activa y se pueden clasificar en extractos fluidos, secos, blandos y los crioextractos (Voigt citado en Carrión, A y García, C, 2010, p. 29).

### ***1.3.3. Fitoterapia***

La fitoterapia desde el punto de vista etimológico se relaciona a la Terapéutica con las plantas, dicho en otras palabras es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico, pero existen limitaciones puesto que no responde a la realidad del uso de la definición Fitoterapia en el contenido de la terapia actual (Salvador, C, 2002, pp. 101-103).

## **1.4 La Piel**

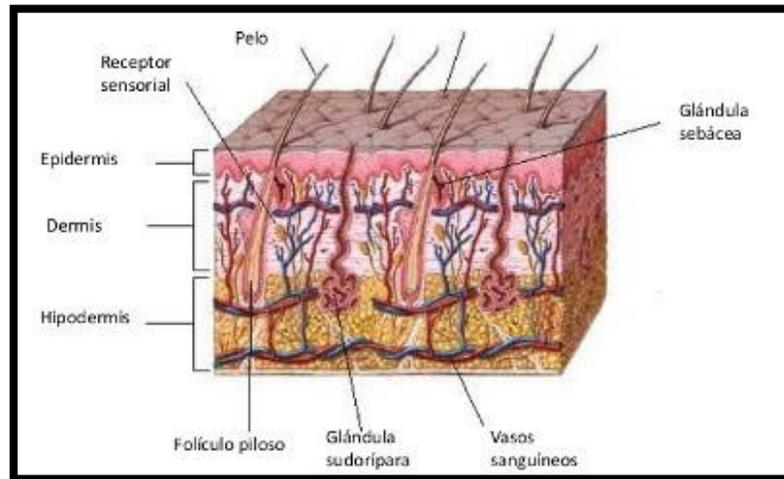
La piel es un órgano importante del cuerpo humano ya sea por el tamaño como también por las funciones que cumple, separa al organismo del medio ambiente externo y permite su comunicación con el mismo.

La piel tiene una superficie de alrededor de  $2\text{m}^2$  (depende de la altura y peso de la persona) y un peso de 4 kg, lo que supone aproximadamente el 6% del peso corporal total (Pérez, C y Noriega, A 2011, p. 1).

Es un órgano autosuficiente, es una barrera semipermeable contra agresiones mecánicas, tóxicas, químicas, frío, calor, radiación ultravioleta y microorganismos nocivos, que depende del riego sanguíneo y linfático, desempeñan actividades peculiares estas incluyen: producción de queratina, sebo, sudor y melanina, además de recambio de calor y protección. Al igual que otros órganos, efectúa las funciones especializadas que participan en percepción de sensaciones, reparación de heridas, defensa inmunológica e inflamación, actividad enzimática, circulación de sangre y linfa, etc (Pérez, C y Noriega, A, 2011, p. 1).

Desde el exterior hacia el interior se puede distinguir tres capas de tejido, como es la epidermis, la dermis y por último el tejido subcutáneo o hipodermis. (**Figura 1-1**).

Además se considera parte de la piel a aquellos órganos anexos a la misma como son las uñas, pelo y glándulas diversas (Pérez, C y Noriega, A, 2011, p. 1).



**Figura 1-1.** Estructura de la piel

Fuente: VidaNaturalia, 2012.

#### ***1.4.1. Epidermis***

La epidermis es un epitelio escamoso, estratificado y queratinizado, cubre la totalidad de la superficie corporal. Esta capa tiene mayor número de células, tiene un espesor variable (0.1 mm aproximadamente), alcanzando 1.5 mm en la planta del pie y en la palma de las manos (Pérez, S. 2013, p. 6).

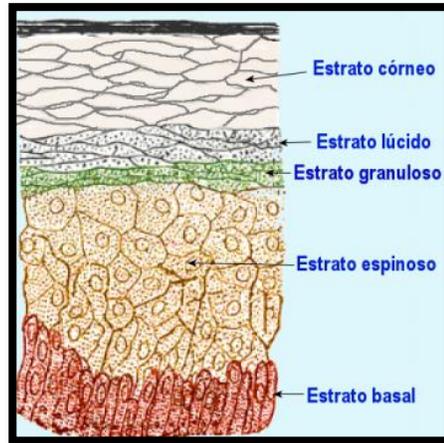
Está compuesta por cinco capas (**Figura 2-1**), desde el exterior hacia el interior son:

**Capa córnea (Estrato córneo).**- Está formado por células aplanadas y resto de células que se encuentran situadas unas sobre otras en forma de tejas y fuertemente empaquetadas, los cuales han perdido su núcleo y orgánulos citoplasmáticos quedando filamentos de queratina formando haces monofilamentos. Se encuentra formado por 15 a 20 estratos celulares, de estos el último se va perdiendo por descamación. El proceso de desgastes y reemplazo renueva totalmente la capa epidérmica aproximadamente en 30 días (Pérez, S. 2013, p. 6).

- **Capa granular (Estrato granuloso).**- Constituye la capa córnea y comprende ya a células muertas. Las células sintetizan la queratohialina (precursora de la queratina), se acumulan en gránulos en el citoplasma es por ello la denominación a esta capa (Pérez, C y Noriega, A, 2011, p. 8).
- **Capa de células espinosas (Estrato espinoso).**- La capa está conformada por células vivas, se reproducen por división mitótica. Las células espinosas ocupan el espacio de células erosionadas en la capa córnea y se les llama juntamente capa germinativa (Pérez, C y Noriega, A, 2011, p. 6).
- **Capa basal (Estrato basal).**- De la misma forma que la capa espinosa va a formar parte de la capa germinativa (Pérez, C y Noriega, A, 2011, p. 6).
- **Capa lúcida (Estrato lúcido).**- Se encuentra entre la capa córnea y la granular, se encuentra generalmente en la parte gruesa de la piel tanto de las palmas de las manos y plantas de los pies, esta capa no existe en la piel delgada (Pérez, C y Noriega, A, 2011, p. 7).

La epidermis está formado por queratinocitos (sintetiza queratina). La queratina presenta una fuerte resistencia a la degradación enzimática. Los queratinocitos constituyen el 80% de las células epidérmicas, son sustancias de naturaleza proteica y fibrosa, resistente, protege a la piel del calor, agentes químicos y microorganismos, además se encuentran células como:

- **Melanocitos.**- Son células que producen melanina (pigmento que da color a la piel), protección de los rayos ultravioleta el cual es muy nocivo (Pérez, C, 2013, pp. 9-11).
- **Células de Langerhans.**- Se derivan de la médula ósea, migran a la epidermis y forma parte del sistema inmunitario (Pérez, C, 2013, pp. 9-11).
- **Células de Merkel.**- Son células sensoriales que participan en funciones táctiles (Pérez, C, 2013, pp. 9-11).



**Figura 2-1.** Estratos de la piel  
**Fuente:** Biblioteca Histológica Piel y Anexos, 2015.

### 1.4.2. Dermis

La dermis cumple la función de soporte, resistencia y elasticidad a la piel, se encuentra formado de tejido conectivo fibroelástico. La matriz extracelular contiene una elevada proporción de fibras, de colágeno, elastina y reticulina. Constituye la mayor masa de la piel y su grosor es de 5 mm aproximadamente y es un depósito de agua, sales y electrolitos (Pérez, C y Noriega, A, 2011, p. 8).

Histológicamente se dividen en las siguientes capas:

- **Capa papilar.-** La capa papilar presenta proyecciones hacia el interior de la epidermis denominado papilas dérmicas. Además contiene terminaciones nerviosas, receptores sensoriales y vasos linfáticos (Pérez, C y Noriega, A, 2011, p. 6).
- **Capa reticular.-** Esta capa es más gruesa que la papilar está constituida de tejido conectivo denso irregular con fibras elásticas el cual proporciona elasticidad y capacidad de adaptación a movimientos y cambios de volumen. Contiene a la mayoría de anexos de la piel, la capa se encuentra atravesada por vasos sanguíneos y nervios en el cual están asentadas las glándulas sebáceas y sudoríparas como también los folículos pilosos (Pérez, C, 2013, p. 22).

#### *1.4.2.1. Células de la dermis*

Comprende los fibroblastos, macrófagos, mastocitos o células cebadas, linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y monocitos (Pérez, C y Noriega, A, 2011, p. 8).

#### *1.4.2.2. Anexos de la piel*

Los anexos cutáneos son estructuras especializadas, tiene como función proteger al organismo, son uñas, pelo, glándulas sebáceas y sudoríparas.

##### *1.4.2.2.1. Pelo*

El pelo son estructuras queratinizadas que se encuentran en la mayor parte de la superficie de la piel, tiene dos partes diferenciadas:

- **Tallo.-** En un corte transversal, se aprecian tres capas como es la medula del pelo, la corteza o región mayor y la cutícula, también se encuentran células epidérmicas (Pérez, C y Noriega, A, 2011, p. 8).
- **Raíz o folículos piloso.-** constituye la parte inferior se encuentran células epidérmicas que dan origen al pelo y rodean a la papila dérmica que contiene capilares y nutre a las células epidérmicas, entre estas células se encuentran melanocitos que dan el color respectivo al cabello (Pérez, C y Noriega, A, 2011, p. 8).

##### *1.4.2.2.2. Glándulas sebáceas*

Las glándulas sebáceas son halocrinas los cuales producen lípidos que ayudan a conservar el manto hidrolipídico de la piel. Se encuentran localizadas en toda la piel excepto en palmas y plantas (Pérez, C y Noriega, A, 2011, p. 9).

##### *1.4.2.2.3. Glándulas sudoríparas*

Las glándulas forman un glomérulo en su extremo. Existen dos tipos de glándulas y son:

- **Ecrinas.-** Su función es controlar la temperatura y además es responsable de la producción de sudor, hay una mayor cantidad en palmas de las manos y plantas de los pies (Pérez, C y Noriega, A, 2011, p. 8).
- **Apocrinas.-** Tiene como función producir secreciones olorosas, se encuentran en regiones genitales y axilas (Pérez, C y Noriega, A 2011, p. 9).

#### *1.4.2.2.4. Uñas*

Las uñas brindan protección a la región distal de los dedos, es una defensa y se podría asemejar a una pinza para manejar objetos pequeños. La lámina ungueal es la estructura más visible de las uñas, está formado por queratina y fuertemente adherida al lecho ungueal. La matriz ungueal es la parte germinativa, aquí se encuentra células basales que se dividen continuamente (Pérez, C y Noriega, A 2011, p. 9).

#### *1.4.3. Hipodermis*

Esta capa está formada de tejido conectivo laxo y la mayoría de sus fibras se fijan a la de la dermis respectivamente, formando franjas de anclaje, es así como se fijan las estructuras subyacentes a la piel.

El espesor de la hipodermis depende de la localización, peso corporal, sexo o la edad. La hipodermis está formada por tejido adiposo (grasa subcutánea). El tejido subcutáneo sirve de almacén de energía, además es un aislante térmico y protector mecánico frente a golpes (Pérez, C y Noriega, A 2011, p. 8).

### **1.5. Cicatrización de las heridas**

#### **La herida**

La herida es una lesión traumática de la piel y mucosas, afecta de forma variable a estructuras adyacentes. Es una interrupción de la integridad tisular por diferentes formas causales externas e internas. Pueden clasificarse por el tiempo de curación: agudas es un proceso de reparación ordenado, se curan sin problema y en corto tiempo y la herida crónica tarda más tiempo en curar y

pueden tener complicaciones. El origen de las heridas son internas y externas, las primeras son resultado de las funciones inmunológico y nervioso con discapacidad del suministros de oxígeno o nutrientes a esa zona y la herida externa suelen ser causados por objetos penetrantes o no penetrantes (Espino Carlos, 20012, p. 2) (Borger, A, pp. 15-30) (Salem Christian, et al., 2000, p. 90-99).

La cicatrización es una sucesión integrada, continua y dinámica de fenómenos celulares, fenómenos hormonales y moleculares que se activan en el momento de la lesión y da como resultado la reparación tisular, la cicatrización tiene como finalidad restaurar la integridad física por medio de la formación de tejido fibroconectivo; conduce a la regeneración de epitelio y reemplazo de la dermis por un tejido fibroso constituidas por fibras colágenas, con características diferentes a las normales (Divins, 2010, pp. 36-39).

La piel está expuesta a diferentes agresiones durante todo el tiempo, allí es donde los productos farmacéuticos son los indicados para optimizar el tiempo de cicatrización. Existen además otros tipos de lesiones que sufre la piel como es el frío, sol, depilaciones, jabones, etc., estos factores desequilibran la estructura de la misma (Divins, 2010, pp. 36-39).

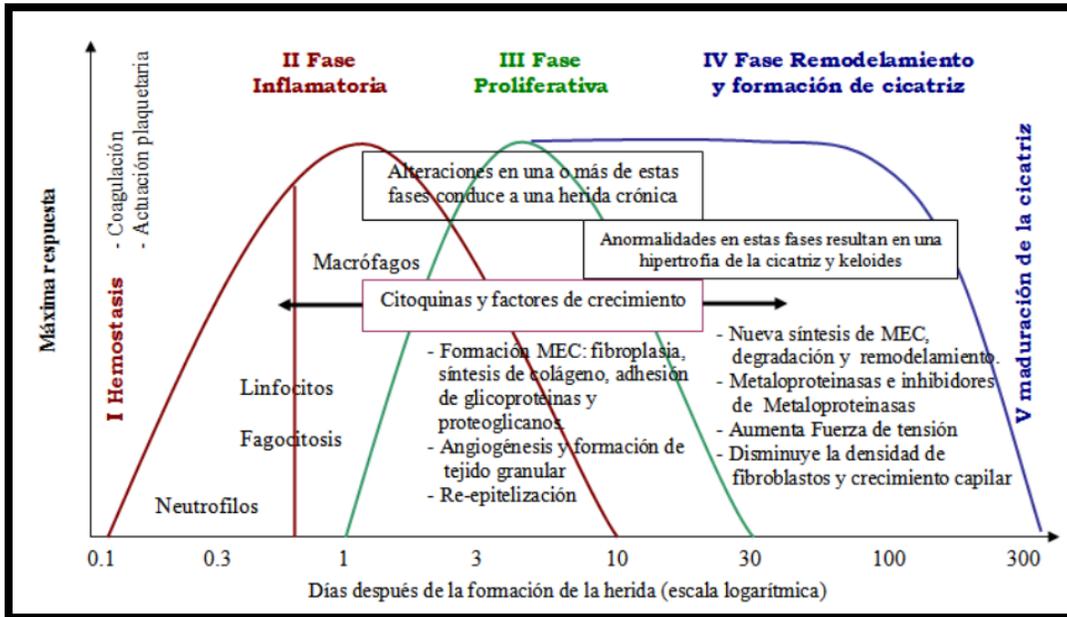
### ***1.5.1. Proceso de cicatrización en la Piel***

La piel es un órgano autosuficiente, una barrera semipermeable, que depende del riego sanguíneo y linfático, desempeñan actividades peculiares estas incluyen: producción de queratina, sebo, sudor y melanina, además de recambio de calor y protección. Al igual que otros órganos, efectúa las funciones especializadas que participan en percepción de sensaciones, reparación de heridas, defensa inmunológica e inflamación, actividad enzimática, circulación de sangre y linfa, etc.

El proceso de cicatrización en heridas provocadas por diferentes formas causales requiere de varias fases, se encuentran ligadas una de otra y no se encuentran bien delimitadas (**Figura 3-1**). Después que se presenta una ruptura en la integridad epitelial de la piel que puede estar sumado de la disrupción de la estructura y función del tejido, rápidamente ocasiona un proceso de reparación en donde se involucra las siguientes fases:

- Fase de hemostasis y coagulación
- Fase inflamatoria
- Fase de proliferación

- Fase de maduración (Chen, J, 2007, pp. 9-18)



**Figura 3-1.** Fases del proceso de cicatrización

**Fuente:** Enoch y Leaper, 2005.

### 1.5.1.1 Fase de hemostasia y coagulación

Esta fase inicia rápidamente después de darse la lesión; dura aproximadamente 15 minutos. Tiene como objetivo primordial evitar la pérdida de flujo sanguíneo mediante el cese de la hemorragia y formación del coágulo. Esto permite proteger al sistema vascular y el correcto funcionamiento de los órganos vitales (Guarin, 2013; Landínez 2013; Quiroga 2013, pp. 441-443).

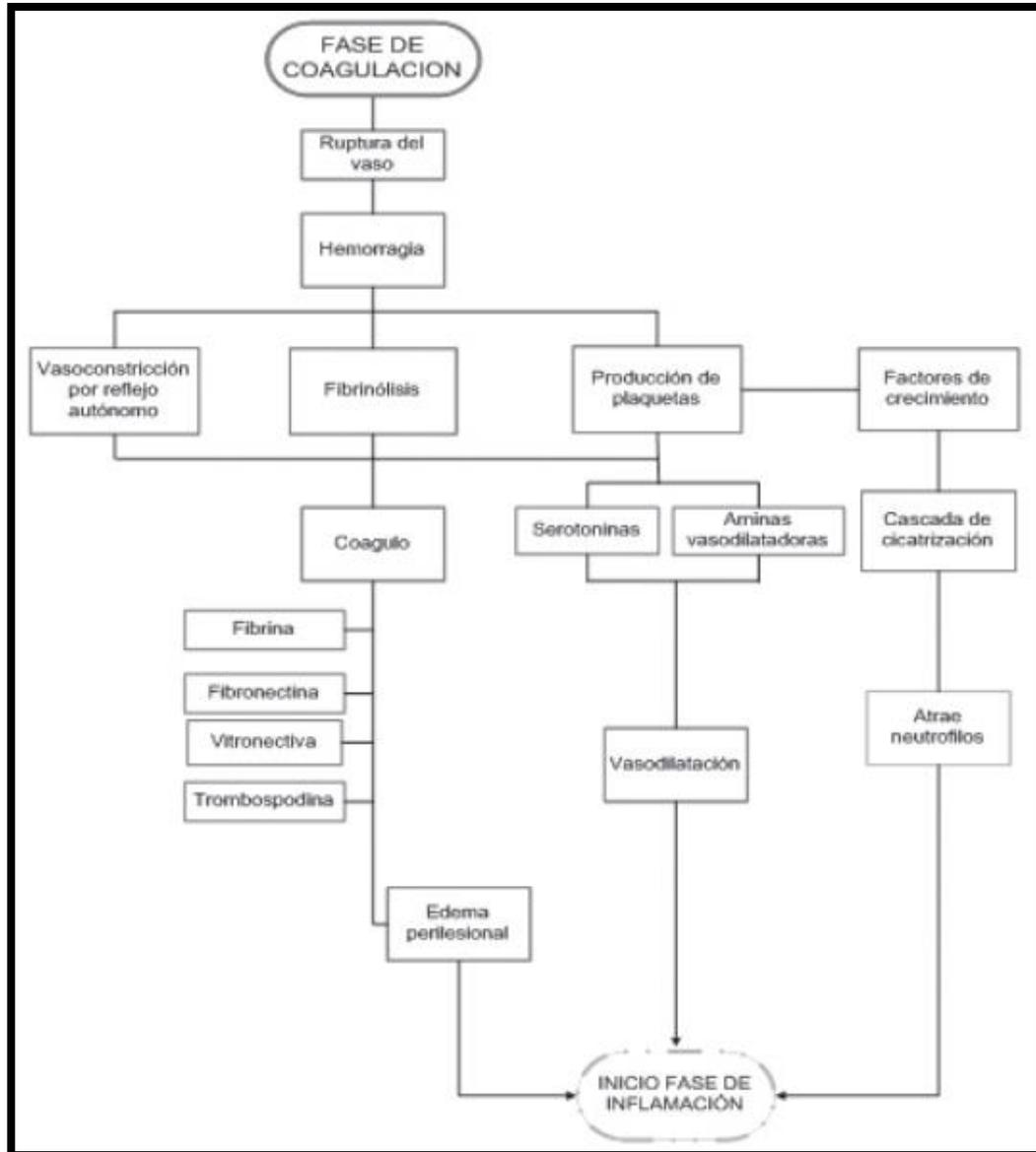
En esta fase son atraídos los granulocitos, neutrófilos y monocitos a nivel de la herida; la proliferación bacteriana estimulada por inmunoglobulinas, alcanzando un valor máximo de granulocitos entre 12 y 48 h. sucesivas a la generación de la herida y produciendo una disminución después de 3 días tras la contaminación bacteriana ha sido eliminada.

Durante esta fase se presentan diferentes factores de crecimiento como son: factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), los factores plaquetarios, factores transformadores del crecimiento  $\beta$  (TGF  $\beta$ ), proteasas, leucotrienos (LT), histamina y citoquinas. Estos factores hacen parte de la respuesta inmunológica y además liberan diferentes cascadas de inflamación que ayudaran a las posteriores fases de cicatrización.

Una vez formado el coágulo y la respuesta vascular, la herida sujeta un buen número de elementos listos para combatir la migración microbiana, también eliminar agentes extraños. Es aquí donde favorece la restauración de los tejidos.

La formación de coágulo tiene como funciones específicas de activación celular como también de mediación y andamiaje para las células que originan la fase de inflamación y regeneración del tejido. (**Figura 4-1**) (Guarin, 2013; Landínez 2013; Quiroga 2013, pp. 441-443).

Posteriormente, después de estas fases los monocitos declinan y los macrófagos predominan (Enoch, 2005).



**Figura 4-1:** Fase de coagulación

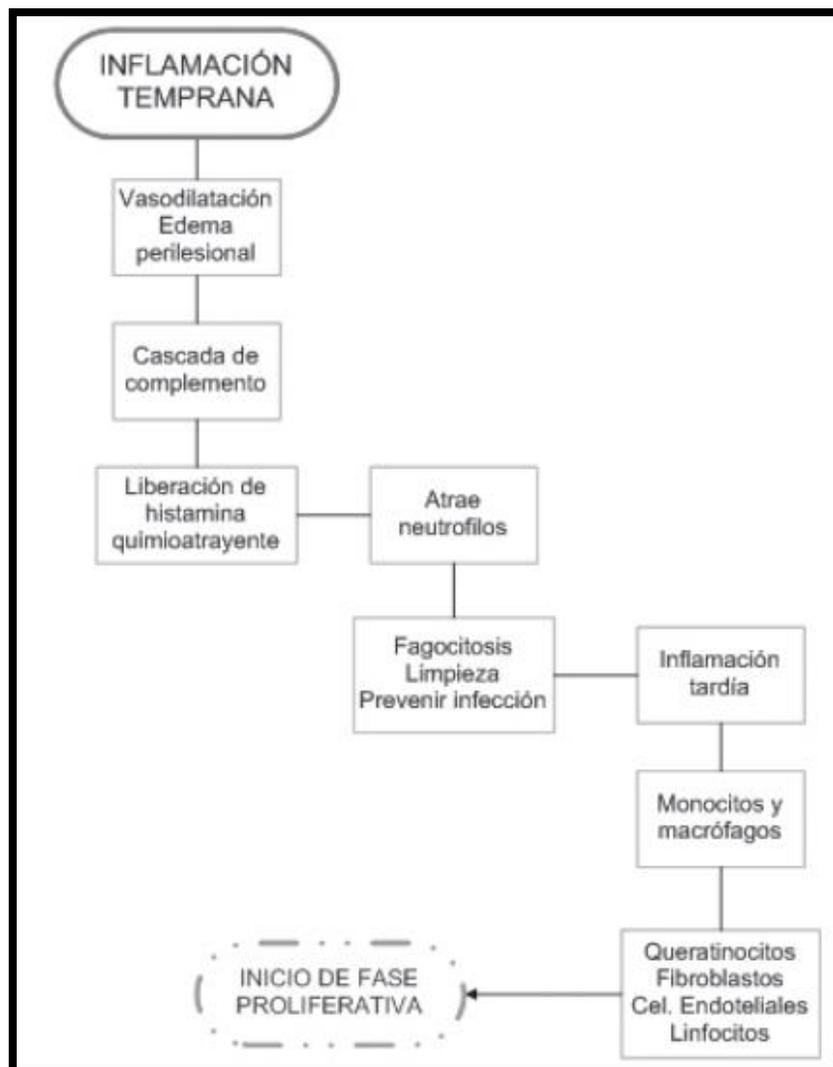
Fuente: Guarín, Landínez y Quiroga, 2013.

### 1.5.1.2. Fase de Inflamación

El proceso de inflamación es una reacción de defensa local, del sistema inmunológico de un organismo, ocurre un perjuicio causados a las células y tejidos vascularizados ya sea por diferentes agentes causales como patógenos bacterianos u otros agresores de naturaleza física, química o biológica. La inflamación es debidamente una respuesta restauradora, este proceso envuelve un gran gasto de energía metabólica. La respuesta de fase aguda al proceso de inflamación está

caracterizada por un cuadro clínico leve por ejemplo: el malestar, alteración del perfil de proteínas y leucocitos, fiebre, inflamación aguda localizada va a ocasionar una reacción orgánica general. (Chen, J, 2007, pp. 9-18)

La inflamación inicia al minuto 16, dura hasta 6 días; es una respuesta protectora e intenta destruir a los agente que representan un peligro para el tejido. Sin la eliminación de las células afectadas no se generaria la formación del tejido nuevo, esta formación o activación se da con la ayuda de los queratinocitos y fibroblastos. (**Figura 5-1**) (Guarin, C, et al, 2013, pp. 441-443).



**Figura 5-1:** Fase de Inflamación Temprana

Fuente: Guarín, Landínez y Quiroga, 2013.

### *1.5.1.3. Fase de proliferación*

El objetivo en esta fase es generar una barrera protectora con la finalidad de incrementar los procesos regenerativos e impedir el ingreso de agentes peligrosos.

La inflamación se caracteriza por la activación de dos procesos como son:

- Angiogénesis
- Migración de fibroblastos

Estos dos grandes procesos proporcionan la formación de una matriz extracelular (MEC) provicional, que suministra un armazon para la síntesis de una MEC madura y migración celular.

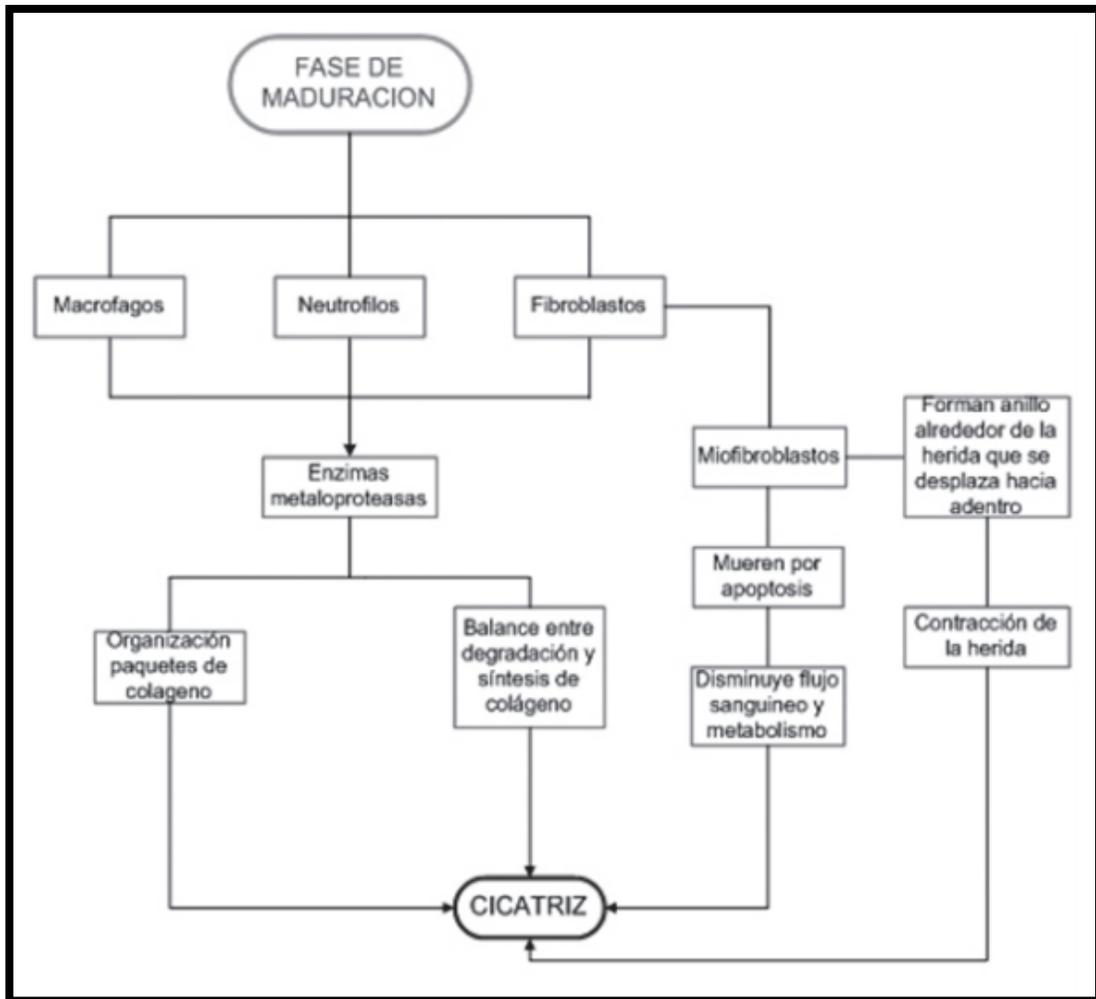
Durante esta fase se crea la barrera permeable como es la reepitelización, el restablecimiento del flujo sanguíneo, oxígeno y reforzamiento del tejido dermal (Chen, J, 2007, pp. 9-18).

Durante esta etapa se presenta la migración de fibroblastos y formación del tejido granular. Se da una proliferación de los fibroblastos los cuales producen sustancias esenciales para la reparación de las heridas que contienen glicosaminoglicanos (GAG) y colágeno. Las glicosaminoglicanos juegan un papel importante en la deposición y agregación de fibras como es fibrina, colágeno, fibronectina y ácido hialuronico el cual está ligado a la fuerza de tensión del sitio (Chen, J, 2007, pp. 9-18).

### *1.5.1.4. Fase de Maduración*

La fase de Maduración se caracteriza por la formación, organización y proliferación que obtiene el tejido al desarrollarse la cicatriz, lo cual se obtiene de la contracción de la herida formada por los miofibroblastos y la organización de los paquetes de colágeno. Esta fase inicia al mismo tiempo con la síntesis de la matriz extracelular y puede durar entre 1 o 2 años dependiendo de las características de la herida (**Figura 6-1**).

En esta fase disminuye la actividad de las metaloproteinas y aumenta la actividad de los inhibidores de las mismas, reducción de la densidad de macrófagos y fibroblastos al igual que se detiene la migración de factores de crecimiento desde los capilares, disminuye el tamaño de la herida y crece la fuerza de contracción del tejido. Dentro del tejido formado por colágeno, elastina y otros componentes de la matriz extracelular se cierra la herida y permite la maduración de la cicatriz. (Enoch, 2005, <http://www.wjmer.co.uk/downloads>).

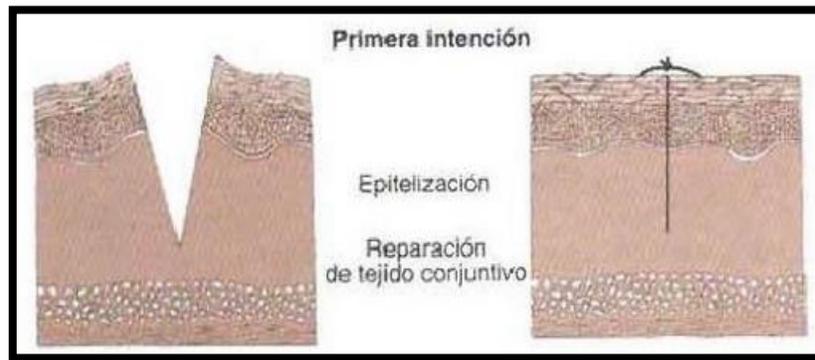


**Figura 6-1:** Fase de Maduración

Fuente: Guarín, Landínez y Quiroga, 2013.

## 1.5.2. Formas de Cicatrización

### 1.5.2.1 Cicatrización por primera intención

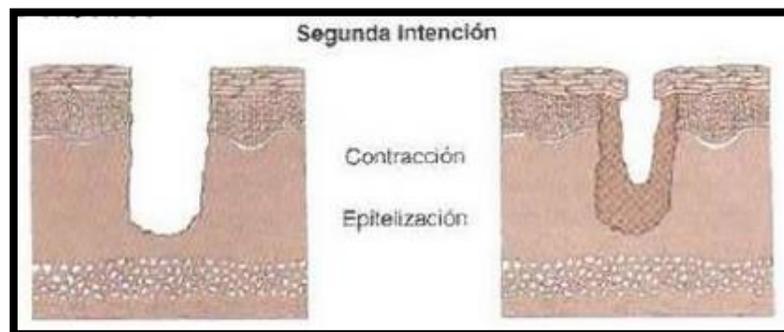


**Figura 7-1:** Cicatrización por primera intención

Fuente: Custodio Jesús, 2012.

La cicatrización por primera intención produce cuando el tejido es incidido por un corte aséptico, su recuperación se produce sin complicaciones y la reparación del tejido es pequeña.

### 1.5.2.2. Cicatrización por segunda intención



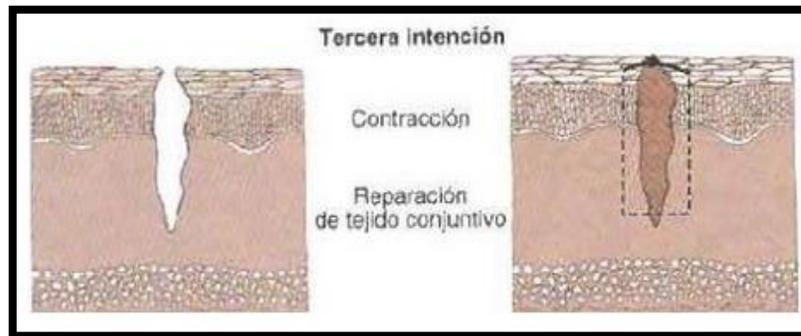
**Figura 8-1:** Cicatrización por segunda intención

Fuente: Custodio Jesús, 2012.

Ocurre un proceso de cicatrización prolongado y complejo. Es ocasionado por agentes infecciosos, traumas excesivos con pérdida de tejido o aproximación imprecisa de los tejidos, llamado espacio muerto cerrado el cual va a permitir una cicatrización desde los planos más inferiores hacia la

superficie. El proceso de cicatrización es lento. En esta forma de cicatrización tenemos a la mayor parte de heridas, también producidas por quemaduras.

### 1.5.2.3 Cicatrización por tercera intención



**Figura 9-1:** Cicatrización por segunda intención

**Fuente:** Custodio Jesús, 2012.

Ocurre cuando dos superficies de tejido están juntas. Este método llamado cierre primario retardado es para heridas contaminadas, heridas traumáticas infectadas con gran pérdida de tejido y alto riesgo de infección. En este tipo de lesiones se trata desbridando los tejidos no viables y dejando la herida abierta, el cual se gana gradualmente suficiente resistencia a la infección, el cual permitirá un cierre complicado. Existe una baja probabilidad que se infecte la herida mientras permanezca abierta, en comparación a la herida que ha sido cerrada de forma primaria (Rivera, V. 2002, <http://www.medicosecuador.com>).

## 1.6. Vegetal *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca)

La denominación *Bauhinia* es en honor a los Botánicos suizos del siglo XVI Juan y Gaspar Bauhin, en una clara analogía con las hojas bilobuladas, las flores de esta especie tiene un semejante a las flores de orquídea de ahí el nombre en inglés “orchid tree “. Los nativos sudamericanos antiguamente empleaban la infusión de sus hojas para lavar y cicatrizar heridas, y por vía interna como diurético, antiinflamatorio, digestivo y expectorante (Alonso, J, 2004, pp. 875-876).



**Figura 10-1.** Vegetal *Bauhinia tarapotensis* Benth (Pata de Vaca)  
 Fuente: Infojardín, 2003.

### 1.6.1. Taxonomía



**Figura 11-1.** Taxonomía del vegetal *Bauhinia tarapotensis* Benth  
 Fuente: Herbario Forestal UDBC, 2004.

**Tabla 1-1:** Taxonomía de la especie *Bauhinia tarapotensis* Benth (Pata de Vaca).

<b>NOMBRE CIENTÍFICO</b>	<i>Bauhinia tarapotensis</i>
<b>FAMILIA</b>	Leguminosas
<b>GÉNERO</b>	<i>Bauhinia</i>
<b>ORDEN</b>	Fabales
<b>AUTOR</b>	Benth
<b>FECHA DETERMINACIÓN</b>	1972

**Fuente:** Colecciones en Línea del Herbario MEDEL, 2012.

**Realizado por:** Chaglla, Jimena, 2015.

*Bauhinia tarapotensis* Benth (Leguminosas), es un pequeño árbol que crece en Ecuador, específicamente en la Amazonía, se le conoce con el nombre popular “Pata de Vaca”. Podemos encontrar esta especie en toda Sudamérica por ejemplo al Sur de Brasil, Argentina subtropical, Paraguay, Bolivia y Uruguay, en Colombia lo podemos encontrar en bosques secundarios de la Amazonía (Fortunato y Wunderlin).

Algunas especies son de clima semi-árido, húmedo o semi-húmedo. Crecen en suelos pobres, ácidos (Geilfus & Bailon, 1994, p.511).

Además se lo reconoce con las siguientes denominaciones: Pata de vaca, Pezuña de vaca, Falsa caoba, Caoba del País, Caubá, Árbol de las orquídeas (Plantasparacurar, 2012).

El árbol “Pata de Vaca” presenta una altura aproximada a los 6-12 m y sus ramas se expanden de 3-6 m de diámetro, sus hojas de forma lobulada son de 10-15cm de ancho. Sus flores son grandes de color blanquecino que aparecen en primavera y verano; en cuanto a su fruto es una legumbre de 15 cm de largo por 2 cm de ancho, con semillas de color negra y aplanada que se encuentran en el interior de la legumbre (Fortunato, A y Wunderlin, J, <http://cauba.fcien.edu.uy>).

### ***1.6.2. Propiedades Terapéuticas***

Las Especies *Bauhinia* se encuentran muy bien distribuida en todo el mundo, existen 300 especies de *Bauhinia*, 200 se encuentran en Brasil. Dentro de sus propiedades terapéuticas tenemos:

- Cicatrizantes
- Propiedades hipoglucemiante
- Diuréticas
- Antiinflamatoria
- Diarreicas
- Antisépticas

Estudios realizados anteriormente demuestran que la familia de *Bauhinia* es utilizada para problemas de diabetes, antiinflamatorio, antibacterial y antioxidante, además de acuerdo a estudios fitoquímico demuestran que es factible en la curación de heridas (Montealegre 2012; Turner 2012).

Otros usos de la especie *Bauhinia sp.*, se le ha asignado un uso potencial como fijadora de nitrógeno, protectora y recuperadora de suelos. Son utilizadas para alimentar animales domésticos y silvestres, para sacar carbón y leña, ornamentación (Terranostra, 2009, <http://terranostra-terranostra.blogspot.com>) (Chamarro,D. p. 18.).

### **Composición Química**

Estudios anteriores nos indican que químicamente este género presenta metabolitos secundarios como saponinas, taninos, trigonelina, terpenoides, trazas de fenoles y alcaloides, flavonoides (rutina, quercetina, kaempferitrina), Antocianidinas, esteroides ( $\beta$ -sitosterol), glucósidos esteroidales (xilopiranosido, ribofuranósido del clionasterol), proteína (0.59%), minerales (potasio, calcio, hierro, magnesio, zinc y cobre), bausplendina, flavonas, un diaroilmetano, flavanonas (Alonso,J., 2004) (Muñoz et al. 2004, pp. 57-58 ).

## **1.7. Metabolitos secundarios que intervienen en la cicatrización**

### ***1.7.1. Derivados Fenólicos***

Los compuestos fenólicos contienen un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, y que ocurren frecuentemente como glicósidos, combinados con unidades de azúcar. Son relativamente polares y son solubles en agua; pueden ser detectados por el intenso color verde, púrpura, azul o negro, que producen cuando se les agrega una solución acuosa o alcohólica al 1% de cloruro férrico. Conociendo su naturaleza aromática muestran intensa absorción en la región UV del espectro, siendo este método importante para su identificación y análisis cuantitativo (Lock, O, 1998, p. 111).

Los compuestos fenólicos más importantes, entre ellos tenemos:

- Fenoles simples
- Ácidos fenólicos
- Taninos
- Cumarinas
- Lignanós
- Quinonas
- Flavonoides: antocianinas, etc.

#### ***1.7.1.1. Taninos***

Los Taninos son compuestos de origen vegetal, polifenólicos, astringentes y de gusto amargo. Antiguamente se utilizaba para curtir los cueros es decir convertir la piel en cuero. Desde allí es que se ha prestado mucha atención a este metabolito, tiene la capacidad de unirse a macromoléculas como proteínas e hidratos de carbono. Precipitan con sales de metales pesados, proteínas y alcaloides (Carrión, C y García, A, 2010, p.633).

El empleo más antiguo conocido de estas sustancias, como ya se ha comentado, es en la industria de los curtidos. El proceso de curtido se establecen enlaces entre las fibras de colágeno de la piel; los taninos y las macromoléculas se combinan gracias a los grupos fenólicos de los primeros puentes de

hidrógeno formados, a la vez se establecen enlaces covalentes que son los que aseguran que la unión perdure a lo largo del tiempo. Esto requiere que el tanino posea una masa molecular entre límites bien definidos, no demasiado elevada para que pueda intercalarse entre los espacios interfibrilares, ni demasiado pequeña, pues en ese caso no formaría suficiente número de enlaces como para asegurar la estabilidad de la unión (Carrión, C y García, A, 2010, p.633).

#### *1.7.1.1.1. Tipos de Taninos*

Los taninos se dividen en compuestos hidrolizables y condensados:

- **Taninos hidrolizables**

Se conocen también como gálicos o pirogálico. Se hidrolizan con facilidad tanto por ácidos y álcalis como por vía enzimática y son generalmente de formación patológica. Se localizan especialmente en Leguminosae, Fagaceae y Anacardiaceae; en este grupo encontramos los taninos gálicos, que son polímeros de ácido gálico, ésteres de un poliol, generalmente de la glucosa con varias moléculas de ácido gálico, mientras que los taninos elágicos son ésteres de ácido hexahidroxidifénico y sus derivados (Carrión, C y García, A, 2010, p.633).

El ácido hexahidroxidifénico se forma por acoplamiento oxidativo de dos moléculas de ácido gálico. El ácido sikímico es el precursor biogénico del ácido gálico. También hay los llamados taninos complejos que son elagitaninos más o menos modificados (Carrión, C y García, A, 2010, p.633).

- **Taninos condensados o proantocianidinas**

Se conocen también como no hidrolizables, ya que se hidrolizan con dificultad y, por el contrario, el tratamiento con calor y ácidos minerales origina polímeros de alto peso molecular (flobáfenos).

Este tipo de taninos se producen en el metabolismo normal de los vegetales por lo que se consideran fisiológicos y se encuentran ampliamente repartidos en el reino vegetal. Químicamente se forman por condensación de catequinas o catecoles (flavonoles) con uniones directas C-C entre las moléculas, generalmente en 4→8 o en 4→6 y no contienen azúcares en su estructura.

Biogénicamente proceden del metabolismo de los flavonoides, se forman a partir de una flavanona por hidroxilación en el C-3. Para algunos autores existe un tercer tipo de taninos, los florotaninos, que se han aislado de diversas especies de algas pardas y están constituidos por acoplamiento oxidativo únicamente de unidades de floroglucinol C-C y/o C-O. Las propiedades más interesantes de los taninos se deben a su capacidad de combinarse con diversas sustancias formando complejos (Carrión, C y García, A, 2010, p.633).

### **Propiedades de los Taninos**

- **Curación de heridas y cuidados de la piel:** Los Taninos tiene función cicatrizante el cual acelera la curación de las heridas y hemostática. La cicatrización se produce por la formación de las costras al unirse las proteínas con los Taninos e implantar un modelo seco que imposibilita el crecimiento bacteriano. Al constreñir los vasos sanguíneos ayudan a la coagulación de la sangre y por este motivo intervienen en la curación de heridas (Botanical-online, 2015).
- **Detención de la diarrea:** Por la acción astringente que presentan los Taninos, ayuda a contraer los tejidos y seca las secreciones. Resulta muy eficaz en el tratamiento de la diarrea, ayudando en que las deposiciones sean más secas (Carrión, C y García, A, 2010, p.636).
- **Antioxidantes:** Estos compuestos se consideran antioxidantes por la capacidad de eliminar los radicales libres, evitando la aparición de enfermedades degenerativas, como podemos mencionar al cáncer (Carrión, C y García, A, 2010, p.635).
- **Antibacterianos:** Los Taninos priva a los microorganismos del medio apropiado para que pueda desarrollarse (Carrión, C y García, A, 2010, p.634).
- **Antídoto contra los venenos:** Tiene la capacidad de inhibir la absorción de los alimentos en el tubo digestivo, en cuanto a la ingestión de sustancias venenosas, impide que estas sustancias entren en la circulación sanguínea. El ácido tánico se utiliza como contra-veneno ya que precipita las sustancias venenosas de alcaloides y ciertas sales metálicas (Botanical-online, 2015).

- **Colesterol:** Los Taninos disminuyen el colesterol al inhibir su absorción y eliminarlo a través de las heces (Carrión, C y García, A, 2010, p.635).

#### *1.7.1.2. Flavonoides*

Son pigmentos, uno de los grupos más numerosos de la naturaleza y ampliamente distribuidos, se conocen como diez clases de flavonoides, se encuentran generalmente en mezclas como agliconas y/o glicósidos, aún de las diferentes clases siendo este último más común; en muchos casos, debido a la complejidad de la mezcla es más frecuente el estudio de estos compuestos en forma de aglicona en extracto de plantas previamente hidrolizados (Lock, O, 1998, p. 114).

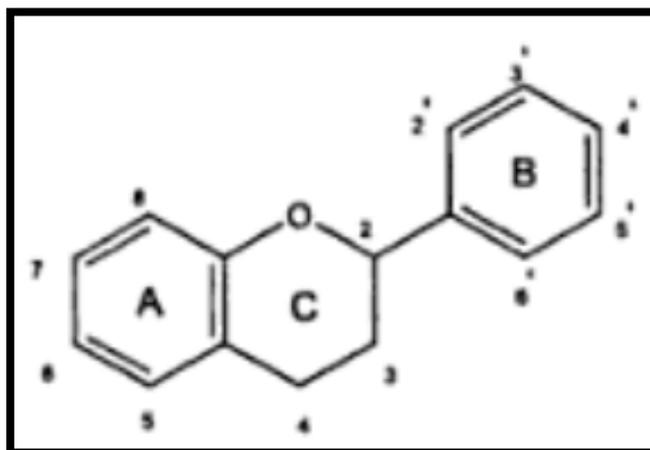
Los flavonoides más comunes son flavonas y flavonoles y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y auronas. Al año 1990 se conocen alrededor de 3000 flavonoides, entre ellos 450 flavonoles, 300 flavonas, 150 isoflavonas, 60 chalconas, 20 auroras, etc. (Lock, O, 1998, p. 114).

Como características generales de estos compuestos debemos señalar su solubilidad en agua y en etanol, su carácter fenólico y su intensa absorbancia en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos y conjugados (Lock, O, 1998, p. 114).

##### *1.7.1.2.1. Estructura*

Los flavonoides contienen quince átomos de carbono en su unidad básica, provenientes de la malonil CoA y del p-cumaril CoA. Están arreglados bajo el sistema  $C_6-C_3-C_6$  con dos anillos aromáticos (A y B) unidos entre sí por una cadena de tres carbonos ciclada a través de un oxígeno (anillo C). Son estructuras hidroxiladas (OH) en el anillo aromático y por lo tanto son estructuras polifenólicas (Carrión, C y García, A, 2010, p.633).

De los tres anillos, el anillo A se biosintetiza a través de la ruta de los policétidos y el anillo B y C proceden de la ruta del ácido shikímico (Carrión, C y García, A, 2010, p.633).



**Figura 12-1:** Estructura molecular base de los Flavonoides  
**Fuente:** Carrión y García, 2010.

Los flavonoides proceden del metabolismo secundario de los vegetales a través de la ruta del ácido shikímico y policétidos. Están ampliamente distribuidos en las plantas superiores, sobre todo en las partes aéreas: hojas, flores, frutos (Liberaong, C, 2015, p. 23).

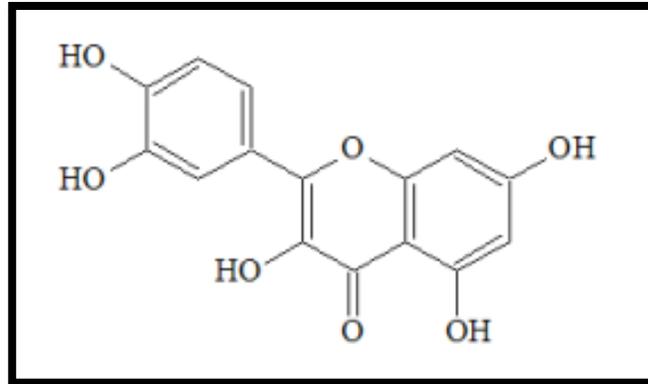
#### *1.7.1.2.2. Clasificación de los Flavonoides*

- Flavanona
- Dihidroflavonol
- Flaván-3,4-diol
- Flavona
- Antocianinas
- Isómero de isoflavona
- Isómero de neoflavona
- Chalcona
- Auroa
- Flavonol

- Flavonol

Dentro de éste grupo se describirá a la Quercetina que es el más importante dentro de este grupo de flavonoles.

### Quercetina



**Figura 13-1:** Estructura química de la quercetina.

Fuente: Carrión, C y García, A, 2010.

La quercetina es un flavonoide que proporciona el color a flores, frutas, hortalizas. Presenta propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antihistamínicas, entre otras. Ofrece una variedad de posibles usos terapéuticos, principalmente en la prevención y tratamiento de las siguientes condiciones:

- **Alergias, el asma y la urticaria:** La quercetina puede inhibir la liberación de histamina de los basófilos y los mastocitos.
- **Cáncer:** Puede ser beneficiosa en el tratamiento de cáncer de piel y puede tener efectos anti-tumor en otros tipos de cáncer.
- **Aftas:** Reduce la frecuencia de las llagas en la boca y produce alivio de los síntomas leves.
- **Diabetes mellitus:** La quercetina podría ayudar a prevenir las cataratas, trastornos de la retina, enfermedades nerviosas y otras complicaciones de la diabetes.

- Promueven la secreción de insulina, aumenta los niveles de vitamina C, protege los vasos sanguíneos, previene moretones con facilidad y apoya el sistema inmune.
- **Infección:** controla la propagación de ciertos virus en el cuerpo.
- **Artritis reumatoide:** ayuda a reducir la destrucción del tejido.
- También puede ser beneficiosa en el tratamiento de la disentería, gota y la psoriasis.

### 1.8. Animales de experimentación

La experimentación con reactivos biológicos viene a partir del siglo XVIII, para ser más preciso viene de la mano del francés René Descartes, su teoría en nuestros días ha perdido totalmente sentido, puesto que su teoría indicaba que los animales no sufrían y de esta forma no habría ningún inconveniente en utilizarlos puesto que Dios los había creado para servir al ser humano.

Con el pasar del tiempo esta teoría errónea cambio y fue superada gracias a los avances científicos que apporto Charles Darwin (Liberaong, C, 2015, p. 23).

El uso de animales de experimentación en el campo de la investigación científica ha sido muy importante en la salud del ser humano. Se realizan experimentos con animales básicamente en tres campos: docencia, industria y la investigación (Animanaturalis, 2015, <http://www.animanaturalis.org>),.

El Decreto Español en defensa de los animales de experimentación, teniendo en cuenta que es un instrumento de trabajo, por su especialidad, en otras palabras la vida de estos seres vivos y su capacidad de sentir obliga a reglar para garantizar su bienestar en los centros que los alojan.

En concreto es el principio de las “tres erres”, refinamiento, reducción y el reemplazo de los animales en los laboratorios.

### ***1.8.1. Ratón (*Mus musculus*)***

Los ratones tienen una longitud de 7-11 cm sin contar con la cola, pueden pesar de 15 a 20 g. Tienen el sentido del olfato muy desarrollado, su visión es muy baja. Por su tamaño pequeño son susceptibles a cambios del medio ambiente, puede llegar a modificar su fisiología y la temperatura corporal.

Los ratones se utilizan porque son de fácil cuidado, tiene muy bajos precios de manutención, gran capacidad reproductiva y tienen una vida relativamente corta por lo que son ideales para ser utilizados en varios ensayos (Cabezas, G. 2014 citado en Medina y Orozco, A, 2013, p. 34).

- **CLASE:** Mammalia
- **ORDEN:** Rodentia
- **FAMILIA:** Muridae
- **GÉNERO:** Mus
- **ESPECIE:** musculus

### ***1.8.2. Macroambientes y Microambientes***

Las condiciones del ambiente y manejo óptimo que aseguren la salud y la comodidad de los reactivos biológicos para que los patrones metabólicos y de comportamiento se mantengan normales y estables. Para obtener resultados acorde a lo esperado.



**Figura 14-1.** Microambientes y Macroambientes

Fuente: Ministerio de Salud Perú. 2008.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1. Lugar de la investigación

El presente tema de investigación se llevó a cabo en los siguientes Laboratorios:

- **Control de calidad de la planta y extracto, tamizaje fitoquímico:** Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- **Cuantificación de metabolitos secundarios:** Laboratorio de Instrumental de la Facultad de Ciencias.
- **Análisis Microbiológico:** Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias.
- **Ensayo de la actividad cicatrizante:** Bioterio de la Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- **Análisis Histopatológico:** Sociedad de Lucha Contra el Cáncer (SOLCA) de la ciudad de Riobamba.

## 2.2. Materiales, equipos y reactivos

### 2.2.1. Material Vegetal

El vegetal *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca) se encuentra ampliamente distribuido en la Región Amazónica de nuestro país, para el estudio el vegetal fue recolectado durante el mes de Marzo en la Parroquia Tarqui de la ciudad de Puyo perteneciente a la Provincia de Pastaza a una altitud media de 790 m del nivel del mar y una temperatura promedio de 30 °C.

La identificación del vegetal se realizó en el Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo el cual está a cargo del Ing. Jorge Caranqui.

Los habitantes del sector reportan que *Bauhinia tarapotensis Benth* más conocida como Pata de Vaca es utilizada como cicatrizante, antiinflamatorio, para combatir la diabetes en forma de infusión.

### 2.2.2. Reactivo biológico

Para la evaluación de la actividad cicatrizante los animales utilizados fueron 24 ratones (*Mus musculus*) (Figura 13-2) los cuales fueron proporcionados por el Bioterio de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias. El reactivo biológico fueron tratados siguiendo las normas básicas aplicables para la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.



**Figura 15-2.** Ratón albino (*Mus musculus*).

Fuente: Nesciencia, 2007.

### **2.2.3. Material farmacológico**

Para la parte experimental de la investigación se empleó crema LAMODERM® como control positivo del Laboratorio Farmacéutico Lamosan. Lamoderm tiene como composición Acetato de Prednisolona y Sulfato de Neomicina.

### **2.2.4. Materiales**

- Vasos de precipitación de 150, 250 mL
- Pipetas volumétricas de 1, 10 mL
- Trípode
- Varilla de agitación
- Reverbero
- Piseta
- Capsulas de porcelana
- Pinza para cápsulas
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Pinza para tubos de ensayo
- Matraces de
- Balones esmerilados de 250 y 500 mL
- Balones aforados de 10 y 25 mL
- Probetas de 50 y 100 mL
- Espátula
- Termómetro
- Puntas plásticas para pipetas
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Picnómetro de 10 mL
- Vidrio reloj
- Guantes, mandil, cofia, cubre zapatos y mascarilla
- Cámara fotográfica
- Jaulas para ratones
- Bebederos para ratones

- Envases estériles ámbar
- Jeringas
- Hisopos
- Bisturí
- Algodón
- Gasas
- Regla
- Cinta

#### **2.2.5. Equipos**

- Balanza analítica
- Molino eléctrico
- Cabina extractora de gases
- pH meter
- Mufla
- Refractómetro
- Espectrofotómetro
- Microscopio
- Rotavapor
- Esterilizador
- Cámara de flujo laminar
- Estufa
- Centrifuga

#### **2.2.6. Reactivos**

- Alcohol potable
- Reactivo para tamizaje fitoquímico
- Agua destilada
- Alcohol antiséptico
- Alcohol 40%
- Reactivos para el Tamizaje

- Formol

## 2.3. Técnicas y Métodos

### 2.3.1. *Recolección del material vegetal*

El vegetal conocido como Pata de Vaca o Casco de Vaca (**Figura 14-2**) en la Parroquia rural Tarqui de la ciudad de Puyo, Provincia de Pastaza, fue recolectado una cantidad suficiente en el mes de Marzo para su posterior investigación. El día de la recolección se consideró una temperatura promedio de 30 °C.

Para la identificación taxonómica del espécimen se tomó una muestra donde incluyan tallo, hojas, flores y en caso de haberlo fruto y se llevó al Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo para su identificación respectiva.



**Figura 16-2.** Recolección del vegetal *Bauhinia tarapotensis*  
Beth (Pata de Vaca)

**Fuente:** Chaglla Jimena, 2015.

### 2.3.2. *Limpieza y desinfección del material vegetal*

En el momento de la recolección del vegetal se seleccionó hojas libre de materias extrañas e impurezas mecánicas. Para la limpieza y desinfección se procedió a realizar los siguientes pasos:

- A las hojas se eliminaron polvo e insectos que estén adheridos y se lavaron repetidas veces hasta completar la limpieza.
- Para la desinfección se utilizó agua clorada y se enjuago con agua destilada para eliminar el cloro (Castro, S., 2015).

## **2.4. Control de calidad del material vegetal**

El material vegetal una vez seco y molido, libre de polvo y material extraño se procedió a realizar las pruebas donde se analizó Humedad, Cenizas totales, Cenizas solubles en agua y Cenizas insolubles en HCl, características organolépticas y parámetros Físico-químicos del extracto según la Guía Normas Ramales de Salud Pública (NRSP 309, 311 y 312).

### ***2.4.1. Determinación del contenido de Humedad***

Para determinar el contenido de agua en el material vegetal se empleó el Método Gravimétrico (pérdida de la masa por desecación) en estufa. (Norma Ramal de Salud Pública (NSRP) 311 “Extractos fluidos y tinturas: Proceso tecnológicos”, 1992; citado en Miranda, M. 2001).

## **Parte experimental**

### **Materiales y Equipos**

- Balanza analítica
- Capsula de porcelana
- Pinza para cápsula
- Estufa
- Desecador (Miranda, M. 2001).

## Procedimiento

Se pesó 2g de muestra vegetal seca y pulverizada con desviación permisible de 0.5 mg, se trasladó a una capsula de porcelana previamente tarada; seguidamente se colocó a la estufa a 105 °C durante 3 horas, posteriormente la cápsula se retiró de la estufa y se introdujo en el desecador, donde se dejó enfriar a temperatura ambiente y se pesó, se colocó nuevamente en la estufa durante 1 hora, volviéndose a pesar hasta obtener una masa constante (Miranda, M. 2001).

## Expresión de los resultados

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

### Dónde:

**Hg** = pérdida en peso por desecación (%).

**M<sub>2</sub>** = masa de la cápsula con la muestra de ensayos (g)

**M<sub>1</sub>** = masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g)

**M** = masa de la cápsula vacía.

**100** = factor matemático

Los valores se aproximan hasta las décimas.

### 2.4.2. Determinación de Cenizas totales

La cantidad de Cenizas Totales se determinó por el Método Gravimétrico (Calcinación). (Norma Ramal de Salud Pública (NSRP) 309 “Droga cruda: Método de ensayo”, 1992; citado en Miranda, M. 2001).

## Parte experimental

### Materiales y Equipos

- Balanza analítica
- Capsula de porcelana

- Pinza para cápsula
- Desecador
- Trípode
- Embudo
- Vidrio reloj
- Papel filtro libre de cenizas
- Mufla
- Reverbero
- Agua destilada
- Ácido clorhídrico al 10% (Miranda, M. 2001).

### **Procedimiento**

Se determinó la masa de 3.0 g del material vegetal seco y pulverizado en una capsula de porcelana previamente tarada. Se calentó suavemente la porción de ensayo aumentando la temperatura hasta carbonizar y posteriormente se incineró en un horno mufla a una temperatura de 700 a 750 °C, durante 2h.

Se enfrió la capsula en un desecador y se pesó. Se repitió el proceso hasta que dos pesadas sucesivamente difieran en más de 0.5 mg por g (masa constante). Para obtener una masa constante los intervalos entre calentamiento y pesada son de 30 minutos (Miranda, M. 2001).

### **Expresión de los resultados**

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

#### **Dónde:**

**C** = porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

**M** = masa del crisol vacío (g)

$M_1$ = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

$M_2$ = masa del crisol con la ceniza (g)

100= factor matemático para los cálculos.

Los valores se aproximan hasta las décimas.

### ***2.4.3. Determinación de Cenizas Solubles en Agua***

Las cenizas solubles en agua es la diferencia en peso entre las cenizas totales y el residuo, después de la determinación de cenizas totales. (Norma Ramal de Salud Pública (NSRP) 309 “Droga cruda: Método de ensayo”, 1992; citado en Miranda, M. 2001).

#### **Procedimiento**

A las cenizas totales obtenidas anteriormente, se añadió de 15 a 20 mL de agua destilada. La capsula de porcelana se tapó e hirvió suavemente al calor del reverbero durante 5min. La solución se filtró a través del papel filtro libre de cenizas, el filtro con el residuo se transfirió a la capsula de porcelana, se carbonizó en un mechero y luego se incinero en un horno mufla de 700-750 °C, durante 2h. Posteriormente se colocó en un desecador y cuando alcance la temperatura ambiente se pesó. Se repitió el procedimiento hasta alcanzar peso constante (Miranda, M. 2001).

#### **Expresión de los resultados**

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

**Dónde:**

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

**$M_2$**  = masa del crisol con las cenizas totales (g).

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

**M<sub>1</sub>** = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

**M** = masa del crisol vacío.

**100** = factor matemático.

#### ***2.4.4. Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico***

Las cenizas insolubles en ácido clorhídrico son el residuo obtenido después de hervir las cenizas totales con ácido clorhídrico diluido y llevado a la ignición el material insoluble restante. Estas miden la cantidad de sílice presente, especialmente como arena y tierra silíceas. (Norma Ramal de Salud Pública (NSRP) 309 “Droga cruda: Método de ensayo”, 1992; citado en Miranda, M. 2001).

#### **Procedimiento**

A las cenizas totales obtenidas anteriormente, se añadió 2 a 3 mL de ácido clorhídrico al 10%. La capsula de porcelana se tapó con un vidrio reloj y se sometió al calor sobre un baño de agua hirviendo durante 10 min. Se lavó el vidrio reloj con 5mL de agua caliente y se unió el contenido de la capsula de porcelana (Miranda, M. 2001)

La solución se filtró a través de un papel filtro libre de cenizas; se lavó el residuo con agua caliente, se añadió una o dos gotas de solución de nitrato de plata 0.1mol/L, hasta que no se observe la presencia de cloruros. El filtrado con el residuo se desecó a una temperatura de 100 a 105 °C, se trasladó a la capsula de porcelana y se incineró en un horno mufla a una temperatura de 700-750 °C durante 2h. Posteriormente se colocó en un desecador y cuando alcanzó la temperatura ambiente se pesó. Se repitió el procedimiento hasta obtener masa constante (Miranda, M. 2001)

#### **Expresión de los resultados**

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

**Dónde:**

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

**M** = masa del crisol con la porción de ensayos (g)

**M<sub>2</sub>**= masa del crisol con la ceniza (g)

**100**= factor matemático.

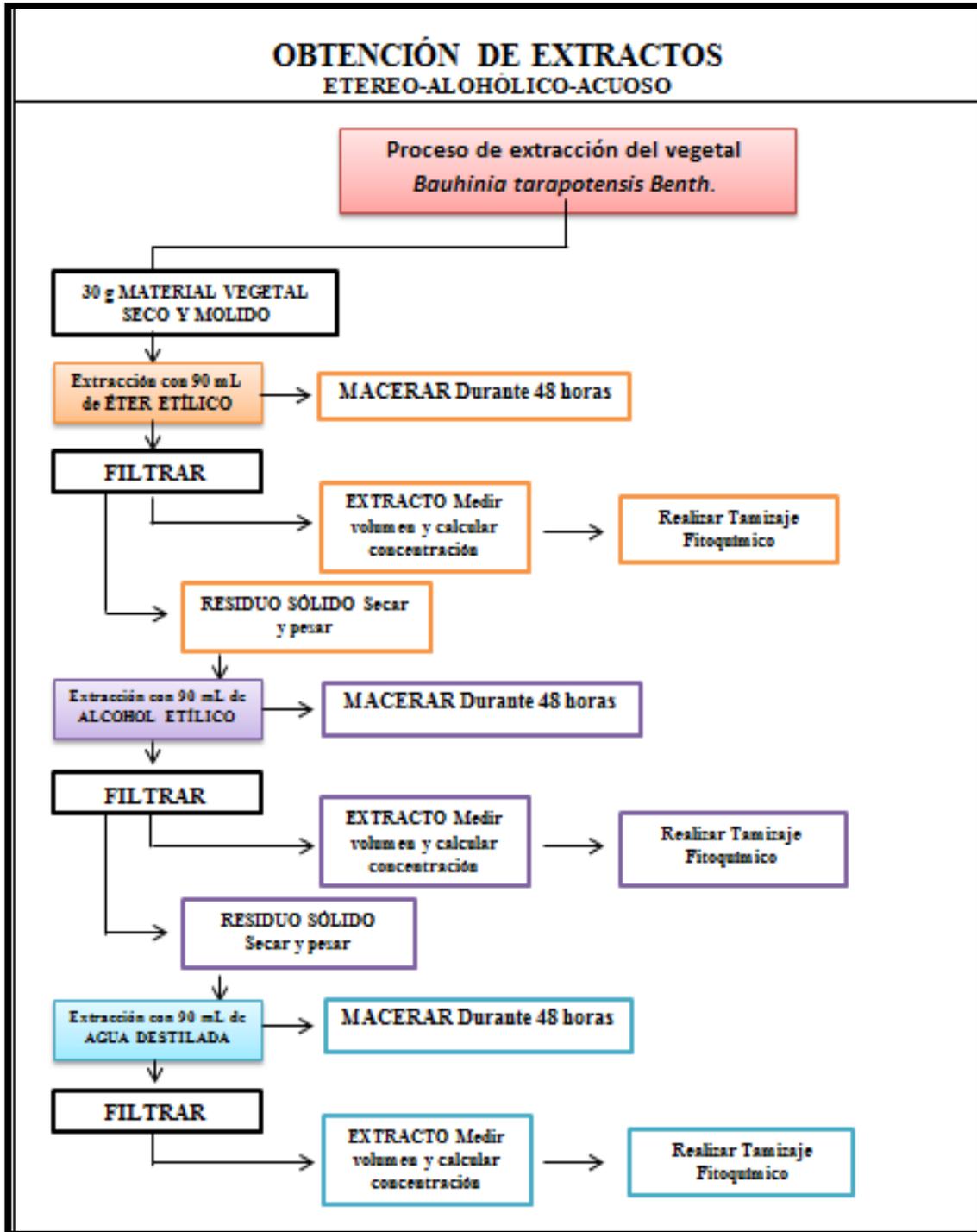
**2.5. Elaboración de extractos**

Una vez el material vegetal limpio y desinfectado se realizó el secado de la muestra por el Método Dsecación al Aire Libre, en un lugar cubierto con techo para evitar el secado al sol ya que puede destruir los principios activos presentes en el vegetal, también puede darse una alteración al color y aspecto de la droga. Además con una aireación constante durante varias semanas hasta que la planta se encontró totalmente seca (Miranda, M. 2001).

Finalmente se molió la planta y se almacenó en un recipiente libre de la luz solar para los análisis posteriores (Miranda, M. 2001).

Para obtener las sustancias activas se utilizó una extracción sucesiva con solventes de polaridad creciente como:

- Etéreo
- Alcohólico
- Acuoso (Miranda, M. 2001).

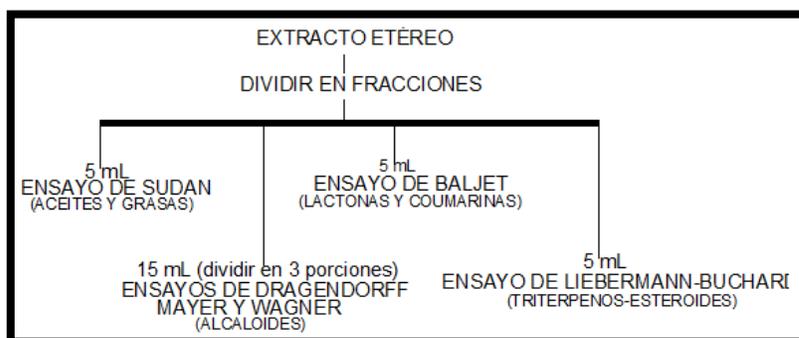


**Figura 17-2.** Extracción sucesiva del material vegetal *Bauhinia tarapotensis Benth* para aplicar el Tamizaje Fitoquímico. Editado por Chaglla, J. 2015. Facultad de Ciencias. ESPOCH.  
Fuente: Miranda, M. 2001.

## 2.6. Tamizaje Fitoquímico

Para la determinación de los metabolitos secundarios de la planta se realizó el tamizaje fitoquímico, utilizando 3 tipos diferentes de solventes según su polaridad: éter etílico, alcohol y agua. (Norma Ramal de Salud Pública (NSRP) 309 “Droga cruda: Método de ensayo”, 1992; citado en Miranda, M., 2001).

### 2.6.1. Reacciones de los metabolitos secundarios presentes en el extracto etéreo



**Figura 18-2.** Esquema de las reacciones a realizar en el extracto de éter etílico.

Fuente: Miranda, M. 2001.

- **Ensayo de Sudan:** Reconoce la presencia de compuestos grasos.

Se tomó una alícuota del extracto etéreo en un tubo de ensayo limpio y seco, se añadió 1 mL de la solución coloreada Sudan III o Sudan IV, calentar en baño de agua hasta evaporación del solvente (Miranda, M. 2001).

**Interpretación de resultados:** La aparición de gotas o una película coloreada de color rojo en el seno o en las paredes del tubo de ensayos respectivamente es un resultado positivo (Miranda, M. 2001).

- **Ensayo de Dragendorff:** Permite reconocer la presencia de alcaloides al igual que los ensayos de Mayer y Wagner (Miranda, M. 2001).

Para este ensayo se tomó alícuota del extracto etéreo, se evaporó en baño de agua caliente y el residuo se redisolvió en 1 mL de ácido clorhídrico (1%) en agua. Una vez obtenida la solución acuosa ácida se añadieron 3 gotas del reactivo de Dragendorff (Miranda, M. 2001).

**Interpretación de resultados:** Opalescencia (+), turbidez definida (++), precipitado coposo (+++) (Miranda, M. 2001).

- **Ensayo de Mayer:** Se procedió de la forma descrita anteriormente hasta obtener la solución ácida (Miranda, M. 2001).

Se añadió una pizca de cloruro de sodio, agitar y filtrar. Finalmente se agregaron 2 a 3 gotas del reactivo de Mayer (Miranda, M. 2001).

**Interpretación de resultados:** Opalescencia (+), Turbidez definida (+ +), Precipitado coposo (+ + +) (Miranda, M. 2001).

- **Ensayo de Wagner:** Se partió de la misma forma en los casos anteriores hasta obtener la solución ácida, posteriormente se añadió 2 a 3 gotas del reactivo correspondiente (Miranda, M. 2001).

**Interpretación de resultados:** Opalescencia (+), Turbidez definida (+ +), Precipitado coposo (+ + +) (Miranda, M. 2001).

- **Ensayo de Baljet:** Permite reconocer la presencia de compuestos lactónicos, particularmente Coumarinas (Miranda, M. 2001).

Se tomó una alícuota del extracto etéreo, se evaporó y redisolvió en una pequeña cantidad de alcohol, en estas condiciones se agregó 1 mL del reactivo de Baljet (Miranda, M. 2001).

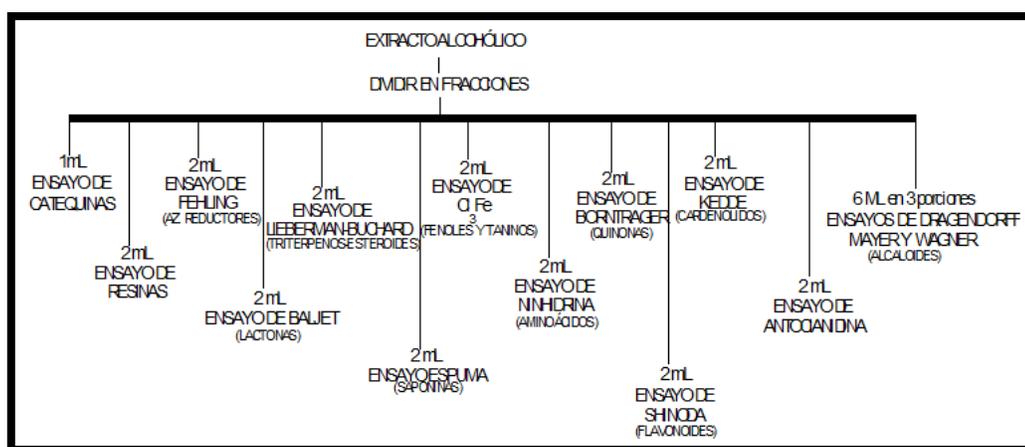
**Interpretación de resultados:** El ensayo es positivo si se aprecia coloración (+ +) y precipitado rojo (+ + +) (Miranda, M. 2001).

- **Ensayo de Liebermann – Burchard:** Se tomó una alícuota del extracto, se llevó hasta sequedad y redisolvido en 1 mL de cloroformo. Seguidamente se añadió 1mL de anhídrido acético y se procedió a mezclar bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejó resbalar de 3 a 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado (sin agitar) (Miranda, M. 2001).

**Interpretación de resultados:** Para que el ensayo sea positivo se dará un cambio positivo de coloración de la siguiente manera:

1. Rosado – azul muy rápido
2. Verde intenso – visible rápido
3. Verde oscuro – negro – final de la reacción (Miranda, M. 2001).

### 2.6.2. Reacciones de los metabolitos secundarios presentes en el extracto alcohólico



**Figura 19-2.** Esquema de las reacciones a realizar en el extracto alcohólico.

Fuente: Miranda, M. 2001.

- **Ensayo de Catequinas:** Se tomó una gota del extracto alcohólico, con la ayuda de un capilar y se aplicó sobre un trozo de papel filtro. Sobre la mancha se aplicó una solución de carbonato de sodio (Miranda, M. 2001).

**Interpretación de resultados:** Una mancha verde carmelita a la luz UV, nos indica una prueba positiva (Miranda, M. 2001).

- **Ensayo de resinas:** A la alícuota tomada del extracto alcohólico se adicionó 10 mL de agua destilada (Miranda, M. 2001).

**Interpretación de resultados:** La presencia de precipitado nos indica una prueba positiva (Miranda, M. 2001).

- **Ensayo de Fehling:** Reconoce la presencia de azúcares reductores. La alícuota del extracto se evaporó en un baño de agua caliente y el residuo se redisolvió con un volumen de 2 mL. Finalmente se adicionó 2mL del reactivo de Fehling y se calentó en un baño de agua durante 5 – 10 minutos (Miranda, M. 2001).

**Interpretación de resultados:** El ensayo es positivo, si la solución se colorea de rojo o se visualiza un precipitado de color rojo (Miranda, M. 2001).

- **Ensayo de Baljet** (Lactonas) (Miranda, M. 2001).
- **Ensayo de Lieberman – Buchard** (Triterpenos - Esteroidales) (Miranda, M. 2001).
- **Ensayo de Espuma:** Permite identificar la presencia de saponinas.

La alícuota del extracto alcohólico se diluyó con 5 veces su volumen de agua y se agitó la solución fuertemente durante 10 minutos (Miranda, M. 2001).

**Interpretación de resultados:** Si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y permanece por más de 2 minutos, el ensayo es positivo (Miranda, M. 2001).

- **Ensayo del Cloruro Férrico:** Identifica compuestos fenólicos y/o taninos del extracto en estudio.

Se tomó una alícuota del extracto alcohólico se le adicionó 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9% en agua) (Miranda, M. 2001).

**Interpretación de resultados:** Si el ensayo es positivo presentara las siguientes características:

1. Coloración rojo – vivo nos indica compuestos fenólicos en general.
2. Coloración verde intensa nos indica taninos del tipo pirocatecólicos.
3. Coloración azul nos indica taninos del tipo pirogalotánicos (Miranda, M. 2001).

- **Ensayo de Borntrager:** Reconoce la presencia de quinonas.

La alícuota del extracto alcohólico se evaporó en baño de agua caliente, posteriormente se redisolvió en 1 mL de cloroformo. Se adicionó 1 mL de hidróxido de sodio al 5 %. Se agitó hasta mezclar las fases y se dejó en reposo hasta observar una separación de fases (Miranda, M. 2001).

**Interpretación de resultados:** Si la fase acuosa alcalina (superior) presenta un color rosado o rojo, la prueba se considera positivo. Coloración rosada (+ +), coloración rojo (+ + +) (Miranda, M. 2001).

- **Ensayo de Shinoda:** Permite identificar metabolitos secundarios como son los flavonoides.

A la alícuota tomada del extracto se diluyó con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y se colocó por la pared del tubo de ensayo una pizca de cinta de magnesio metálico. A continuación de la reacción se esperó aproximadamente 5 minutos hasta que termine la reacción. Se añadió 1 mL de alcohol amílico se mezcló y dejó reposar hasta que las fases se separen (Miranda, M. 2001).

**Interpretación de resultados:** La prueba es positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos (Miranda, M. 2001).

- **Ensayo de antocianidinas:** Se calentó 2 mL del extracto alcohólico por 10 minutos con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado, se dejó enfriar y se adicionó 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Se agitó y se dejó reposar las dos fases (Miranda, M. 2001).

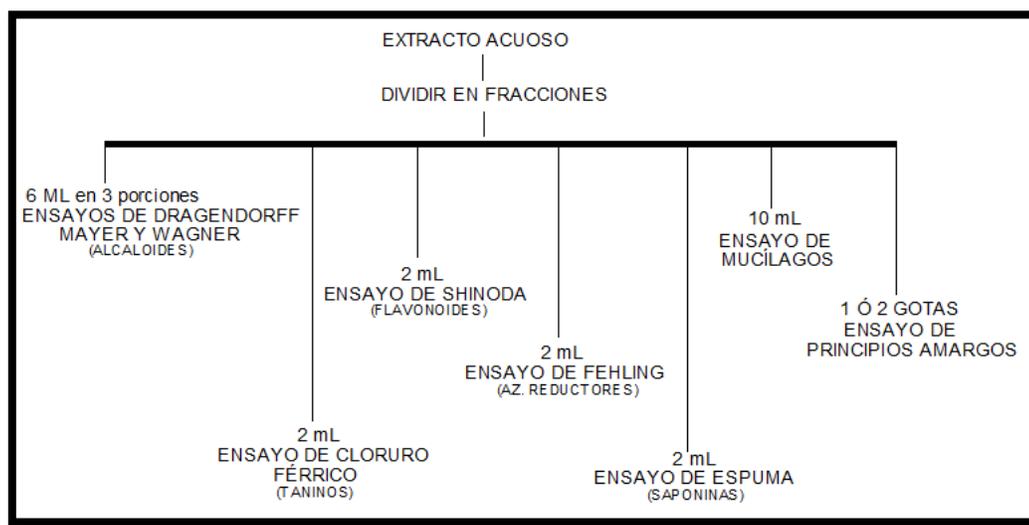
**Interpretación de resultados:** La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica, nos indica que la prueba es positiva (Miranda, M. 2001).

- **Ensayo de Dragendorff:** (Alcaloides) (Miranda, M. 2001).

- **Ensayo de Mayer** (Alcaloides) (Miranda, M. 2001).

- **Ensayo de Wagner** (Alcaloides) (Miranda, M. 2001).

### 2.6.3. Reacciones de los metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso.



**Figura 20-2.** Esquema de las reacciones a realizar en el extracto acuoso.

Fuente: Miranda, M. 2001.

- **Ensayo de Dragendorff:** A la alícuota del extracto acuoso se añadió 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, (se calentó suavemente y dejó enfriar). Con la solución acuosa ácida se adicionó 3 gotas del reactivo (Miranda, M. 2001).

**Interpretación de resultados:** Opalescencia (+), turbidez (++) , precipitado coposo (+++)(Miranda, M. 2001).

- **Ensayo de Mayer:** Para este ensayo se procedió de la misma forma que el ensayo anterior hasta obtener la solución acuosa ácida. Se añadió una pizca de cloruro de sodio, se agitó y filtró. Se agregó 3 gotas del reactivo de Mayer (Miranda, M. 2001).

**Interpretación de resultados:** Opalescencia (+), turbidez (++) , precipitado coposo (+++) (Miranda, M. 2001).

- **Ensayo de Wagner:** Se inicia de la misma forma que los casos anteriores hasta la obtención de la solución acuosa ácida. Se añadió a esta solución 3 gotas del reactivo de Wagner (Miranda, M. 2001).

**Interpretación de resultados:** Opalescencia (+), turbidez (++) , precipitado coposo (+++)(Miranda, M. 2001).

- **Ensayo del cloruro férrico:** Se tomó una alícuota del extracto acuoso se añadió acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (Miranda, M. 2001).

**Interpretación de resultados:** Si el ensayo es positivo presentara las siguientes características:

4. Coloración rojo – vivo nos indica compuestos fenólicos en general.
  5. Coloración verde intensa nos indica taninos del tipo pirocatecólicos.
  6. Coloración azul nos indica taninos del tipo pirogalotánicos (Miranda, M. 2001).
- **Ensayo de Shinoda:** Se adicionó 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y una pizca de cinta de magnesio metálico. A continuación de la reacción se esperó aproximadamente 5 minutos hasta que termine la reacción. Se añadió 1 mL de alcohol amílico se mezcló y dejó reposar hasta que las fases se separen (Miranda, M. 2001).

**Interpretación de resultados:** La prueba se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo intenso en todos los casos (Miranda, M. 2001).

- **Ensayo de Fehling:** Se adicionó 2mL del reactivo de Fehling y se calentó en un baño de agua durante 5 – 10 minutos (Miranda, M. 2001).

**Interpretación de resultados:** El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o se visualiza un precipitado de color rojo (Miranda, M. 2001).

- **Ensayo de Espuma:** La alícuota del extracto acuoso se diluyó con 5 veces su volumen de agua y se agitó la solución fuertemente durante 10 minutos (Miranda, M. 2001).

**Interpretación de resultados:** Se considera positivo el ensayo de espuma si se observa espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y permanezca por más de 2 min (Miranda, M. 2001).

- **Ensayo de Mucílagos:** Permite identificar la presencia de mucílagos de tipo polisacáridos. Se procedió a tomar una alícuota del extracto acuoso y se dejó enfriar a una temperatura de 4 ° C (Miranda, M. 2001).

**Interpretación de resultados:** Si presenta una consistencia gelatinosa la prueba es positiva (Miranda, M. 2001).

- **Ensayo de Principios amargos y astringentes:** El ensayo se llegó a cabo saboreando una gota del extracto y se reconoció el sabor de cada uno de estos principios (Miranda, M. 2001).

## 2.7. Análisis Cromatográfico

El extracto en estudio se analizó por Cromatografía en Capa Fina (TLC), el análisis se basó en la identificación de Flavonoides, se procedió de la siguiente manera:

- Para el análisis se utilizaron placas de silica gel ( Aluminum backed TLC 20 × 20 cm F-254 200 um).
- Se preparó la fase móvil para el corrido con un sistema de solventes (acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, metil-isobutil-cetona y agua) (6: 0.7: 0.3: 2.5: 1.5).
- La aplicación del extracto y del estándar (quercetina) se realizó con un capilar a una distancia de 1 cm del borde inferior de la placa cromatografía, el número de aplicaciones fueron de 5 a 6 veces, dejando secar después de cada aplicación.

- Se introdujo la placa en una cuba cubierta y se dejó que los solventes recorran  $\frac{3}{4}$  partes de la placa.
- Seguidamente se retiró la placa y se dejó secar.
- Para su mejor identificación se procedió a calentar la placa muy suavemente, y se reveló con vapores de amonio y solución de cloruro de aluminio.
- Para observar las manchas e identificar se llevó a la cámara de UV.
- Finalmente se midió la distancia recorrida de los compuestos y la distancia recorrida del solvente con la siguiente fórmula (Cabezas, G., 2004):

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

## 2.8. Cuantificación de metabolitos secundarios

### 2.8.1. Cuantificación de Flavonoides Totales en el extracto de hojas *Bauhinia tarapotensis* Benth (Pata de Vaca)

- Se pesó 1 gramo del vegetal molido y seco, se disolvió en 25 mL de alcohol al 96% (extracto alcohólico) y 25 mL alcohol al 80% (extracto hidroalcohólico).
- Se maceró durante 24 horas los dos extractos (alcohólico e hidroalcohólico) y se ajustó su volumen a 25 mL con alcohol al 96 % y 80% respectivamente, se centrifugó la mezcla a 2000 rpm.
- Se tomó una alícuota de 0.5 mL del extracto alcohólico e hidroalcohólico preparado anteriormente, se agregó 1.5 mL de alcohol al 96% y 80% respectivamente, 0.1 mL de la solución  $\text{AlCl}_3$  al 10%, 0.1 mL de solución 1M de acetato de potasio y 2.8 mL de agua destilada; la mezcla se incubó por 30 minutos.

- Su absorbancia se leyó en un Espectrofotómetro a una longitud de onda de 415 nm.
- La curva de calibración se preparó con quercetina a una longitud de onda de 415 nm. El contenido de flavonoides de los extractos se expresó en mg quercetina/ 1g muestra (Lock Olga, 2006, p.4).

### ***2.8.2. Cuantificación de Fenoles totales en el extracto de hojas Bauhinia tarapotensis Benth (Pata de Vaca)***

- Se pesó 1 g del vegetal molido y seco, se disolvió en 25 mL de alcohol al 96% (extracto alcohólico) y se disolvió en 25 mL de alcohol al 80% (extracto hidroalcohólico), se maceró durante 24 horas y se ajustó su volumen a 25 mL con alcohol al 80% y alcohol al 96 % respectivamente, y se centrifugó la mezcla a 2000 rpm.
- A 0.5 mL del extracto alcohólico e hidroalcohólico se adicionó 10 mL de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 10% y se incubó a 38 ° C por 15 minutos.
- Se tomó 1 mL de esta solución a la cual se le añadió 3 mL de agua destilada y 1 mL del reactivo de Folin – Ciocalteu: agua 1:1 v/v.
- La mezcla se dejó reposar por 15 minutos en oscuridad.
- Finalmente se tomó lectura de la absorbancia a 660 nm en un Espectrofotómetro.
- Se utilizó una solución estándar de ácido gálico, se tomó la lectura a 660 nm. El contenido de fenoles de los extractos se expresó en mg ácido gálico/ 1g muestra (Barrón, et al., 2001).

## **2.9. Control de calidad del extracto**

Para el control de calidad del extracto se analizó los siguientes parámetros: requisitos organolépticos (color, aspecto y olor), pH, densidad, índice de refracción, sólidos totales y análisis microbiológico.

Se evaluaron los siguientes parámetros:

### **- Determinación de los Requisitos organolépticos**

Para las determinaciones de los parámetros de calidad (color, olor y apariencia) se tomó en un tubo de ensayo limpio y seco tres cuartas partes del extracto y se observó el color, el aspecto; para la determinación de olor se tomó una tira de papel filtro y se introdujo en la muestra del extracto y se procedió a oler. (Norma Ramal de Salud Pública (NSRP) 312 “Extractos fluidos y tintura: Métodos de Ensayo”, 1992; citado en Miranda, M. 2001).

### **- Determinación de la Densidad relativa**

La densidad relativa es la relación entre la masa de un volumen de la sustancia a ensayar a una temperatura de 25 °C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. Este término equivale a peso específico (Norma Ramal de Salud Pública (NSRP) 312 “Extractos fluidos y tintura: Métodos de Ensayo”, 1992; citado en Miranda, M. 2001).

## **Materiales y reactivos**

- Picnómetro de al menos 10 mL de capacidad.
- Balanza analítica (Miranda, M. 2001).

## **Procedimiento**

Para la determinación se pesó el picnómetro vacío y seco a 2 °C y se llenó con la porción de ensayo, se mantuvo a la temperatura de 25 °C ( $\pm$  1 °C) durante 15 min., y se ajustó el líquido

al nivel empleado, con la ayuda de una pequeña tira de papel se retiró el exceso del líquido externamente del picnómetro y se pesó cuidadosamente. Se retiró la porción de ensayo con agua destilada a 25 °C, y se pesó con la porción de agua destilada (Miranda, M. 2001).

### **Expresión de los resultados**

La densidad relativa a 25 °C se calcula por la siguiente fórmula:

$$D_{25} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

#### **Dónde:**

**M<sub>1</sub>**: peso del picnómetro con la muestra (g)

**M<sub>2</sub>**: peso del picnómetro con el agua (g)

**M**: peso el picnómetro vacío (g).

Los resultados se aproximan hasta la tercera cifra. .

### **- Determinación del Índice de refracción**

El índice de refracción es una constante característica de cada sustancia, la cual representa relación entre el seno del ángulo de incidencia de la luz y el seno del ángulo de refracción cuando la luz pasa oblicuamente a través del medio. (Norma Ramal de Salud Pública (NSRP) 312 “Extractos fluidos y tintura: Métodos de Ensayo”, 1992; citado en Miranda, M. 2001).

### **Materiales y reactivos**

- Refractómetro
- Varilla de vidrio (Miranda, M. 2001).

### **Procedimiento:**

Se colocó sobre el prisma de medición una gota de agua destilada, utilizando para ello una varilla de vidrio, se ajustó el equipo seleccionando la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro (Miranda, M. 2001).

Después de haber realizado el ajuste del refractómetro, se coloca una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición, se cierra el termoprisma y se enfoca la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incida sobre la apertura de entrada del prisma de medición y se proceda de la misma forma que con el agua (Miranda, M. 2001).

### **Expresión de los resultados**

Se realizaron tres lecturas y se calculó el promedio de las mismas. Dos o más lecturas no deben diferir en más de 0.002 (Miranda, M. 2001).

#### **- Determinación del pH**

El pH es un índice numérico que se utiliza para expresar la mayor o menor acidez de una solución en función de los iones hidrógeno (Norma Ramal de Salud Pública (NSRP) 312 “Extractos fluidos y tintura: Métodos de Ensayo”, 1992; citado en Miranda, M. 2001).

### **Materiales y reactivos**

- Medidor del pH con electrodo de vidrio combinado (Miranda, M. 2001).

### **Procedimiento**

Se determinó el valor del pH de la muestra (Miranda, M. 2001).

## - **Determinación de Sólidos totales**

La determinación de sólidos totales es la variación de la masa, debido a la pérdida o eliminación de sustancias volátiles por acción del calor, por medio de un proceso de evaporación de la muestra a ensayar y el secado del residuo, hasta conseguir masa constante (Norma Ramal de Salud Pública (NSRP) 312 “Extractos fluidos y tintura: Métodos de Ensayo”, 1992; citado en Miranda, M. 2001).

### **Materiales y reactivos**

- Cápsula de porcelana, platino o cristal.
- Baño de agua.
- Balanza analítica
- Desecadora conteniendo sílica gel.
- Estufa con temperatura controlada ( $105 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ )
- Pipeta aforada de 5 mL (Miranda, M. 2001).

### **Procedimiento**

5,0 mL del extracto se llevó a una cápsula previamente tarada a  $105 \text{ }^\circ\text{C}$ , se evaporó sobre baño de agua hasta que el residuo esté aparentemente seco. Se pasó hacia una estufa y se dejó hasta peso constante (aproximadamente 3 h). Se retiró la cápsula de la estufa y se colocó en una desecador hasta que alcance la temperatura ambiente (Miranda, M. 2001).

Para obtener la masa constante entre una pesada y otra se mantuvo un tiempo de secado de 60 minutos (Miranda, M. 2001).

### **Expresión de los resultados**

La cantidad de sólidos totales, expresado en %, se calcula por la siguiente fórmula:

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

**Dónde:**

$P_r$ = masa de la cápsula más el residuo (g)

$P$ = masa de la cápsula vacía (g)

$V$ = volumen de la porción de ensayo.

$100$ =factor matemático para el cálculo.

**2.10. Análisis Microbiológico del extracto**

El análisis microbiológico del extracto alcohólico *Bauhinia tarapotensis Benth* (PATA DE VACA) se realizó para el extracto que fue aplicado a los animales de experimentación de forma tópica.

**Materiales y reactivos**

- Tubos de ensayos estériles
- Tapas de ensayo estériles
- Asa
- Cajas Petri
- Gradilla
- Mechero
- Agua Peptona
- Esterilizador
- Estufa
- Cámara de Flujo Laminar
- Placas Compact Dry
- Pipeta 100  $\mu$ L

**2.10.1. Método de extensión en placa para Aerobios mesófilos**

- Después de la primera dilución  $10^{-1}$  se dejó reposar por 30 minutos para poder realizar la segunda dilución.

- Se tomó 1 mL del extracto en un tubo de ensayo esterilizado y 9 mL de agua de peptona 0.1% , obteniendo una dilución 1/10.
- De la dilución 1/10 se tomó 1 mL + 9 mL de agua de peptona 0.1 % , obteniendo la dilución 1 / 100.
- De cada tubo de ensayo se tomó 100 µL y se procedió a sembrar en una placa con agar PCA previamente etiquetada.
- Se dejó incubar 48 horas a una temperatura de 32 ° C.
- Finalmente se realizó el conteo y se reportará como Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC / mL ) (Gallegos, J. 2003).

### ***2.10.2. Método de extensión en placa para Mohos y Levaduras***

- Para el análisis de cada extracto se realizaron diluciones 1/10 y 1/100.
- Se tomó 1 mL del extracto en un tubo de ensayo y 9 mL de agua de peptona 0.1% , obteniendo una dilución 1/10, dejar reposar por 30 minutos para realizar la segunda dilución.
- De la dilución 1/10 se tomó 1 mL + 9 mL de agua de peptona 0.1 % , obteniendo la dilución 1 / 100.
- De cada tubo de ensayo se tomó 100 µL y se procedió a sembrar en una placa con agar Sabouraud previamente etiquetada.
- Se dejó incubar de 4 a 5 días a una temperatura de 22 ° C.

- Finalmente se realizó el conteo y se reportará como Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC / mL ) (Gallegos, J. 2003).

### ***2.10.3. Método vertido en placa para Coliformes totales y Fecales***

- Para la detección de coliformes totales y fecales se utilizaron placa Compact Dry.
- Se abrió la cubierta y se dejó caer 1 mL de la muestra sobre la parte central de la placa.
- La muestra se dispersa rápidamente y homogéneamente sobre la lámina.
- Se cerró la cubierta sobre la placa, en la sección de memorando se realizó la rotulación respectiva.
- Se colocó en la estufa y se procedió a contar el número de colonias coloreadas. Si las colonias son de color morado existe la presencia de Coliformes totales y si las colonias son azules presenta Coliformes fecales (Apracom).

## **2.11. Evaluación de la actividad cicatrizante del extracto *Bauhinia tarapotensis Benth.* Protocolo Farmacológico de Cicatrización.**

### ***2.11.1. Fase de Climatización***

- **Descripción del Animal de experimentación:**
  - **Número de ratones:** 24 ratones (*Mus musculus*)
  - **Peso promedio:** 35-40 g
  - **Edad:** 3-4 meses
  - **Sexo:** Machos/Hembras
  - **Lugar de nacimiento:** Bioterio de la Facultad de Ciencias (ESPOCH)

- **Condiciones Ambientales:**

- **Ambientación:** 15 días antes a la experimentación. Se procedió a tomar el peso de los ratones durante la ambientación, para obtener pesos constantes en todos los animales.
- **Humedad relativa:** 40-70%
- **Temperatura:** 22 °C ± 2
- **Periodo:** 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad
- **Ruido:** ausente
- **Cama:** Viruta (madera), para mantener animales limpios y secos, el cambio se realizará cada 48 h.
- **Alimento:** pellets (balanceado para roedor) y agua Ad libitum (Cabezas, G. 2014).

#### ***2.11.2. Fase de Lesión Inducida***

- Los animales fueron depilados 24 h antes de realizarle el corte en el área dorsal.
- Para la depilación primero se humedeció con agua tibia la zona a depilar.
- Se procedió a depilar la zona con crema depiladora Veet, después de la aplicación se dejó de 3 a 5 min que actúe, y retirar el pelaje con gasas.
- Se esperó 24 h para descartar algún tipo de reacciones alérgicas.
- Desinfectar la zona depilada y colocar un anestésico, Roxicaina (Lidocaína base al 10%), vía tópica.
- Marcar una longitud perpendicular de 2 cm al eje longitudinal del ratón.
- La incisión se realizó con un bisturí en la zona marcada, que comprenda las capas de la piel (Cabezas, G. 2014).

### 2.11.3. Fase de Tratamiento

- Previamente se pesó cada uno de los animales a utilizar en el ensayo (**ANEXO A**)
- Los 24 ratones se distribuyeron en 6 Grupos experimentales, cada grupo formado por 4 ratones con características similares (**Tabla 2-2**). Para la evaluación diaria del proceso de cicatrización a cada ratón que conforma el grupo de investigación se etiquetó con signos en la cola de los mismos (Cabezas, G. 2014).
- Se aplicó extractos de hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* a 75 %, 50 % y 25 %.
- **Control farmacológico: LAMODERM**  
Cada 100 gramos contiene:  
Acetato de prednisolona ..... 0.5 g  
Sulfato de neomicina..... 0.5 g
- Los grupos investigativos a evaluar es Lamoderm, alcohol al 40% como controles positivos y el grupo control negativo al cual no se le aplicó ningún tratamiento (Cabezas, G.).
- La aplicación de los extractos se realizó vía tópica, cada 8 horas con un volumen de 0,1 mL, de la misma forma se procedió con el alcohol al 40 %.
- Para la aplicación de la crema Acetato de Prednisolona – Sulfato de Neomicina se utilizó un hisopo estéril.

**Tabla 2-2:** Protocolo Experimental

CONTROL (-)	CONTROL(+)		EXTRACTO 1	EXTRACTO 2	EXTRACTO 3
C1	X1	Y1	A1	B1	C1
C2	X2	Y2	A2	B2	C2
C3	X3	Y3	A3	B3	C3
C4	X4	Y4	A4	B4	C4
G1	G2	G3	G4	G5	G6

**Realizado por:** CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).

**G=** Grupos

**C=** Animales sin tratamiento

**X=** Animales tratados con Acetato de Prednisolona- Neomicina Sulfato

**Y=** Animales tratados con alcohol 40%

**A=** Animales tratados con extracto

**B=** Animales tratados con extracto

**C=** Animales tratados con extracto

#### ***2.11.4. Fase de Evaluación***

Para la evaluación del proceso de cicatrización diariamente se midió la longitud de la herida hasta terminar el proceso de cicatrización por cada uno de los grupos investigativos, además se observó la formación y caída de costra, inflamación e irritación de la herida durante el proceso.

El tiempo de cicatrización fue analizada por representación de histogramas y análisis estadístico con el Software IBM SPSS STATISTICS Versión 22.

#### **2.12. Análisis Histopatológico**

Se realizó la eutanasia a 24 ratones mediante la técnica inhalatoria con éter etílico (Álvarez,I), se cortó la piel de 1 cm cuadrado alrededor de la cicatriz final, involucrando las epidermis, dermis e hipodermis. De cada corte de la piel se toman datos de longitud de la cicatriz, aspecto, color y forma, se colocó en un recipiente con formol al 10 % y respectivamente codificado para cada uno de los grupos investigativos. Las muestras se llevaron al laboratorio histopatológico para su respectivo análisis.

## CAPÍTULO III

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

#### 3.1. Control de calidad del material vegetal

##### 3.1.1. Determinación del Contenido de Humedad

**Tabla 3-3:** Resultados de la Determinación del contenido de Humedad del material vegetal de *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca).

PARÁMETRO	RESULTADO	NTE INEN 2 392:2007	USP # 28
Contenido de Humedad (%)	8.47% ± 2.07	MÁX 12	14 (Muestra seca)

± Desviación estándar  $p < 0.05$

Realizado por: CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).

El contenido de humedad en las hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca) fue de 8.47 %; valor que se encuentra dentro de los límites establecido por la Norma NTE INEN 2 392:2007, de igual manera cumple con las especificaciones de la USP # 28 (2002) el cual indica un valor máximo de 14%, indicando que el material vegetal es apropiado para los ensayos posteriores. El valor es diferente al estudio realizado por Urquizo, F., donde se obtuvo un porcentaje de humedad de 11.21 % . La cantidad elevada de agua causa crecimiento microbiano, hidrólisis de los principios activos es decir una degradación química de los compuestos, estos factores afectan a la calidad del material vegetal (Jurado, 2015. p.33).

### 3.1.2. Determinación de Cenizas Totales

**Tabla 4-3:** Resultados de la Determinación de Cenizas Totales del material vegetal de *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca).

	<b>RESULTADO</b>	<b>USP # 25 (2001)</b>
<b>Cenizas Totales (%)</b>	4.76% ± 0.59	Hasta 12

± Desviación estándar  $p < 0.05$

Realizado por: CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).

El porcentaje de cenizas totales fue de 4.76 %; este valor se encuentra dentro del límite aceptable por la USP # 25, el cual indica un valor de hasta 12 %. El valor de cenizas totales indicada en la tabla es diferente al estudio realizado por Urquiza, F., obteniendo un valor de 7,23 %. La cantidad de cenizas totales nos indican la cantidad de cenizas fisiológicas derivados del tejido de la planta y cenizas no fisiológicas, que son residuos que permanece después de la ignición de la materia extraña como polvo, tierra, arena; que se encuentran adheridas a la superficie de la droga (Jurado, 2015: p.33).

### 3.1.3. Determinación de Cenizas Solubles en Agua

**Tabla 5-3:** Resultados de la Determinación de Cenizas solubles en agua del material vegetal de *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca).

<b>PARÁMETRO</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>USP # 28</b>
<b>Cenizas solubles en agua (%)</b>	0.92% ± 0.07	Hasta 7

± Desviación estándar  $p < 0.05$

Realizado por: CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).

El porcentaje de cenizas solubles en agua fue de 0.92 %, valor que se encuentra dentro de los límites permisibles (7%) dada por la USP # 28. El valor obtenido en el estudio es similar al valor encontrado por Urquizo, F., siendo un valor de 0.85 %. El porcentaje de cenizas solubles en agua corresponde a la presencia de sales de metales alcalino-térreos (Payrol et al, 2005: p.379).

### 3.1.4. Determinación de Cenizas Insolubles en HCl

**Tabla 6-3:** Resultados de la Determinación de Cenizas insolubles en HCl del material vegetal de *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca).

PARÁMETRO	RESULTADO	NTE INEN 2 392:2007	USP # 28
Cenizas insolubles en HCl (%)	0.33% ± 0.02	MÁX 2	Hasta 5 %

± Desviación estándar p < 0.05

Realizado por: CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).

El promedio de cenizas insolubles en HCl fue de 0.33%, el cual se encuentra entre los límites permisibles (5%) dada por la USP # 28 y MÁX 2 según la Norma NTE INEN 2 392:2007. El porcentaje de cenizas insolubles en HCl corresponde a la presencia de metales pesados (Payrol et al, 2005: p.379).

### 3.2. Tamizaje Fitoquímico

**Tabla 7-3:** Resultados del Tamizaje Fitoquímico del extracto etéreo, alcohólico y acuoso de las hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca).

METABOLITOS	ENSAYO	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
Alcaloides	Dragendorff	(+)	(++)	(+)
	Mayer	(+)	(+)	(++)
	Wagner	(+)	(+++)	(+)
Compuestos Grasos	Sudan	(-)		
Flavonoides	Shinoda		(+++)	(+++)

Triterpenos y Esteroides	Liebermann-Buchari	(++)	(++)	
Taninos y Fenoles	Ensayo de Cl <sub>3</sub> Fe		(+++)	(++)
Saponinas	Espuma		(-)	(++)
Azúcares reductores	Fehling		(++)	(++)
Quinonas	Borntrager		(-)	
Cumarinas	Baljet	(-)	(++)	
Flavonoides	Antocianidinas		(+++)	
Catequinas	Catequinas		(++)	
Resinas	Resinas		(-)	
Mucílagos	Mucílagos			(-)
Principios amargos	Principios amargos			(+++)

**Realizado por:** CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).

\*Ausencia: (-). Evidencia Baja: (+). Evidencia Media: (++) . Evidencia Alta: (+++).

De acuerdo a los resultados del Tamizaje Fitoquímico se observó la presencia de metabolitos secundarios en mayor cantidad como alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos-taninos, antocianidinas y principios amargos; una evidencia media de metabolitos como triterpenos-esteroides, azucares reductores, cumarinas, catequinas y saponinas; una baja evidencia de compuestos grasos, quinonas, resinas y musicalagos. La presencia de estos metabolitos secundarios en las partes aéreas de la planta, concuerda con lo descrito en Urquizo, F. y Murillo et.al.

### 3.3. Cromatografía en Capa Fina (TLC)

A continuación se presentan los compuestos que están presentes en las hojas del extracto *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca) con sus respectivos R<sub>f</sub>.

**Tabla 8-3:** Resultados de la Determinación de los Rf de la muestra de hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca).

MANCHA	Rf	COMPUESTO IDENTIFICADO
1	0,13	
2	0,21	
3	0,32	Quercetin- 3-0 rutinoside (rutin)
4	0,51	Ácido clorogénico
5	0,64	Quercetina (Color amarillo)
6	0,73	Ácido isoclorogénico
7	0,84	
8	0,91	Kaemferol

**Realizado por:** CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).

En la cromatografía se evidencio diferentes tipos de flavonoides; se corrió la muestra con un estándar de quercetina evidenciando en la mancha número 5 con un Rf de 0,64 fue similar a la característica de recorrido de referencia de quercetina citado en Wagner, H. con un Rf= 0.60 – 0.70, siendo igual al valor encontrado por Urquizo, F., con un Rf= 0.64. Además se encontraron otros posibles metabolitos, con un Rf de 0,32 la presencia de Quercetin-3-0 rutinoside (rutin), la mancha número 4 con un Rf de 0,51 indica la presencia de Ácido clorogénico, la mancha 6 con Rf 0,76 corresponde al Ácido isoclorogénico y finalmente la mancha número 8 con Rf 0,91 la presencia de Kaemferon (Wagner H., 1996).

### 3.4. Cuantificación de Flavonoides Totales

**Tabla 9-3:** Resultados de la Cuantificación de Flavonoides Totales de la muestra de hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca).

Extracto	Concentración en ppm (µg quercetina/ mL del extracto)	Contenido de flavonoides totales en mg quercetina/ g muestra
Hidroalcohólico	82,75	2,06
Alcohólico	111,92	2,80

**Realizado por:** CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).

La cuantificación de Flavonoides totales se realizó por espectrofotometría. Para la elaboración de la curva de calibración se usó quercetina como patrón, a una longitud de onda de 415 nm. El contenido de flavonoides totales en el extracto hidroalcohólico fue de 2,06 mg de quercetina/ g muestra y del extracto alcohólico 2,80 mg de quercetina/ g muestra, indicando que el extracto alcohólico tiene mayor concentración de flavonoides totales disueltos en el medio de extracción. El estudio realizado por Urquiza, F., demostró que el contenido de flavonoides totales presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas *Bauhinia sp.*, fue de 2,025 mg quercetina/g planta, este último valor se aproximó a la concentración obtenida por el presente estudio.

### 3. 5. Cuantificación de Fenoles Totales

**Tabla 10-3:** Resultados de la Cuantificación de Fenoles Totales de la muestra de hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca).

<b>Extracto</b>	<b>Concentración en ppm (µg ácido gálico / mL del extracto)</b>	<b>Contenido de fenoles totales en mg ácido gálico / g muestra</b>
Hidroalcohólico	101.73	2,54
Alcohólico	191,06	4,78

**Realizado por:** CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).

La cuantificación de compuestos fenólicos totales se realizó por el Método de Folin-Ciocalteu, para la curva de calibración se utilizó Ácido gálico como patrón a una longitud de onda de 510 nm. Los resultados nos indican que el extracto hidroalcohólico contiene 2,54 mg ácido gálico/ g muestra y el extracto alcohólico 4,78 mg ácido gálico/ g muestra, indicándonos mayor concentración de fenoles totales en el extracto alcohólico. Estudio realizado por Murillo, E., mostró una concentración de 8,4 contenido de fenoles totales en (mg EAG)/g del extracto alcohólico de hojas de la especie *B. kalbreyeri*,

Estudio realizado por Murillo, E., Indicó que el alcohol es el mejor solvente para extraer los constituyentes activos de las hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca).

### 3.6. Determinación de las propiedades Físico – Químicas, Organolépticas y Análisis Microbiológico del extracto (*Bauhinia tarapotensis* Benth).

#### 3.6.1. Características organolépticas

**Tabla 11-3:** Resultados de los requisitos Organolépticos del extracto alcohólico de *Bauhinia tarapotensis* Benth (Pata de Vaca).

PARÁMETRO	RESULTADO
Color	Verde translúcido
Aspecto	Líquido, sin presencia de partículas
Olor	Herbal fuerte

Realizado por: CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).

Los requisitos organolépticos como se indica son parámetros propios de las hojas *Bauhinia tarapotensis* Benth (Pata de Vaca), estas características no se encuentran referenciadas para poder compararlo ya que son características propias del vegetal.

#### 3.6.2. Determinaciones Físico-químicas

**Tabla12-3:** Resultados de las Propiedades Físico – Químicas del extracto alcohólico de *Bauhinia tarapotensis* Benth (Pata de Vaca).

PARÁMETRO	RESULTADO
pH	6.68
Densidad relativa	0.8236 g/mL
Índice de refracción	1.368
Sólidos totales	3.71%

Realizado por: CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).

El pH del extracto *Bauhinia tarapotensis* Benth fue de 6.68, valor que corresponde a un carácter ácido débil, próximo a un ph neutro (pH = 7), este valor de ph está dado por la presencia de ciertos metabolitos como son flavonoides, fenoles, taninos el cual aportan el carácter ácido al medio (Rodrigues L. y Marín J., 2008). El valor del pH 6.68 es igual al trabajo realizado por Urquizo, F., obteniendo un valor de 6.68.

La densidad relativa del extracto fue de 0.8236 g/mL, el cual muestra un valor superior a la densidad del solvente utilizado (alcohol etílico 96%) el cual nos indica una densidad de 0.70; esto nos demuestra que en el extracto se disuelven las sustancias provenientes de la droga cruda es por ello el incremento del valor de la densidad (Rodríguez L. y Marín J., 2008). El trabajo realizado por Urquiza, F., se aproxima al valor obtenido en la investigación, siendo un valor de 0.96 g/mL.

El índice de refracción del extracto *Bauhinia tarapotensis Benth*, fue de 1,368, este valor es mayor que el índice de refracción del agua (n=1,333), este valor nos indica la presencia de sustancias en el medio que fueron extraídas durante la preparación del extracto, en este caso serán metabolitos activos o no activos (Rodríguez L. y Marín J., 2008). En la tabla se muestra el valor de 1,368 este valor según el trabajo realizado por Urquiza, F., se aproxima al valor obtenido (0.96).

El valor de sólidos totales fue de 3.71%, el cual nos indica que en el extracto se encuentra presente sustancias en el medio o a su vez nos indican que el método de maceración para preparar los extractos es correcta para esta especie (Rodríguez L. y Marín J., 2008). La determinación realizada por Urquiza, F., se obtuvo como resultado 2.95 %, siendo un valor próximo al obtenido en la investigación.

### 3.6.3. Análisis Microbiológico extracto alcohólico de *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca).

**Tabla 13-3:** Resultados del Análisis de Aerobios Mesófilos, Mohos y Levaduras, Coliformes fecales en las hojas del extracto alcohólico de *Bauhinia Tarapotensis Benth* (Pata de Vaca).

MICROORGANISMOS	EXTRACTO 25%	EXTRACTO 50%	EXTRACTO 75%	VALORES DE REFERENCIA
Aerobios Mesófilos UCF/mL	70	50	50	Máx. $1 \times 10^7$
Mohos y Levaduras UFC/mL	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Máx. $1 \times 10^4$
E. coli				

UCF/mL	Ausencia	Ausencia	Ausencia	1 x 10
--------	----------	----------	----------	--------

**Realizado por:** CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).

\*Límites establecidos por la Norma NTE INEN 2 392:2007

En el Análisis Microbiológico del extracto alcohólico los valores obtenidos de Aerobios Mesófilos, Mohos y Levaduras, Coliformes Fecales se encuentran dentro de los valores de referencia mencionado por la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2 392:2007, descartando así una contaminación microbiana, y garantizando la seguridad para la administración a los animales de experimentación.

### **3.7. Evaluación de la Actividad Cicatrizante del extracto alcohólico de *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca)**

Se evaluó la actividad cicatrizante del extracto alcohólico de *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca), se administró de forma tópica los extractos al (25%, 50% y 75%), y los Controles (+) como Acetato de Prednisolona-Sulfato de Neomicina y Alcohol al 40% y el Control (-) al cual no se administró ningún tratamiento. Se analizaron parámetros como: tiempo de cicatrización, longitud de la herida al finalizar el proceso de cicatrización.

#### **3.7.1. Tiempo de cicatrización**

El proceso de cicatrización en dependencia del tratamiento va a ocurrir en diferentes días. Al finalizar la cicatrización se observaron formación y desprendimiento de la costra, presentando una piel renovada.

**Tabla 14-3:** Resultados del tiempo de cicatrización de heridas inducidas en ratones (*Mus musculus*) obtenidos de los grupos investigativos.

<b>GRUPOS INVESTIGATIVOS</b>	<b>TIEMPO DE CICATRIZACIÓN (Días)</b>
Control (-)	17,75 ± 0,5
Control (+)	
Acetato de Prednisolona – Sulfato de Neomicina	12 ± 0,82

Control (+) Alcohol 40%	13,5 ± 0,58
Tratamiento 25%	10,5 ± 0,58
Tratamiento 50%	9,5 ± 0,58
Tratamiento 75%	7,75 ± 0,5

N = 4; ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR PARA CUATRO MEDICIONES; p-Valor <0,05

Realizado por: CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).



**Gráfico 1-3.** Días de cicatrización

Realizado por: Chaglla Jimena, 2015.

El menor tiempo de cicatrización fue el tratamiento con el extracto al 75%, con un tiempo de cicatrización de 8 días, seguida del extracto al 50% con 10 días de cicatrización y 25 % con un tiempo de cicatrización de 11 días, Acetato de Prednisolona – Sulfato de Neomicina (Control +) con un promedio de 12 días, el alcohol al 40% con 14 días de cicatrización y por último el control negativo con un tiempo de cicatrización de 18 días. En el gráfico de barras se pudo evidenciar que el tratamiento con el extracto al 75% tiene menor día de cicatrización a diferencia de los demás grupos investigativos, ya que conforme se aumenta la concentración de la planta investigada el efecto es mejor.

3.7.1.1. Análisis estadístico de los días de cicatrización

**Tabla 15-3:** Análisis de Varianza (ANOVA) del efecto cicatrizante en los grupos tratados considerando los días de cicatrización.

**ANOVA**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p-value
<b>-Entre grupos</b>	246,833	5	49,367	136,708	1,1479 E-13
<b>-Dentro de grupos</b>	6,500	18	0,361		
<b>TOTAL</b>	253,333	23			

Realizado por: CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).

**Tabla 16-3:** Prueba de comparaciones múltiples Tukey del efecto cicatrizante en los grupos tratados considerando los días de cicatrización.

**HSD Tukey<sup>a</sup>**

GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
Extractor al 75%	4	7,7500				
Extractor al 50%	4		9,5000			
Extracto al 25%	4		10,5000			
Acetato de P.	4			12,0000		
Alcohol 40%	4				13,5000	
Sin tratamiento	4					17,7500
Sig.		1,000	,241	1,000	1,000	1,000

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

Realizado por: CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).

El Análisis de Varianza (ANOVA), se empleó para diferenciar estadísticamente los grupos investigativos, el p-value es 1,1479 E-13, siendo menor al valor de significancia (0.05) con 95% de confianza, este valor nos indica que la hipótesis alternativa se acepta, es decir que al menos un par de grupos participantes en la investigación es diferente; debido que existe un grupo que no tiene

ningún tipo de tratamiento, por esta razón se realizó la prueba de Tukey con el mismo nivel de confianza.

La prueba de comparaciones múltiples, reveló que los tratamientos son significativamente diferentes, excepto el tratamiento con el Extracto al 50% y el extracto al 25%, ya que el tiempo de cicatrización es similar, es decir que el resultado será igual si se aplica cualquiera de los dos tratamientos. Se evidenció estadísticamente que el extracto al 75 % es el más adecuado, puesto que difiere significativamente de los demás tratamientos y grupos controles, el control negativo tuvo una cicatrización natural, evidenciando una cicatrización más prolongada en comparación a los extractos de hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca).

Estudios realizados por Cabezas, G., (2014) en ratones *Mus musculus* del extracto hidroalcohólico de Mastuerzo (*Tropaeolum majus*) a 20 %, 40% y 80%, según este estudio el extracto al 80% se obtuvo 10 días de cicatrización, siendo el extracto más efectivo. Y el estudio realizado por Robalino, C., (2014), en su tema de investigación "Evaluación del efecto antidiarreico y cicatrización de la infusión y del extracto etanólico de *Cyclosporum leptophyllum* (Pers.) Sprague EN RATONES (*Mus musculus*) Y CONEJOS (*Oryctolagus cuniculus*)" indicó que los extractos al 50% y 100% tienen 10 días de cicatrización, siendo el tratamiento más eficaces según indica el autor; al comparar con la investigación se demostró que el extracto alcohólico de hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca) al 75 % obtuvo 8 días de cicatrización, observando un alto poder cicatrizante de las hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* que los estudios realizados anteriormente, evidenciando la eficacia del tratamiento con el extracto alcohólico *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca).

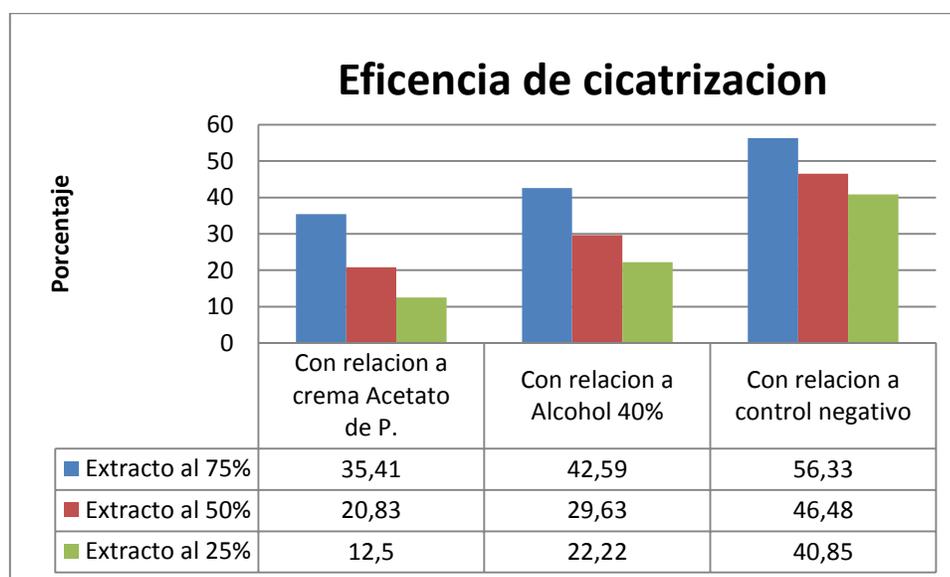
De acuerdo a Montealegre, P., y Murillo E., en el año 2012, con su tema "Actividad antiinflamatoria y antioxidante de *Bauhinia kalbreyeri* Harms en un modelo de inflamación intestinal agudo en ratas" y el estudio de Murillo E., en el año 2007 con su tema de investigación "Potencial Antioxidante de *Bauhinia Kalbreyeri* Harms (FABACEAE)", se evidenció la presencia de antioxidantes en la especie *Bauhinia*, debido a la presencia de compuestos fenólicos; debido la presencia de taninos en el extracto alcohólico *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca) pueden ser las responsables de la rápida acción curativa de la lesión en ratones.

**3.7.2. Eficiencia de cicatrización de heridas comparando los grupos de investigación con los grupos control.**

**Tabla 17-3:** Porcentaje de eficiencia de cicatrización de heridas comparando los grupos de investigación con los grupos controles.

TRATAMIENTO	Con relación a Crema Acetato de P.	Con relación a Alcohol 40 %	Con relación a Control Negativo
Extracto 25%	12,5	22,22	40,85
Extracto 50%	20,83	29,63	46,48
Extracto 75%	35,41	42,59	56,33

Realizado por: CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).



**Grafico 2-3.** Eficiencia de cicatrización

Realizado por: Chaglla Jimena, 2015.

En la tabla se mostró los resultados del porcentaje de eficiencia del proceso de cicatrización, donde el extracto el extracto al 75% tiene una eficacia notable de 35,41% con relación a la crema Acetato de Prednisolona – Sulfato de Neomicina (Control +), de igual forma con el grupo positivo evaluado con Alcohol al 40% se observó una eficacia de 42,59% y con respecto al control negativo, presentó una eficacia de 56,33%. Los datos obtenidos en el evaluación del efecto cicatrizante del extracto de hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca), se demostró que todos los extractos cumplen

con las expectativas de cicatrización al ser más eficaces que los grupos controles, sobre todo el extracto al 75%.

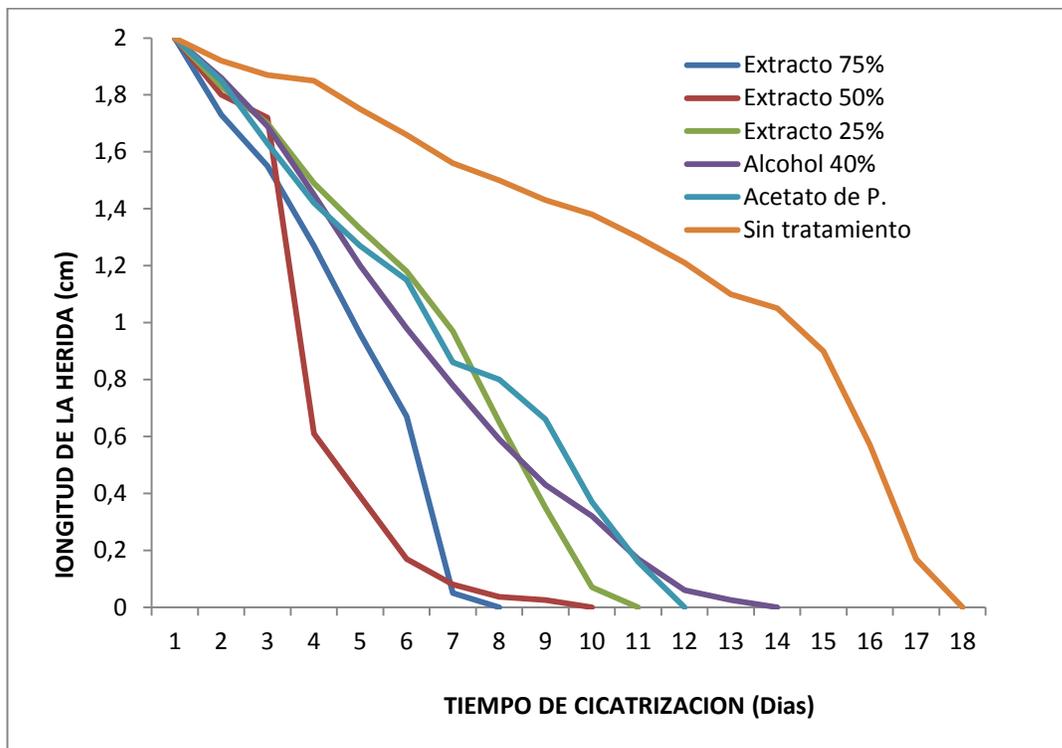
**3.7.3. Longitud de la herida al finalizar el tratamiento para cada uno de los grupos investigativos.**

**Tabla 18-3:** Longitud de la herida al finalizar el tratamiento de los grupos investigativos.

<b>Extracto de <i>Bauhinia tarapotensis</i> Benth (Pata de Vaca)</b>						
<b>LONGITUD DE LA HERIDA (cm)</b>						
<b>DIAS DE CICATRIZACION N</b>	<b>Extracto al 75%</b>	<b>Extracto al 50%</b>	<b>Extracto al 25 %</b>	<b>Acetato de P.</b>	<b>Alcohol 40%</b>	<b>Sin tratamiento</b>
1	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
2	1,73±0,04	1,80±0,041	1,83±0,04	1,85±0,04	1,86±0,048	1,92±0,02
3	1,55±0,09	1,72±0,024	1,7±0,041	1,63±0,03	1,69±0,042	1,87±0,02
4	1,27±0,06	0,61±0,027	1,49±0,04	1,42±0,02	1,45±0,043	1,85±0,04
5	0,96±0,14	0,39±0,041	1,33±0,05	1,27±0,02	1,20±0,041	1,75±0,07
6	0,67±0,20	0,17±0,065	1,18±0,04	1,15±0,03	0,98±0,118	1,66±0,04
7	0,05±0,05	0,08±0,025	0,97±0,05	0,86±0,04	0,78±0,07	1,56±0,04
8	0,0	0,037±0,04	0,65±0,19	0,80±0,01	0,59±0,041	1,50±0,04
9		0,025±0,05	0,35±0,23	0,66±0,04	0,43±0,048	1,43±0,039
10		0,0	0,07±0,15	0,37±0,02	0,32±0,029	1,38±0,03
11			0,0	0,16±0,05	0,17±0,065	1,3±0,04
12				0,0	0,06±0,048	1,21±0,04
13					0,025±0,02	1,14±0,03

					9	
14					0,0	1,05±0,058
15						0,9±0,08
16						0,57±0,09
17						0,17±0,22
18						0,0
19						
20						
21						

Realizado por: CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).



**Grafico 3-3.** Disminución de la longitud de la herida durante el tratamiento.

Realizado por: Chaglla Jimena, 2015.

Diariamente se midió la variación de la longitud de la herida de cada grupo investigativo, al finalizar el tratamiento todos los grupos presentaron una herida de 0 cm. Los animales de experimentación no presentaron inflamación o irritación de las heridas y los bordes de las mismas fueron lisos. Los días del tratamiento fueron los necesarios para que las heridas de cada ratón perdieran la costra y presentaran una piel renovada. La longitud de la herida en el tratamiento con extracto al 75% tiene una declinación rápida ya que los días de cicatrización fueron menores y el

grupo sin tratamiento por tener más días de cicatrización se dio una disminución de la herida más lenta.

### 3.8. Examen Histopatológico

**Tabla19-4:** Examen Histopatológico de ratones (*Mus musculus*) a los cuales se administró extracto alcohólico de las hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca) a diferentes concentraciones (25 %, 50% y 75%) , control positivo y negativo.

CÓDIGO	EXAMEN MACROSCÓPICO	EXAMEN MICROSCÓPICO
<b>C1</b> (Extracto al 25%)	<b>Cicatriz longitud (cm):</b> 1,07± 0,06 <b>Color:</b> pálida <b>Aspecto:</b> plano y cerrada <b>Forma:</b> longitudinal	<b>Edema:</b> (+) <b>PMN:</b> (-) <b>Tejido conectivo:</b> (++) <b>Epitelización:</b> (+++) <b>Linfocitos:</b> (+) <b>Anexos pilosos:</b> (++)
<b>D2</b> (Extracto al 50%)	<b>Cicatriz longitud (cm):</b> 0,95± 0,04 <b>Color:</b> pálida <b>Aspecto:</b> plano y cerrada <b>Forma:</b> longitudinal	<b>Edema:</b> (+) <b>PMN:</b> (-) <b>Tejido conectivo:</b> (+++) <b>Epitelización:</b> (+++) <b>Linfocitos:</b> (-) <b>Anexos pilosos:</b> (+)
<b>E3</b> (Extracto al 75%)	<b>Cicatriz longitud (cm):</b> 0,84± 0,05 <b>Color:</b> pálida <b>Aspecto:</b> plano y cerrada <b>Forma:</b> longitudinal	<b>Edema:</b> (+) <b>PMN:</b> (-) <b>Tejido conectivo:</b> (+++) <b>Epitelización:</b> (+++) <b>Linfocitos:</b> (-) <b>Anexos pilosos:</b> (++)
<b>G4</b> (Control negativo)	<b>Cicatriz longitud (cm):</b> 1,81±0,02 <b>Color:</b> pálida <b>Aspecto:</b> plano y cerrada <b>Forma:</b> longitudinal	<b>Edema:</b> (++) <b>PMN:</b> (+) <b>Tejido conectivo:</b> (++) <b>Epitelización:</b> (+) <b>Linfocitos:</b> (++) <b>Anexos pilosos:</b> (++)
<b>I5</b>	<b>Cicatriz longitud (cm):</b> 1,57±0,05	<b>Edema:</b> (++) <b>PMN:</b> (-)

(Acetato de Prednisolona- Neomicina Sulfato)	<b>Color:</b> pálida <b>Aspecto:</b> plano y cerrada <b>Forma:</b> longitudinal	<b>Tejido conectivo:</b> (++) <b>Epitelización:</b> (++) <b>Linfocitos:</b> (+) <b>Anexos pilosos:</b> (++)
<b>K6</b> (Alcohol 40%)	<b>Cicatriz longitud (cm):</b> 1,66± 0,04 <b>Color:</b> pálida <b>Aspecto:</b> plano y cerrada <b>Forma:</b> longitudinal	<b>Edema:</b> (++) <b>PMN:</b> (-) <b>Tejido conectivo:</b> (++) <b>Epitelización:</b> (++) <b>Linfocitos:</b> (+) <b>Anexos pilosos:</b> (+)

\*Ausencia: (-). Poco: (+). Moderado: (++) . Mucho: (+++).

Realizado por: CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).

Los parámetros de relevancia en el examen histopatológico es el grado de Epitelización y Tejido conectivo. En los tratamiento con el extracto al 50% , 75 %, 25% y la crema Acetato de Prednisolona- Neomicina Sulfato tienen mayor cantidad de epitelización y tejido conectivo indicando que en el proceso de cicatrización presentó tejido fibroso cicatrizado, es decir una regeneración del epitelio, las nuevas fibras son más cortas y son desorganizadas debido que la cicatriz nunca presenta la fuerza tensora de la piel intacta, cada uno de los grupos investigativos se diferenciaron al número de días que terminó el proceso de cicatrización.

El proceso de recuperación de la lesión incluyen etapas como la inflamación, granulación, fibrosis, producción de colágeno y la epitelización; los cuales se identificaron claramente en los cortes histopatológicos realizados de la piel del ratón, esto se atribuye a la presencia de compuestos fenólicos (flavonoides y taninos) en el extracto de hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca), los compuestos fenólicos poseen propiedades antioxidantes que evita el daño celular y promueve la recuperación de la lesión y su epitelización (Montealegre, P., 2012).

El control (-) presenta PMN y Linfocitos indicándonos la presencia de infección en la herida, tanto para el alcohol al 40% y el control (-) la epitelización y tejido conectivo es bajo, demostrando un retraso en la cierre epitelial de las heridas.

## CONCLUSIONES

- El perfil fitoquímico del extracto seco de hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de vaca), evidenció la presencia de metabolitos secundarios como: flavonoides, taninos, alcaloides, triterpenos y/o esteroides, catequinas, azúcares reductores, cumarinas, demostrando que en *B. tarapotensis Benth* (Pata de Vaca) los constituyentes de naturaleza fenólica son abundantes, diversos y de relevancia para el estudio.
- Del extracto alcohólico de hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* se aislaron flavonoides, mediante cromatografía en capa fina, se evidenció una banda amarilla correspondiente a quercetina, además se identificó otros posibles compuestos como quercetin- 3-O rutinoside (rutin), ácido clorogénico, ácido isoclorogénico y kaempferol demostrando la presencia de varios flavonoides en el extracto *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca).
- El análisis cuantitativo de fenoles totales y flavonoides totales, para el extracto alcohólico e hidroalcohólico de hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca), presentó altos valores de fenoles totales en el extracto alcohólico, siendo el mejor solvente para extraer los constituyentes activos de la planta.
- El control de calidad del extracto alcohólico de hojas *Bauhinia tarapotensis Benth* cumplió con los parámetros físico químico y microbiológico según la Norma Ramal de Salud Pública (NRSP 309, 311 y 312) y la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2 392:2007 respectivamente, garantizando la calidad del extracto para el estudio IN VIVO en animales de experimentación.
- La actividad cicatrizante comprobada en heridas inducidas en ratones (*Mus musculus*), indica que las hojas de *Bauhinia tarapotensis Benth* acelera el proceso de cicatrización, el extracto alcohólico al 75 % mostró un resultado resolutivo superior al Acetato de Prednisolona-Neomicina Sulfato y Alcohol 40%, al presentar menos días de cicatrización, y una disminución de la longitud de herida más rápida en relación a los demás grupos investigativos. Aportando conocimientos al campo farmacéutico y su aplicación en la medicina clínica a su vez en el desarrollo científico y económico del país.

## RECOMENDACIONES

- Realizar estudios sobre la corteza de *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca), ya que se atribuyen propiedades diuréticas, digestivas y antioxidantes.
- Elaborar un fitofármaco a base de *Bauhinia tarapotensis Benth* (Pata de Vaca), con forma farmacéutica adecuada para su aplicación.
- Probar otras combinaciones para lograr la mayor optimización durante el proceso de cicatrización.
- Al conocer que la actividad cicatrizante del vegetal es resolutive, se recomienda continuar con la comprobación clínica y análisis de toxicidad para la elaboración de una forma farmacéutica.

## BIBLIOGRAFÍA

**ALONSO, J.** *Tratado de fitofármacos y nutraceuticos*. 2<sup>da</sup> Edición. Argentina: Editorial Corpus, 2004, pp. 875-876.

**ANIMANATURALIS.** *Experimentación de animales* [en línea]. [Consulta: 21 septiembre 2015]. Disponible en:

<<http://www.animanaturalis.org/p/538>>

**BARRÓN, R. ET AL.** “Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev”. *Fitotecniamexicana* [en línea], 2001, (México), Vol. 34, No 3. pp. 151-157. [Consulta: 20 septiembre 2015]. ISSN 0187-7380. Disponible en:

<<http://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/34-3/1a.pdf>>

**BORGER, A.** *Cicatrices inestéticas Prevención y Tratamiento*. Barcelona-España. Editorial Labor, 1997, pp.15-30.

**BONIFAZ, C.** *Ecuador en cambios* [en línea]. [Consulta: 25 enero 2015]. Disponible en:

<http://periodicoexpectativa.com/laclavedelainformacion/index.php/89-noticias/noticiasgenerales/3333-senplades-inician-cambio-de-la-matriz-productiva>.

**CABEZAS, Gabriela.** *Evaluación del efecto cicatrizante de extractos a base de Mastuerzo (*Tropaeolum majus*) en ratones (*Mus musculus*)*. (Tesis pregrado), Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Riobamba - Ecuador. 2014, pp.60-62.

**CAMPOVERDE, J. & VERDUGO, M.** *Determinación del efecto cicatrizante de las hojas de Carne Humana (*Jungia cf. rugosa*)*. (Tesis pregrado), Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Cuenca-Ecuador. 2008, pp. 22-85. Disponible en: <<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/20266/1/TESIS.pdf>>

**CARRIÓN, A, & GARCÍA, C.** *Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica*. (Tesis pregrado), Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas, Escuela de

Bioquímica y Farmacia, Cuenca- Ecuador. 2010, pp. 15-55. Disponible en: <<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2483/1/tq1005.pdf>>

**CASTRO, S.** *Evaluación del fruto del Muyuyo (Cordia lutea Lamarck, BORAGINACEAE), como ingrediente cosmético para la elaboración de fijadores de cabello.* (Tesis posgrado), Universidad Politécnica Sede en Quito, Unidad de posgrado en Ciencias y Tecnologías Cosméticas, Quito-Ecuador. 2015, p. 57. Disponible en: <<http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/9029>>

**CHAMORRO, D.** *Los Sistemas silvopastoriles en la ganadería bovina del trópico bajo colombiano.* Bogotá-Colombia: Editorial Corpoica, p. 18.

**CHATEAUNEUF, R.** *Plantas Medicinales y Medicina Natural. Conversaciones con el Ing. Roberto Williams Benavente.* 2<sup>da</sup> Edición. Santiago de Chile-Chile: Editorial Corpoica, 2012, pp. 3-5.

**CHEN, J.** “Fisiopatología de la cicatrización de la herida aguda”, 2007, pp. 9-18.

**CONVENTION PHARMACOPEIAL.USP No 25.** *Prepared by the council of experts and published by the board of trustees official from January I.* Washington- Estados Unidos, Editorial Spring : 2005, pp. 1568 –1590.

**CUSTODIO, J.** *Cicatrización* [en línea]. [Consulta: 07 agosto 2015]. Disponible en: <<http://es.slideshare.net/jcustodio91/cicatrizacin-13510640>>

**DARR, A.** *Extractos de plantas medicinales* [en línea]. [Consulta: 07 agosto 2015]. Disponible en: <<http://www.laboratorio.takiwasi.org/esp/extract.php>>

**DIVINS, M.** *Cicatrizantes y Protectores Dermatológicos.* *Revista Elsevier* [en línea], 2010, Vol. 24. No. 4, pp. 36-39. [Consulta: 10 agosto 2015]. ISSN 112-120. Disponible en: <<http://www.elsevier.es&lan=es&fichero=3v24n04a13153901pdf001.pdf>>

**ENOCH, S. y LEAPER, D.** *Basic science of wound healing.* *The Medicine Publishing Company Ltd.* [en línea], 2011, (Londres), Vol. 1. No. 1, pp. 14-17. [Consulta: 20 agosto 2015]. Disponible en:

<[http://www.wjmer.co.uk/downloads/JOURNAL\\_FLIP\\_BUK/individual\\_pdfs/WJMER\\_Vol1\\_Article\\_5.pdf](http://www.wjmer.co.uk/downloads/JOURNAL_FLIP_BUK/individual_pdfs/WJMER_Vol1_Article_5.pdf)>

**FORTUNATO, A Y WUNDERLIN, J.** *Bauhinia forficata link subsp. pruinosa (vogel) Fortunato & Wunderlin.* [Consulta: 22 agosto 2015]. Disponible en:  
<[http://cauba.fcien.edu.uy/pdf/Ficha\\_Bauhinia-forficata.pdf](http://cauba.fcien.edu.uy/pdf/Ficha_Bauhinia-forficata.pdf)>

**GALLEGOS, J.** *Manual de Practicas de Microbiología.* Riobamba – Ecuador, 2003, pp. 38-52.

**GEILFUS, F., BAILÓN, P.** *El árbol al servicio del agricultor: Guía de especies.* 2<sup>da</sup> Edición. Vol. 2, Publicado por Bib. Orton IICA / CATIE. San José-Costa Rica, 1994, p. 511.

**GRACIA, O.** *Breve historia de las Plantas Medicinales. Tomillo en mi jardín* [en línea], (2013). [Consulta: 07 agosto 2015]. Disponible en:  
<[http://tomilloenmijardin.blogspot.com/2013\\_06\\_01\\_archive.html](http://tomilloenmijardin.blogspot.com/2013_06_01_archive.html)>

**GUARIN, C., LANDINEZ, N. & QUIROGA P.** Proceso de Cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas. *Revista Scielo* [en línea], 2013, Bogota-Colombia, Vol. 61. No. 4, pp. 441-448. [Consulta: 12 septiembre 2015]. ISSN- 441-448. Disponible en: <<http://www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v61n4/v61n4a14.pdf>>

**HAUAD MARROQUIN, L.** *Fitoterapia* . 1<sup>ra</sup> Edición. México, 2010, pp. 10-20.

**KOHLER, P.** *El poder curativo del ginkgo salud natural desde los pies a la cabeza.* 1<sup>ra</sup> Edición. Buenos Aires- Argentina, 1999, pp. 60-69.

**LOCK, O.** *Análisis de flavonoides en plantas* [en línea], Iupac. [Consulta: 20 agosto 2015]. Disponible en: <[http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry/Practica-VI-6.pdf](http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-VI-6.pdf)>

**LOOK DE UGAZ, Olga.** *Investigación Fitoquímica.* 2<sup>da</sup> Edición. Lima-Perú: Fondo Editorial, 1988, pp.111-197.

**MIRANDA, M.** *Folleto de métodos de análisis de droga y extractos. Instituto de farmacia y alimentos.* 2<sup>da</sup> Edición. Habana-Cuba, pp. 6-36.

**MONTEALEGRE MORENO, Paola; & TURNER, Liana.** Actividad antiinflamatoria y antioxidante de *Bauhinia kalbreyeri* Harms en un modelo de inflamación intestinal agudo en ratas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales Scielo* [en línea], 2012, Bogota-Colombia. Vol. 17. No. 4. [Consulta: 12 septiembre 2015]. ISSN- 42333-9721. Disponible en: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962012000400006&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962012000400006&script=sci_arttext)>

**MS. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio,** Lima-Perú, 2008, pp. 23-32.

**MUÑOZ, O., MONTES, M., WILKOMIRSKY, T.,** *Plantas medicinales de uso en Chile: Química y farmacología.* 2<sup>da</sup> Edición. Santiago de Chile-Chile: Editorial Universitaria, 2004, pp. 57-58.

**MURILLO, Elizabeth.** Potencial Antioxidante de *Bauhinia kalbreyeri* Harms (FABACEAE). *Revista Scielo* [en línea], 2007, Bogota-Colombia. Vol. 6. No. 18. [Consulta: 12 septiembre 2015]. ISSN: 0718-0764. Disponible en: <[http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642007000600009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642007000600009&script=sci_arttext)>

**NORMA RAMAL DE SALUD PÚBLICA (NRSP) 309, 311 y 312.** Farmacognosia y Productos Naturales. Habana, 1992, pp. 57,58,59,60.

**NORMA TECNICA ECUATORIANA NTE INEN 2 392:2007.** Hiervas Aromáticas. Requisitos.

**OJEWOLE, J. ET AL.** Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract, *Revista Elsevier* [en línea], 2005, Sudafrica. Vol. 99. No 1, pp. 13-19. [Consulta: 12 septiembre 2015]. Disponible en: <<https://translate.google.com.ec/translate?hl=es419&sl=en&u=http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874105000693&prev=search>>

**OROZCO M.** *Evaluación de la actividad cicatrizante de un gel elaborado a base de los extractos de Molle (Schinus molle), Cola de caballo (Equisetum arvense I.), Linaza (Linum usitatissimum I.) en ratones (Mus musculus)* (Tesis pregrado), Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Riobamba, Ecuador, 2013, pp.16-20.

**PADRÓ RODRIGUEZ L. & MARÍN MORAN J.** “Evaluación preliminar de la estabilidad física, físico-química y microbiología de la tintura de Itamo Real 20%”. Ojs. 2008, Habana-Cuba, Vol. 20. No. 1, pp. 24-30. [Consulta: 20 septiembre 2015]. Disponible en <<http://ojs.uo.edu.cu/index.php/cq/article/viewFile/2339/1875>>

**PAYROL, J. ET AL.** Determinación de Parámetros Farmacognósticos y Bromatológicos y evaluación de la actividad antiparasitaria de una preparación obtenida del fruto de *Bromelia pinguin* L. que crece en Cuba. *Latamjpharm* [en línea], 2005, Habana-Cuba, Vol. 24. No. 3, pp. 377-382. [Consulta: 08 septiembre 2015]. ISSN 0326-2383. Disponible en: <[http://www.latamjpharm.org/trabajos/24/3/LAJOP\\_24\\_3\\_1\\_9\\_P2M96P07K5.pdf](http://www.latamjpharm.org/trabajos/24/3/LAJOP_24_3_1_9_P2M96P07K5.pdf)>

**PLANTAS PARA CURAR (PPC).** *El árbol de pata de vaca* [en línea]. [Consulta: 20 agosto 2015]. Disponible en: <<http://www.plantasparacurar.com/el-arbol-de-pata-de-vaca/>>

**REAL DECRETO ESPAÑOL 53/2013.** Experimentación Animal, pp.2-7.

**PÉREZ, S.** *Estructura y funciones de la piel* [en línea]. [Consulta: 22 agosto 2015]. Disponible en: <<http://es.slideshare.net/syv9885/pdf-estructura-y-funciones-de-la-piel>>

**RIVERA, V.** *Fisiología de la cicatriz* [en línea]. [Consulta: 22 agosto 2015]. Disponible en: <[http://www.medicosecuador.com/librosecng/articulos/1/fisiologia\\_de\\_la\\_cicatricacion.htm](http://www.medicosecuador.com/librosecng/articulos/1/fisiologia_de_la_cicatricacion.htm)>

**SALEM, C., PEREZ J; HENNING, E et al.** Heridas conceptos generales. *Revista Cuad. Cir.* Vol. 14, No. 01, 2000, pp. 90 - 99. [Consulta: 08 septiembre 2015]. ISSN: 90-99. Disponible en: <<http://mingaonline.uach.cl/pdf/cuadcir/v14n1/art15.pdf>>

**SALVADOR, C.** La Fitoterapia ¿una terapéutica para el tercer milenio?. *Revista de Fitoterapia* [en línea], 2002, Barcelona- España, Vol. 2, No. 2, pp. 101-103. [Consulta: 08 septiembre 2015]. ISSN: 101-121. Disponible en: <[http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RDF2\\_2\\_FITOTERAPIA.pdf](http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RDF2_2_FITOTERAPIA.pdf)>

**SATYENDRA et al.** Wound healing Potential of *Viscum Articulum Berm.*, An Ethnomedicinal Plant of Sikkim on Rat. *Pharmascope* [en línea], 2012, Vol. 1, India. pp. 138-142. [Consulta: 07 septiembre 2015]. Disponible en: <<http://F:/published-pdf-00234-6-4-138-142.pdf>>

**SINGER, & SINGER, A.** Cicatrización de heridas Cutaneas, 2<sup>da</sup> Edición, 1999, pp.738-746.

**SLIDESHARE.** *Control de calidad de drogas vegetales* [en línea]. [Consulta: 07 septiembre 2015]. Disponible en: <<http://es.slideshare.net/BerthaJurado/control-de-calidad-de-drogas-vegetales-44418748>>

**STELLA, J.** *La Inflamación* [en línea], Acadnacmedicina. [Consulta: 07 septiembre 2015]. Disponible en: <[http://www.acadnacmedicina.org.pe/publicaciones/Anales\\_2005/2Inflamacion\\_Wirchow\\_Arias.pdf](http://www.acadnacmedicina.org.pe/publicaciones/Anales_2005/2Inflamacion_Wirchow_Arias.pdf)>

**SOSA, S. et al.** Topical anti-inflammatory activity of *Bauhinia tarapotensis* leaves. *Revista Elsevier* [en línea], 2002, Roma-Italia, Vol. 9, No. 7, pp. 646-653. [Consulta: 07 septiembre 2015]. ISSN 0944-7113. Disponible en: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711304701695>>

**TERRANOSTRA.** *Pata de vaca- bauhinia candicans benth* [en línea]. [Consulta: 07 septiembre 2015]. Disponible en:<<http://terranostra-terranostra.blogspot.com/2009/11/pata-de-vacabauhinia-candicans-benth.html>>

**UNICAM.** *La piel: estructura y funciones* [en línea]. [Consulta: 15 septiembre 2015]. Disponible en: <[http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/fisiologia-general/materiales-de-clase-1/bloque-ii/Tema%2011-Bloque%20II La%20Piel.%20Estructura%20y%20Funciones.pdf](http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/fisiologia-general/materiales-de-clase-1/bloque-ii/Tema%2011-Bloque%20II%20La%20Piel.%20Estructura%20y%20Funciones.pdf)>

**URQUIZO, F.** *Comparación del efecto adelgazante de las hojas Pata de Vaca (Bauhinia sp.) en extracto hidroalcohólico, mediante homeopático y microdosis en personas con sobrepeso.* (Tesis pregrado), Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Riobamba-Ecuador, 2012, pp. 19-94.

**USP XXVIII NF 18.** Pharmacopeia National Formular, 1985, pp. 1267, 1268, 2065, 2069.

**VACA, S.** *Cicatrices y heridas* [en línea]. [Consulta: 15 septiembre 2015]. Disponible en: <<http://www.cancer.org/espanol/servicios/cuidadoresdelasalud/fragmentado/la-atencion-del-paciente-con-cancer-en-el-hogar-una-guia-para-los-pacientes-y-sus-familias-care-at-home-scars-and-wounds>>

**VALVERDE, E.** *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapeuticos*. Bogotá- Colombia: Editorial Convenio Andrés Bello, 2000, pp. 28-59.

**VELANDIA PARDO, D.** *Evaluación de la actividad cicatrizante y caracterización fitoquímica de Dracontium croatii*, (Tesis de maestría), Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, 2009, pp. 12-14. Disponible en : <<http://www.bdigital.unal.edu.co/8469/1/192529.2009.pdf>>

**VIDANATURALIA.** *Estructura y funciones de la piel* [en línea]. [Consulta: 15 septiembre 2015]. Disponible en: <<http://www.vidanaturalia.com/estructura-y-funciones-de-la-piel/>>

**VILLAREAL DE LA TORRE, V. et al.** Estudio farmacognosico de la semilla de Phalaris canariensis L. (alpiste) y su cuantificación de esteroides. *Revista Sciéndo* [en línea], 2010, Lima-Perú, Vol.13, No. 2, pp. 11-15. [Consulta: 08 septiembre 2015]. ISSN 1681-7230. Disponible en: <<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:6ql6nndREggJ:revistas.unitru.edu.pe/index.php/SCIENDO/article/view/283/286+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=ec>>

**WAGNER, H.** *Plant Drug Analysis*. 2<sup>da</sup> Edición. Munich-Alemania, 2001, pp. 201-226.

**WJMER.** *Fundamentals of acute wound healing* [en línea]. [Consulta: 15 septiembre 2015]. Disponible en: <[http://www.wjmer.co.uk/downloads/JOURNAL\\_FLIP\\_BUK/individual\\_pdfs/WJMER\\_Vol1\\_Article\\_5.pdf](http://www.wjmer.co.uk/downloads/JOURNAL_FLIP_BUK/individual_pdfs/WJMER_Vol1_Article_5.pdf)>

## ANEXOS

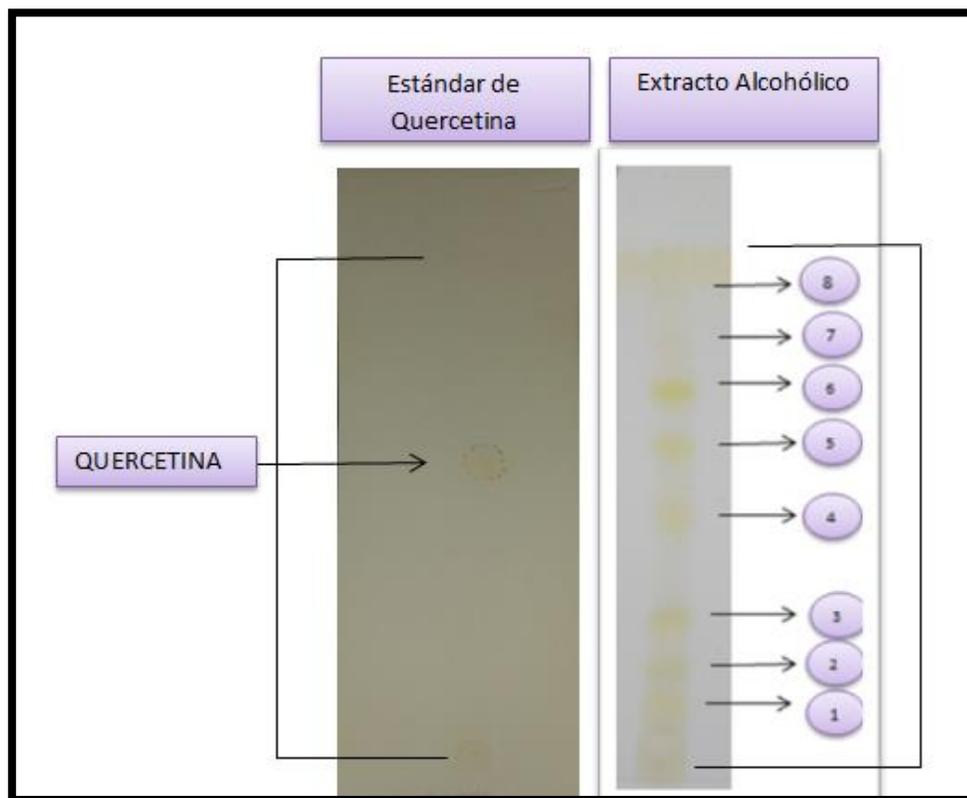
### ANEXO A. PESO DE RATÓNES PARA EL ESTUDIO

<b>TRATAMIENTO (EXTRACTO AL 75 %)</b>	<b>PESO (g)</b>
1	35.6
2	36.3
3	36.8
4	37.0
<b>TRATAMIENTO (EXTRACTO AL 50 %)</b>	<b>PESO (g)</b>
1	36.4
2	37.0
3	38.2
4	38.1
<b>TRATAMIENTO (EXTRACTO AL 25 %)</b>	<b>PESO (g)</b>
1	38.5
2	38.1
3	36.9
4	38.3
<b>CONTROL (+) ALCOHOL 40 %</b>	<b>PESO (g)</b>
1	36.6
2	36.8
3	37.3
4	37.4
<b>CONTROL (+) ACETATO DE P.</b>	<b>PESO (g)</b>
1	37.3
2	36.6
3	36.7
4	37.0
<b>CONTROL (-) SIN TRATAMIENTO</b>	<b>PESO (g)</b>
1	37.5
2	37.2
3	36.4
4	36.9

**ANEXO B. SEGUIMIENTO DIARIO DEL PROCESO DE CICATRIZACION EN RATONES***(Mus musculus)*

<b>Extracto de <i>Bauhinia tarapotensis Benth</i> (Pata de Vaca)</b>						
<b>LONGITUD DE LA HERIDA (cm)</b>						
<b>DIAS DE CICATRIZACION</b>	Extracto al 75%	Extracto al 50%	Extracto al 25 %	Acetato de P.	Alcohol 40%	Sin tratamiento
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						

## ANEXO C. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA



## ANEXO D. CONTROL DE CALIDAD DE LA MUESTRA VEGETAL



**FOTOGRAFÍA N°1**  
Determinación de Humedad



**FOTOGRAFÍA N°2**  
Determinación de Cenizas Totales



**FOTOGRAFÍA N°3**

Determinación de Cenizas Solubles en Agua



**FOTOGRAFÍA N°4**

Determinación de Cenizas Insolubles en HCl

#### ANEXO E. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS



**FOTOGRAFÍA N°5**

Material vegetal seco



**FOTOGRAFÍA N°6**

Material vegetal pulverizado



**FOTOGRAFÍA N°7**

Maceración

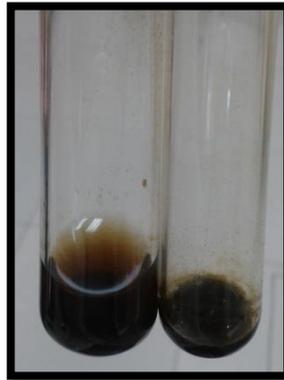
		
<p align="center"><b>FOTOGRAFÍA N°8</b> Filtración</p>	<p align="center"><b>FOTOGRAFÍA N°9</b> Concentración de extracto</p>	<p align="center"><b>FOTOGRAFÍA N°10</b> Extractos en frascos ámbar</p>

**ANEXO F. TAMIZAJE FITOQUIMICO**


<p align="center"><b>FOTOGRAFÍA N°11</b> Tamizaje Fitoquímico del extracto etéreo, alcohólico y acuoso</p>



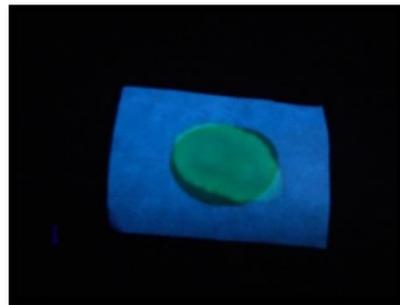
**FOTOGRAFÍA N°12**  
Ensayo de Shinoda



**FOTOGRAFÍA N°13**  
Ensayo de Cloruro Férrico



**FOTOGRAFÍA N°14**  
Ensayo de Antocianidinas



**FOTOGRAFÍA N°15**  
Ensayo de Catequinas

**ANEXO G. PARÁMETROS DE CALIDAD DE DEL EXTRACTO (*Bauhinia tarapotensis* Bent)**



**FOTOGRAFÍA N°15**  
Determinación del pH



**FOTOGRAFÍA N°16**  
Determinación densidad relativa



**FOTOGRAFÍA N°17**  
Determinación índice de refracción

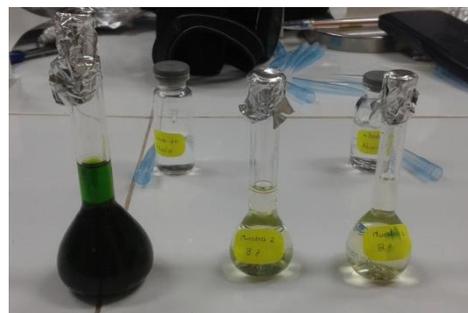


**FOTOGRAFÍA N°18**  
Determinación sólidos solubles

**ANEXO H. CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y FENOLES TOTALES**



**FOTOGRAFÍA N°19**  
Cuantificación de flavonoides totales



**FOTOGRAFÍA N° 20**  
Cuantificación de fenoles totales

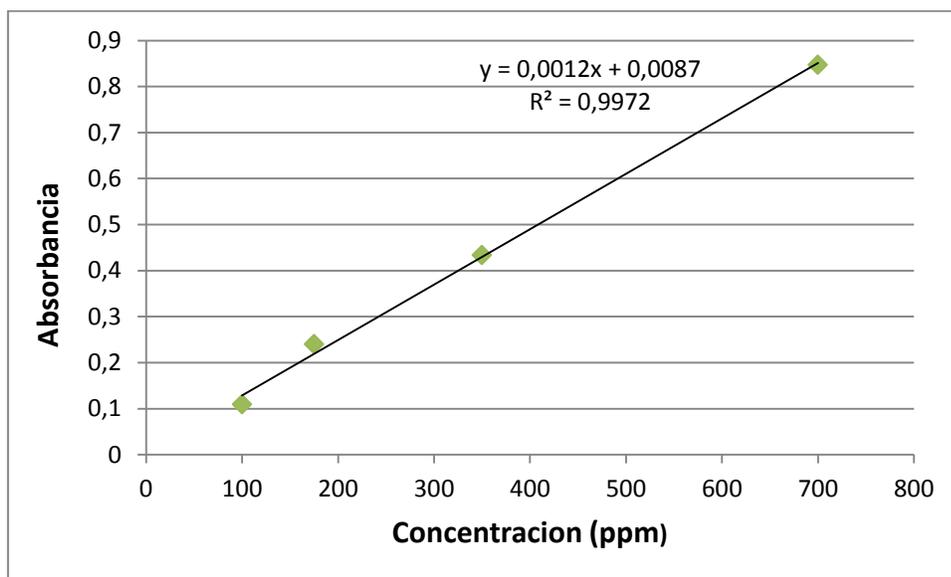


**FOTOGRAFÍA N°21**  
Lectura en el Espectrofotómetro

### Cuantificación de Flavonoides en función de quercetina

CONCENTRACIÓN (ppm)	ABSORBANCIAS
100	0,109
175	0,240
350	0,433
700	0,847

Realizado por: CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).

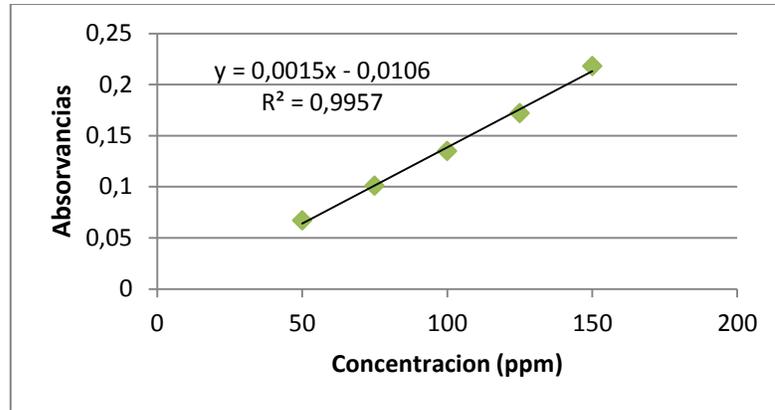


Realizado por: CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).

### Cuantificación de Fenoles en función de ácido gálico

CONCENTRACIÓN (ppm)	ABSORBANCIAS
50	0,067
75	0,101
100	0,135
125	0,172
150	0,218

Realizado por: CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).



Realizado por: CHAGLLA, J. Laboratorio I&D Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias, ESPOCH (2015).

## ANEXO I. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

<p align="center"><b>FOTOGRAFÍA N° 24</b> Detección de Coliformes totales y Fecales</p>	<p align="center"><b>FOTOGRAFÍA N° 25</b> Detección de Mohos y Levaduras</p>
<p align="center"><b>FOTOGRAFÍA N° 26</b> Detección de Aerobios mesófilos</p>	<p align="center"><b>FOTOGRAFÍA N° 27</b> Diluciones de las muestras</p>

**ANEXO J. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE**

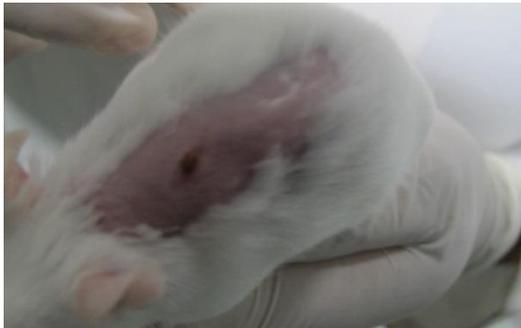
	
<p><b>FOTOGRAFÍA N° 28</b> Grupos de investigación</p>	<p><b>FOTOGRAFÍA N° 29</b> Peso de los ratones para evaluar la actividad cicatrizante</p>
	
<p><b>FOTOGRAFÍA N° 30</b> Depilación de los ratones</p>	<p><b>FOTOGRAFÍA N° 31</b> Inducción de la herida (2 cm)</p>



**FOTOGRAFÍA N° 32**  
Tratamientos



**FOTOGRAFÍA N° 33**  
Aplicación de los extractos



**FOTOGRAFÍA N° 34**  
Formación de la costra



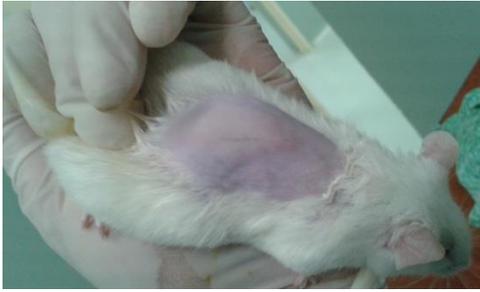
**FOTOGRAFÍA N° 35**  
Desprendimiento de la costra del extracto 50  
% (Día 4)



**FOTOGRAFÍA N° 36**  
Control negativo (Día 5)



**FOTOGRAFÍA N° 37**  
Medición de la herida



**FOTOGRAFÍA N° 38**  
Herida cerrada del extracto 75 %



**FOTOGRAFÍA N° 39**  
Corte para en examen histopatológico



**FOTOGRAFÍA N° 40**  
Conservación de los cortos en formol 10%



**FOTOGRAFÍA N° 41**  
Placas para leer en el microscopio

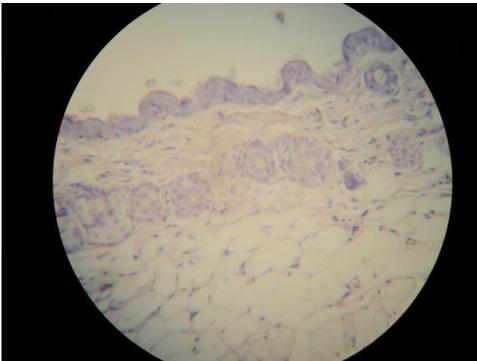
**ANEXO K. EXAMEN HISTOPATOLÓGICO**



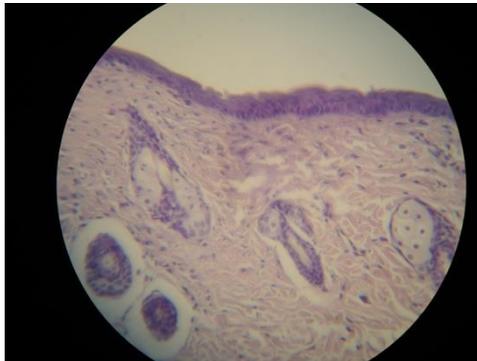
**FOTOGRAFÍA N° 42**  
Control (-)



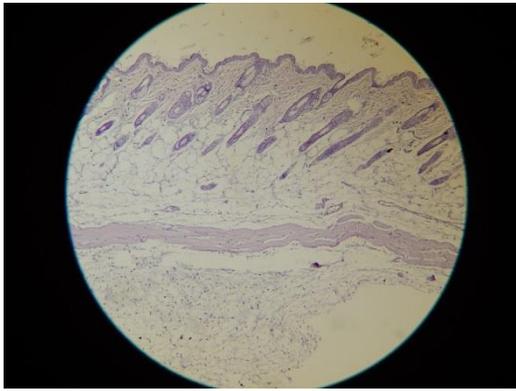
**FOTOGRAFÍA N° 42**  
Tratamiento al 25 %



**FOTOGRAFÍA N° 43**  
Tratamiento al 50 %

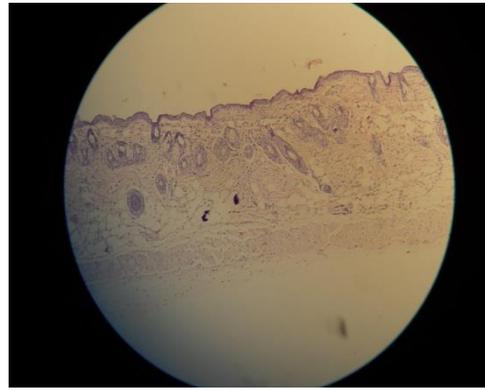


**FOTOGRAFÍA N° 44**  
Tratamiento al 75 %



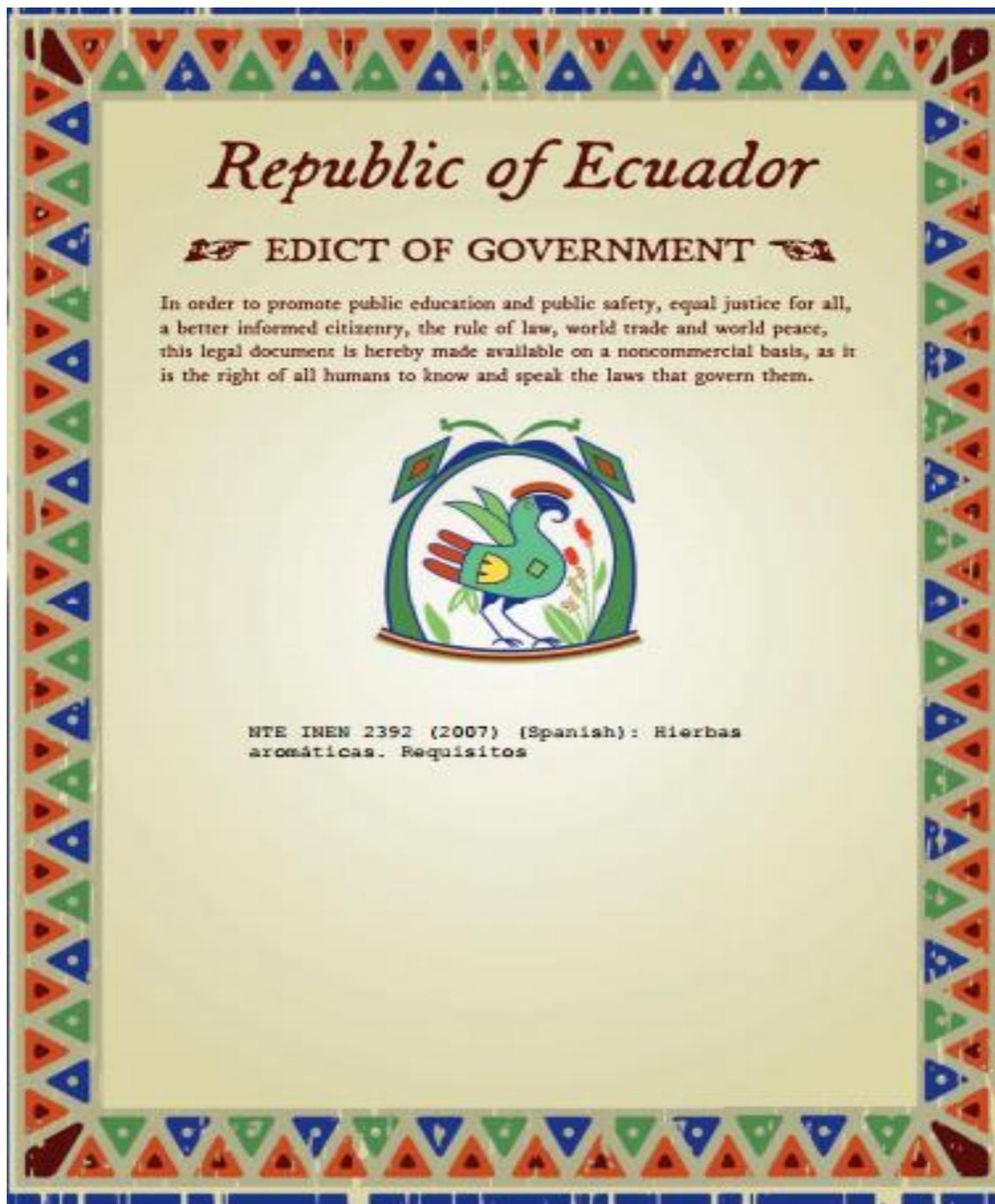
**FOTOGRAFÍA N° 45**

Control (+)



**FOTOGRAFÍA N° 46**

Control (+)



**TABLA 2. Contenido de aceites esenciales**

Hierba Aromática	Aceite esencial, % Min	Método de ensayo AOAC 968.20
Anís estrella*	5,0	
Anís verde*	2,0	
Canela	1,2	
Cedrón	0,2	
Clavo de Olor	13,0	
Eneldo	3,0	
Eucalipto	1,5	
Falso tilo	0,03	
Hierba buena	0,08	
Hierba luisa	3,0	
Limonero	2,5	
Manzanilla	0,2	
Mejorana	0,7	
Menta	0,25	
Naranja	0,2	
Orégano	0,5	
Romero	1,5	
Rosa	0,01	
Tipo	1,2	
Tomillo	1,5	
Toronjil	0,3	

6.1.3 Los requisitos microbiológicos que deben cumplir las hierbas aromáticas, son los que se especifican en la tabla 3.

**TABLA 3. Requisitos Microbiológicos**

REQUISITO	Máx	Método de ensayo
Aerobios totales ufc/g	$1 \times 10^7$	NTE INEN 1529-5
Escherichia coli ufc/g	$1 \times 10$	NTE INEN 1529-7
Enterobacteriaceas ufc/g	$1 \times 10^3$	NTE INEN 1529-13
Mohos y levaduras upc/g	$1 \times 10^4$	NTE INEN 1529-10
Clostridium, ufc/g	ausencia	NTE INEN 1529-18
Salmonella, en 1 g	ausencia	NTE INEN 1529-15
Shigella, en 1 g	ausencia	NTE INEN 1529-16

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

**TABLA 4. Contenido máximo de contaminantes**

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

## 5. DISPOSICIONES ESPECÍFICAS

5.1 Las hierbas aromáticas, destinadas para preparar infusiones, en la etiqueta de su envase no deben declarar propiedades terapéuticas para prevenir o curar enfermedades.

## 6. REQUISITOS

### 6.1 Requisitos Específicos

6.1.1 Se consideran hierbas aromáticas a las siguientes <sup>(1)</sup>:

Nombre común	Nombre científico	Parte usada
Anís estrella	<i>Illicium anisatum</i>	Fruto
Anís verde (pan de anís)	<i>Pimpinella anisum</i>	Fruto
Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> <i>Cinnamomum cassia</i>	Corteza
Cedrón	<i>Aloysia triphylla (L. Her) Britton</i>	Hojas
Clavo de olor	<i>Eugenia caryophyllus</i>	Flores,
Eneldo	<i>Anethum graveolens</i>	Tallo, hojas, flores
Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i>	Hojas
Falso tilo (sauco)	<i>Sambucus nigra L.</i>	Flores
Hierbabuena	<i>Mentha spicata,</i>	Hierba, hojas y copos florescentes
Hierba luisa	<i>Cymbopogon citratus</i>	Hojas
Jazmín	<i>Jasminum officinale</i>	Flores
Limón	<i>Citrus limonum, Citrus limetta</i>	Hojas, fruto, cáscara,
Manzanilla	<i>Matricaria camomila,</i>	Flores y planta
Mejorana	<i>Origanum majorana</i>	Partes aéreas
Menta	<i>Mentha pulegium</i> <i>Mentha piperita</i>	Partes aéreas
Naranja	<i>Citrus aurantium</i>	Hojas y flores
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Partes aéreas
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Partes aéreas
Rosa	<i>Rosa spp</i>	Flores, escaramujo
Tipo	<i>Minthostachys mollis</i>	Tallo, hoja, flores
Tomillo	<i>Thymus vulgaris L.</i>	Parte aérea
Toronjil	<i>Melissa officinalis</i>	Partes aéreas

<sup>(1)</sup> Esta lista no excluye la utilización de otras plantas que luego de su estudio toxicológico, y contenido de aceites esenciales, hayan sido aprobadas como tales por el Ministerio de Salud a través del Instituto de Higiene.

6.1.2 Las hierbas aromáticas, deben cumplir los requisitos establecidos en las siguientes tablas:

**TABLA 1. Requisitos físicos-químicos**

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

## ANEXO M. RESULTADO URKUND

URKUND	
<b>Document</b>	<a href="#">TESIS ESCRITO.docx</a> (D15685728)
<b>Submitted</b>	2015-10-14 23:11 (-05:00)
<b>Submitted by</b>	Jimena de las Mercedes Chaglla (jjimebruja89@hotmail.com)
<b>Receiver</b>	elizabeth.escudero.esPOCH@analysis.orkund.com
<b>Message</b>	tesis Jimena Chaglla <a href="#">Show full message</a>
	4% of this approx. 42 pages long document consists of text present in 11 sources.

