



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

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE DEL
EXTRACTO DE HOJAS DE ARRAYÁN (*Myrcianthes hallii*), *in vitro*
POR INHIBICIÓN DE LA HIALURONIDASA e *in vivo* EN HERIDAS
INDUCIDAS EN RATONES (*Mus musculus*)”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: JENNY DEL CARMEN CHÁVEZ DAQUILEMA

TUTOR: LCDA. KAREN ACOSTA, M.SC.

Riobamba – Ecuador

2016

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

El Tribunal de Trabajo de titulación certifica que el trabajo de investigación: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE DEL EXTRACTO DE HOJAS DE ARRAYÁN (*Myrcianthes hallii*), *in vitro* POR INHIBICIÓN DE LA HIALURONIDASA e *in vivo* EN HERIDAS INDUCIDAS EN RATONES (*Mus musculus*)” de responsabilidad de la señorita egresada Jenny del Carmen Chávez Daquilema, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Lcda. Karen Acosta, M.Sc.
DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN

BQF Fausto Contero Bedoya
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Félix Andueza
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

NOTA DE TRABAJO DE TITULACIÓN ESCRITA _____

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Jenny del Carmen Chávez Daquilema, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados, expuestos en este Trabajo de titulación y el patrimonio intelectual del trabajo de titulación pertenece exclusivamente a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

JENNY DEL CARMEN CHÁVEZ DAQUILEMA

DEDICATORIA

Este trabajo de titulación dedico principalmente a mis padres Aquiles Chávez y María Daquilema quienes a lo largo de su vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo incondicional en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo instante de mi inteligencia y capacidad.

A mi hermana Sofía Chávez por haber sido quien estuvo cada día apoyándome, demostrándome que con perseverancia, sacrificio y amor todo es posible.

No es importante quienes son las personas que se encuentran a mi alrededor sino que representan en el transcurso de mi vida, a mis profesores, amigos y demás gracias por regalarme un minuto de su tiempo para estar conmigo.

Es por ello dedico a estos seres maravillosos que soy lo que soy ahora. Los amo.

Jenny

AGRADECIMIENTO

Mi más profundo agradecimiento está dirigido a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, institución que ha sabido formarme académicamente con el afán de llegar a ser una profesional de éxito.

A Dios y al divino Niño que gracias a ellos, pude culminar este trabajo de titulación.

A la Lcda. Karen Acosta, tutora docente de este trabajo por saber guiarme con sus conocimientos y experiencia y colaborador B.Q.F. Fausto Contero por el gran aporte brindado en la elaboración de este trabajo de titulación

Y a cada una de las personas que colaboraron de una u otra manera para la culminación de mi meta.

Jenny

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

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

TABLA DE CONTENIDO

	Paginas
CERTIFICACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	vi
TABLA DE CONTENIDO.....	vii
INDICE DE TABLAS	xi
INDICE DE FOTOGRAFÍAS	xii
INDICE DE FIGURAS	xiii
INDICE DE CUADROS.....	xiv
INDICE DE GRAFICOS	xv
INDICE DE ANEXOS.....	2
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO I.....	7
1 MARCO TEÓRICO	7
1.1 Medicina natural.....	7
1.2 Fitoterapia	7
1.3 Fitomedicina.....	8
1.4 Planta Medicinal.....	8
1.5 Principio Activo	9
1.6 Droga Vegetal	9
1.7 Generalidades de la planta.....	9
1.7.1 <i>Myrcianthes halli</i>	9
1.7.2 <i>Clasificación taxonómica</i>	10
1.7.3 <i>Componentes importantes</i>	10
1.7.4 <i>Propiedades medicinales</i>	10

1.7.5	<i>Descripción botánica</i>	11
1.8	Cicatrización	11
1.8.1	<i>Fases de la cicatrización</i>	12
1.8.1.2	<i>Fase proliferativa</i>	13
1.8.1.3	<i>Fase de remodelado</i>	14
1.9	Metabolitos que intervienen en la cicatrización	14
1.9.1	<i>Flavonoides</i>	14
1.9.2	<i>Taninos</i>	14
1.10	Actividad cicatrizante in vitro	15
1.10.1	<i>Ácido Hialurónico</i>	15
1.10.1.1	<i>El ácido hialurónico en la matriz extracelular</i>	15
1.10.2	<i>Utilidad terapéutica del ácido hialurónico</i>	16
1.11	Modelos in vitro	16
1.11.1	<i>Enzima Hialuronidasa</i>	16
1.11.1.1	<i>Clasificación de las hialuronidasas según análisis bioquímico</i>	17
1.11.1.2	<i>Hialuronidasas de las bacterias gram-positivas</i>	17
1.11.1.3	<i>Metabolitos secundarios inhibidores de la hialuronidasa</i>	18
1.11.2	<i>Hialuronato</i>	18
1.11.3	<i>Composición del veneno de cobra <i>Naja naja</i></i>	18
1.12	Animales de experimentación	19
1.12.1	<i>Ratones del laboratorio</i>	19
1.12.1.1	<i>Características</i>	19
CAPITULO II		20
2	MARCO METODOLÓGICO	21
2.1	Lugar de recolección del material vegetal	21
2.2	Lugar de identificación taxonómica del Arrayán	21
2.3	Lugar de investigación	21
2.4	Materiales, equipos y reactivos	22
2.4.1	<i>Material vegetal</i>	22

2.4.2	<i>Materiales</i>	22
2.4.3	<i>Equipos</i>	23
2.4.4	<i>Reactivos</i>	23
2.5	<i>Técnicas y Métodos</i>	24
2.5.1	<i>Determinación de los parámetros de calidad de la droga vegetal</i>	24
2.5.1.1	Determinación del contenido de humedad	24
2.5.1.2	Determinación de cenizas totales	25
2.5.1.3	Determinación de cenizas solubles en agua	25
2.5.1.4	Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.....	26
2.5.2	<i>Control de calidad del extracto</i>	27
2.5.2.1	<i>Determinación de las Características Organolépticas</i>	27
2.5.2.2	<i>Determinación del pH</i>	27
2.5.2.3	<i>Determinación de la densidad relativa</i>	27
2.5.2.4	<i>Determinación del índice de refracción</i>	27
2.5.3	<i>Tamizaje fitoquímico</i>	28
2.6	<i>Preparación del extracto de <i>Myrcianthes halli</i></i>	30
2.7	<i>Cromatografía en capa fina (TLC)</i>	31
2.7.1	<i>Cromatografía de la fracción flavónica a partir del extracto metanólico 60% de (<i>Myrcianthes halli</i>)</i>	31
2.8	<i>Evaluación de las actividades farmacológicas</i>	32
2.8.1	<i>Determinación de la actividad cicatrizante in vitro</i>	32
2.8.1.1	<i>Determinación de la inhibición de la hialuronidasa</i>	32
2.8.1.2	<i>Inhibición de hialuronidasa bovina</i>	32
2.8.1.3	<i>Inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra <i>Naja naja</i></i>	33
2.8.2	<i>Evaluación de la actividad cicatrizante del extracto hidroalcohólicos de <i>Myrcianthes halli</i></i> .	34
2.8.2.1	<i>Periodo de ambientación o acondicionamiento</i>	34
2.8.2.2	<i>Inducción a la herida</i>	35
2.8.2.3	<i>Tratamiento</i>	35
2.8.2.4	<i>Tipos de respuesta</i>	36

2.8.2.5 Examen histopatológico	36
CAPITULO III	37
3 MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
3.1 Control de calidad de la materia vegetal	38
3.2 Calidad físico-química del extracto de arrayán	38
3.3 Tamizaje Fitoquímico	39
3.4 Cromatografía de capa fina	40
3.4.1 Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica de hojas de <i>Myrciathes halli</i>	40
3.5 Evaluación de la actividad cicatrizante <i>in vitro</i> mediante inhibición de la hialuronidasa	41
3.5.1 Inhibición de la hialuronidasa bovina	42
3.5.2 Inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra <i>Naja naja</i>	43
3.5.3 Análisis estadístico	46
3.6 Evaluación del efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de arrayán (<i>Myrcianthes halli</i>) <i>in vivo</i>	46
3.6.1 Reducción del tiempo de cicatrización.....	46
3.6.2 Análisis estadístico.....	48
3.6.3 Examen Histopatológico	49
CONCLUSIONES	51
RECOMENDACIONES	52
BIBLIOGRAFIA	
ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Taxonomía de *Myrcianthes alli*..... 10

Tabla 2-2: Protocolo de tratamientos de *Myrcianthes halli* en inhibición de la hialuronidasa
Bovin.....33

Tabla 3-2: Protocolo de tratamientos de *Myrcianthes halli* en inhibición de hialuronidasa presente
en el veneno de cobra *Naja naja*34

Tabla 4-2: Grupos de experimentación.....36

INDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1-1: Ratón (*Mus musculus*)19

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Fase de la cicatrización de heridas	12
Figura 2-2: Diagrama de identificación taxonómica del arrayán (<i>Myrcianthes halli</i>), realizado en el Herbario de la ESPOCH	21
Figura 3-2: Obtención de metabolitos secundarios para realizar el tamizaje fitoquímico.....	28
Figura 4-2: Diagrama de flujo para obtención del extracto <i>Myrcianthes halli</i>	31
Figura 5-3: Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica de las hojas de <i>Myrcianthes halli</i>	41
Figura 6-3: Estructura química de la Quercetina	42
Figura 7-3: Curva del % de inhibición de la hialuronidasa bovina por efecto de la fracción flavónicas de hojas de <i>Myrcianthes halli</i>	43
Figura 8-3: Curva del % de inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra <i>Naja naja</i> por efecto de fracción flavónica de hojas de <i>Myrcianthes halli</i>	45
Figura 9-3: Curva del efecto de la fracción flavónica de hojas de <i>Myrcianthes halli</i> en inhibición de hialuronidasa del veneno de cobra.....	46

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1-3:	Control de calidad de las hojas de la planta seca <i>Myrcianthes halli</i>	38
Cuadro 2-3:	Determinación organoléptica, densidad relativa, índice de refracción y pH del extracto fluidos de arrayán.....	39
Cuadro 3-3:	Tamizaje fitoquímico de los extractos de hojas de <i>Myrcianthes halli</i>	39
Cuadro 4-3:	Resultados de la determinación de Rf de la cromatografía en capa fina de la fracción flavónica de hojas de <i>Myrcianthes halli</i>	41
Cuadro 5-3:	Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa bovina por efecto de las fracciones flavónicas de las hojas <i>Myrcianthes halli</i>	42
Cuadro 6-3:	Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra <i>Naja naja</i> por efecto de la fracción flavónica de hojas <i>Myrcianthes halli</i>	44
Cuadro 7-3:	Efecto de la fracción flavónica de hojas del <i>Myrcianthes halli</i> en la inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra <i>Naja naja</i>	45
Cuadro 8-3:	Efecto cicatrizante de extractos hidroalcohólicos de <i>Myrcianthes halli</i> evaluado mediante días de cicatrización y longitud de la herida. BIOTERIO. Facultad de ciencias. ESPOCH. Enero 2016.....	47
Cuadro 9-3:	Reducción en porcentaje del tiempo de cicatrización de cada grupo en relación a la ausencia de tratamiento. Bioterio. Facultad de ciencias. ESPOCH. Enero 2016.....	4
Cuadro 10-3:	Examen histopatológico de piel de ratones (<i>Mus musculus</i>) a los cuales se administró extracto hidroalcohólico de Arrayán (<i>Myrcianthes halli</i>) para la evaluación del efecto cicatrizante	49

INDICE DE GRAFICOS

- Gráfico 1-3:** Reducción del tiempo de cicatrización de cada grupo en relación a la ausencia de tratamiento. Bioterio de la facultad de ciencias. ESPOCH. Enero. 2016.....48
- Gráfico 2-3:** Porcentaje de regeneración celular en ratones (*Mus musculus*) a los que se administró extracto hidroalcohólico de Arrayán (*Myrcianthes halli*).....51

INDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** Materia prima *Myrcianthes halli*
- ANEXO B:** Parámetros de calidad del material vegetal
- ANEXO C:** Determinación de parámetros físicos del extracto: índice de refracción, pH
- ANEXO D:** Obtención del extracto de hojas de *Myrcianthes halli*
- ANEXO E:** Tamizaje fitoquímico de los extractos
- ANEXO F:** Obtención de la fracción flavónica de las hojas de *Myrcianthes halli*
- ANEXO G:** Fracción flavónica de hojas
- ANEXO H:** Cromatografía en capa fina
- ANEXO I:** Ensayo de inhibición de la hialuronidasa bovina
- ANEXO J:** Ensayo de inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra
- ANEXO K:** Acondicionamiento de los reactivos biológicos
- ANEXO L:** Extractos para la evaluación del efecto, ratones depilados previa inducción de heridas
- ANEXO M:** Inducción de heridas
- ANEXO O:** Aplicación de tratamientos extractos 40%, 60% y 80%
- ANEXO P:** Cicatrización de las heridas con aplicación de tratamientos
- ANEXO Q:** Muestras de piel conservadas en formol al 10%
- ANEXO R:** Análisis estadístico de los resultados *in vitro* de la inhibición de la hialuronidasa bovina por efecto de las hojas.
- ANEXO S:** Análisis estadístico de los resultados de *in vitro* de la inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra por efecto de las hojas.
- ANEXO T:** Análisis estadístico de los resultados *in vivo* del efecto cicatrizante de los grupos tratados considerando los días de cicatrización.
- ANEXO U:** Análisis estadístico de los resultados *in vivo* del efecto cicatrizante de los grupos tratados considerando la Longitud de cicatrización.

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue evaluar la actividad cicatrizante *in vitro* por inhibición de hialuronidasa e *in vivo* en heridas inducidas en ratones (*Mus musculus*) del arrayán (*Myrcianthes halli*). Una muestra seca y prensada de la planta se identificó taxonómicamente en el Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, se efectuó el control de calidad de las hojas previamente pulverizadas, se desarrolló el tamizaje fitoquímico de los extractos, se obtuvo el extracto hidrometanólico mediante un proceso de extracción por soxhlet donde se obtuvo la fracción flavónica, se realizó la cromatografía en capa fina (TLC) de hojas. Se utilizó distintos tratamientos para la fracción flavónica de las hojas, los cuales fueron (5; 10; 20; 40; 60 y 80mg/mL) para los ensayos de inhibición de hialuronidasa; se empleó un blanco negativo y un control de actividad máxima de la enzima, para *in vivo* se aplicó 5 tratamientos: Control (+) = Tratados con Lamoderm, Control (-) = blancos, Grupos X, Y y Z = Tratados con extractos a concentraciones de 40; 60 y 80 %. Los resultados obtenidos en la inhibición de hialuronidasa bovina y veneno de cobra *Naja naja* fueron satisfactorios con tratamientos de hojas a dosis de 80mg/mL con un 54.70 y 65.72%, mientras que en *in vivo* considerando el tiempo de cicatrización y la longitud final, los resultados fueron analizados estadísticamente con un intervalo del 95% de confianza, por medio de los test Anova y Tuckey. Se concluyó que a mayor dosis de fracción flavónica de hojas de *Myrcianthes halli* se obtuvo mayor porcentaje de inhibición de hialuronidasa, al igual que *in vivo* los extractos al 60 y 80% posee actividad cicatrizante efectiva por la presencia de flavonoides y por ende ofrece un mejor efecto cicatrizante en heridas. Se recomienda continuar con un análisis de toxicidad crónica para que el vegetal pueda ser comercializado como tal.

Palabras Clave: <ARRAYÁN [*Myrcianthes halli*]>, <EXTRACTOS HIDROETANÓLICO>, <TAMIZAJE FITOQUÍMICO>, <FRACCIÓN FLAVÓNICA>, <CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA [TLC]>, <INHIBICIÓN DE HIALURONIDASA [enzima]>, <VENENO DE COBRA [*Naja naja*]>, <EFECTO CICATRIZANTE>.

ABSTRACT

The investigation objective consisted of evaluating the *in vitro* cicatrizing activity through inhibition of hialuronidase *in vivo* in induced wounds in mice (*Mus musculus*) of the myrtle (*Myrcianthes halli*). A dried up and pressed simple of the plant was taxonomically identified in the Herbarium of the Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. The collection and drying up of the vegetal matter was carried out; later, the quality of the leaves previously pulverized was performed; the phytochemical sieving of the extracts which was carried out with different solvents: dietlic ether, alcohol al 96% and distilled wáter was developed; the hydrometanolic extracts were obtained through an extraction process by soxhlet ehere the favonic fraction was obtained and the chromatography in thin layer of leaves was conducted. Different treatments were used for the flavonic fraction of leaves, which were (5, 10, 20, 40, 60 and 80 mg/mL) for the essays of hialuronidase inhibition; a negative blank and a máximum enzyme activity control were used; for *in vivo* 5 treatments were applied these being: Control (+)= treated with Lamoderm Cream, Control (-)= blanks, Groups X, Y and Z = treated with extracts at concentrations of 40, 60 and 80%. The results obtained in the bovine hialuronidase inhibition of the cobra venom, *Naja naja*, were satisfactory in the leaf treatments at dosages of 80mg/mL with a 54.70% and 65.72% inhibition of more tan a 50 % respectively while *in vivo* the cicatrization time and the final length of the scar are consereder. The results were analyzed statistically with a 95% confidence interval by means of the Anova and Tuckey tests. It was concluded that the higher the dosage of flavonic fraction of leaves of *Myrcianthes halli* the higher percentage of hialuronidase inhibition, similar to *in vivo*. It is concluded that extracts at 60 and 80% possess an effective cicatrizing activity in a 12-dy time due to the presence of flavonoids and hence it offers a better cicatrizing effect in wounds. It is recommended to continue with chronic toxicity analysis so that the vegetable could be commercialized as such or its active principles in a pharmaceutical way.

Key Words: <Arrayán [*Myrcianthes halli*] >, <HYDRO-ETHANOLIC EXTRACTS>, <FLAVONIC FRACTION>, <THIN LAYER CHROMATOGRAPHY [TLC]>, <HYALURONIDASE INHIBITION [enzyme]>, <PHYTOCHEMICAL SIEVING>, <HYDRO-METHANOLIC EXTRACTS>, <COBRA POISON [*Naja naja*]>, <CICATRIZING EFFECT>.

INTRODUCCIÓN

Un porcentaje considerado de la población mundial mantiene un cuidado en su salud aplicando una variedad de medicinas basadas en plantas medicinales y derivados de las mismas, son utilizados desde años milenarios en la medicina antigua y hoy en día son cada vez más valiosos para la obtención de medicamentos modernos en la industria farmacéutica. (Vallejo, 1998, pp.4-8)

Nuestro país tiene una gran variedad en especies, aquellas no han sido investigadas para el uso medicinal hasta la actualidad y ya que la situación económica de nuestro país afecta notoriamente, por el gran incremento de la población, se busca principalmente en las zonas rurales generar conocimientos los mismos que les ayudaran a obtener alternativas de manera que se involucren en el tratamiento de enfermedades comunes y llegar hacer accesibles para toda la población. (Farzaei, Abbasabadi, & Shams, 2014, pp.26-30)

La mayor parte de las personas somos vulnerables a presentar un sin número de lesiones de nuestra piel estas pueden ser por objetos de cocina o utensilios del uso diario. Las personas que son más propensas a presentar estas lecciones son aquellos cuyo sistema inmunológico dista de ser óptimo. Hay factores importantes como son la edad, cuando los niños y adultos mayores estos grupos sociales corren un riesgo especial de infección. (Zambrano, 2014, p. 4)

Un problema más conocido en nuestra realidad es la diabetes mellitus, esta enfermedad en su mayoría es mal controlada y así interviene de manera desfavorable en el proceso de cicatrización en heridas como es el caso del pie diabético. (Calne, 2005, pp.2-3)

La cicatrización de heridas es un proceso de alta complejidad orientado a recuperar la integridad del tejido, permitiendo su regeneración y restaurando sus funciones, se ha seleccionado esta planta ya que en diferentes investigaciones en la familia *Myrtaceae*, de la cual forma parte la especie del presente estudio *Myrcianthes hallii* han revelado la presencia de alcaloides, lactonas, quinonas, triterpenos, azúcares reductores, saponinas y flavonoides siendo las ultimas los de mayor concentración y destacando la presencia de quercetina el cual ayuda a la desinflamación de heridas según estudios realizados de la familia . (Bodero, 2013, pp. 5-9)

Teniendo en cuenta las diferentes investigaciones en la familia , se va a evaluar la actividad cicatrizante de extractos hidroalcohólicos de la especie *Myrcianthes hallii* para demostrar la actividad que ejerce esta especie cuyos fitoconstituyentes como los flavonoides ayudan a la

regeneración celular y a la vez la inhibición de la enzima hialuronidasa, permite desarrollar un métodos usando modelos *in vitro* y modelos experimentales *in vivo*, se puede comprender la respuesta de cicatrización de las heridas. (Subalakshmi, y otros, 2014,pp. 127-131)

Esta investigación proporcionara evidencia científica en cuanto a la cicatrización de heridas, buscando así incrementar el manejo de especies vegetales, brindando sus fines terapéuticos en el caso de esta planta que se la utiliza en comidas pero obvian el uso cicatrizante que ella puede poseer y también teniendo un bajo costo siendo una opción accesible para los pacientes que sufren alguna alteración en la cicatrización de heridas, buscando así el mejor vivir en las familias q pueden presentar heridas pequeñas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la actividad cicatrizante del extracto de hojas de arrayán (*Myrcianthes hallii*) *in vitro* por inhibición de la hialuronidasa e *in vivo* en heridas inducidas en ratones (*Mus musculus*).

Objetivos Específicos

1. Realizar el perfil fitoquímico y farmacológico del extracto de hojas de *Myrcianthes hallii*.
2. Comprobar el efecto cicatrizante del extracto de hojas de *Myrcianthes hallii*, *in vitro* por inhibición de la hialuronidasa
3. Comprobar el efecto cicatrizante del extracto de hojas de *Myrcianthes hallii* inducidas en ratones (*Mus musculus*).

CAPÍTULO I

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Medicina natural

La medicina natural es conocida también como alternativas de sanación y curación de enfermedades ya que de esta manera extraemos los beneficios de dichos productos, conservando sus principios activos, evitando que estos sean manipulados químicamente. Los productos naturales que se utilizan son provenientes de vegetales y minerales para diferentes usos como la aplicación en forma tópica o en ciertos casos de manera ingesta para emplearlo directamente al paciente. Los beneficios de dichas plantas que se utilizan para la cicatrización se obtienen en forma de emplasto que se coloca directamente sobre la herida ayudando a la coagulación de la sangre y a la maduración de la dermis. (Hervías, 2006, <http://www.monografias.com/trabajos34/medicina-natural/medicina-natural.shtml>)

El Ecuador por ser un país rico en fauna y flora se presenta un crecimiento notable del 20% del uso y comercialización de plantas con poder de curativo para aprovechar sus componentes que tiene alto nivel sanación sin provocar efectos secundarios que causen daño al paciente. (Buitrón, 1999, pp. 1-5)

1.2 Fitoterapia

Es una terapia a base de plantas que tiene como fin prevenir y controlar enfermedades a nivel corporal con el propósito de mejorar la calidad de vida, como se conoce históricamente las plantas no son solo alimento sino que también son fuentes medicinales que han presentado un alto nivel curativo pero a través del tiempo han ido evolucionando sus propiedades de sanación a medida que las enfermedades lo requieren ya que van al apar. (Morales & Morales, 2009, pp.1-3)

Las plantas medicinales nos brindan principios activos que son conocidos como la droga de la planta que se utilizan de dos formas, la primera en forma natural como infusiones, extractos alcohólicos y capsulas (planta es secada y triturada para luego ser llenada en el interior de la capsula) la segunda parte es de forma sintética que es utilizada en farmacología. (Morales & Morales, 2009, pp.1-3)

La fitoterapia en los últimos años tuvo un crecimiento notable en todos los aspectos relacionados debido a que es una herramienta muy importante para los profesionales de la salud ya que utilizan como alternativas curativas en referencia hace unos 20 años atrás era muy difícil encontrar comercialización de plantas naturales (Herbolario) en donde se podía dar al paciente tratamientos naturales utilizando plantas que tengan carácter curativo. (Vallejo, 1998, pp. 4-8)

1.3 Fitomedicina

A la fitomedicina se lo define como el uso de plantas para prevenir y curar diferentes enfermedades para mejorar la calidad de vida del paciente debido a que las plantas nos proporcionan diferentes componentes ya sean macro, microscópica y la más importante ortomoleculares la cual nos proporciona la actividad terapéutica en contexto científico que se refiere a la utilización de la droga vegetal sometidos a procesos de investigación clínicos, farmacológicos y Toxicológicos. (Morales & Morales, 2009, pp.1-3)

Según la OMS Organización mundial de salud define a la Fitomedicina como la utilización de principios activos que se obtienen a partir de origen vegetal para el uso terapéutico según la OMS se dice que en 1996 hubo un 80% de la población mundial que usaba como alternativa primaria el uso de plantas medicinales. (Morales & Morales, 2009, pp.1-3)

1.4 Planta Medicinal

Una planta medicinal es aquella que tiene propiedades preventivas y curativas que tienen principios activos para tratar diferentes enfermedades que se van desarrollando a menudo que la población crece, se utilizan partes de la planta en diferentes formas como son en infusiones, ungüentos, emplastos, capsulas, etc. Debemos tener en cuenta que gracias a los estudios que se realizan hay numerosas plantas con acción terapéutica contribuyendo a mejorar la calidad de salud de las personas. (Muñoz, 1996, pp.16-18)

El uso de las plantas medicinales se viene usando desde los años remotos como culturas que han venido utilizando como la China, Aztecas, Egipcia, Romana etc., fueron los que ayudaron para que se dé inicio a la medicina alternativa brindando beneficios positivos a la población mundial con la eficacia de sus principios activos que van dando diferentes usos para tratar enfermedades como diarreas, antidesparasitarios, astringentes y coagulantes por otro lado en nuestro país tenemos una rica fauna y por ende plantas medicinales que en altos porcentajes son utilizados por sus propiedades terapéuticas. (Buitrón, pp.1-5)

1.5 Principio Activo

Un principio activo tiene una actividad terapéutica que van a interactuar con los organismos y con sus diferentes sistemas. Todos los principios activos han sido evaluados científicamente para ser utilizados a nivel farmacéutico. Entre un fármaco y un principio activo la principal diferencia es en su proceso que son biológicos y sintéticos en diferentes sustancias que en algunos casos no son descubiertos. (Betés, 2008, pp. 4-6)

Los principios activos se pueden extraer de diferentes partes de la planta principalmente de la corteza, hojas y raíz presentando un mayor porcentaje de principios activos en frutos, flores y semillas, estas sustancias pueden variar en una misma especie debido a diferentes factores climáticos y geográficos, según los principios activos se pueden definir y a su vez clasificar a las plantas de acuerdo a su acción terapéutica. El descubrimiento de los principios activos se basa en la medicina moderna ya que se utilizan ensayos clínicos donde se va a evaluar la acción farmacológica de las plantas que se han venido utilizando para prevenir y tratar diferentes patologías desde la antigüedad. (Muñoz, 1996, pp. 16-18)

La OMS define al principio activo como componentes principales para medicamentos herbarios en los cuales se deben realizar procedimientos analíticos precisos para que de este modo contenga el principio activo adecuado y exacto, sin embargo si no se logra identificar los principios activos de una planta se puede suponer que el medicamento del herbarios son todos principios activos. (Zhan, 2015, http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/)

1.6 Droga Vegetal

Una droga es un componente químico que tiene la capacidad de aliviar, curar y prevenir diferentes patologías, en la actualidad se dice que una droga se puede evaluar como un componente químico sintético que se utiliza a nivel del Sistema Central evidenciando alteración del ánimo que puede tener resultados placenteros que a su vez pueden conllevar a una adicción o tolerancia. Las drogas naturales se originan especialmente a nivel vegetal, mineral y animales tomando cualquier parte para la purificación de la droga. (Morales & Morales, 2009, pp.1-3)

1.7 Generalidades de la planta

1.7.1 *Myrcianthes halli*

El arrayán es una planta nativa de la sierra ecuatoriana, constituyéndose como planta ornamental y doméstica que se pueden encontrar en jardines y algunas zonas como bosques o parques protegidos a lo largo de la serranía debido a que poseen una madera muy fina. (Mora, 2005, pp. 102)

El fruto de este árbol es comestible y sus hojas se las utiliza para aromatizar la colada morada, en la antigüedad se solía masticar las hojas para que la dentadura este limpia. (Mora, 2005, pp. 102)

1.7.2 Clasificación taxonómica

Tabla 1-1: Taxonomía de *Myrcianthes halli*

Reino:	Plantae
División:	Fanerigamae
Subdivisión:	Angiospermae
Clase:	Dicotyledonae
Orden:	Myrtales
Familia:	Myrtaceae
Género:	Myrcianthes
Especie:	<i>M. halli</i>
Epítelo específico:	<i>Myrcianthes halli</i>

Fuente: (Jaramillo, 2013, pp. 3-4 y Govaerts, 2010)
Realizado por: Jenny Chávez, 2015

1.7.3 Componentes importantes

Los compoene que predominan son: α - β pineno, cineol y mirtol, además se han encontrado diferentes flavonoides como quercitina, camferol, mircetina y dos glúcidos de miricetina. (Gómez, 2010, pp. 114-115)

1.7.4 Propiedades medicinales

Esta planta posee propiedades antisépticas y desinfectantes para lo cual se elabora un aceite que se aplica en las heridas para evitar el tétano y otras infecciones, al igual propiedades astringentes, por lo que en ocasiones es usado para la elaboración de enjuagues bucales ya que brinda protección y curación para las encías. Además ayuda en la circulación y evita la aparición de arrugas en la piel. (Matheus, 2007, pp. 107-108)

Es muy beneficioso en el tratamiento de enfermedades respiratorias, ya que afloja la mucosidad y la flema, además alivia la congestión de la nariz, bronquios y pulmones. También puede ayudar para tratar una simple gripe. (De la Torre & Navarrete, 2008, pp. 14,20-23)

Podemos encontrar numerosos beneficios que proporciona el arrayán a la medicina para poder combatir varias enfermedades, además de las antes mencionadas y estas enfermedades pueden ser: Infecciones pulmonares (tos convulsa, bronquitis), infecciones urinarias, diarrea, parásitos intestinales, indigestión, diabetes, hongos y bacterias perjudiciales, heridas, hemorroides, acné y leucorrea. (De la Torre & Navarrete, 2008, pp. 14,20-23)

1.7.5 Descripción botánica

Esta especie se presenta en forma de arbusto o en forma de árbol, puede alcanzar una altura de 6 a 15m, es un árbol delgado con un grosor irregular de 30 a 40cm. Posee una corteza de color rojo ladrillo es lisa de un espesor de 3mm, tiene una ramificación ovalada y espesa, es considerado una planta ornamental por la hermosura de su flor que es entre blanco amarillento con pétalos unidos, posee un conjunto de 4 a 5 pétalos libres y numerosos estambres, tiene un ovario ínfero con 5 lóculos y cada uno posee dentro un número de 1 a 3 semillas de color y la forma que adquiere este árbol. (Govaerts, 2010, pp. www.catalogueoflife.org)

1.8 Cicatrización

Es un proceso biológico para la regeneración de los tejidos afectados de este modo para subsanar la solución de continuidad dándose en dos formas que son la regeneración es la restitución anatómica y funcional del tejido, la restitución es tapar el hueco con tejido conjuntivo refiriéndonos a que cubrimos el efecto anatómico de la herida. (Arias, Aller, Arias, & Lorente, 1999, pp.121-125)

La cicatrización se puede darse en dos fases la primera es lenta o la cicatriz será débil y la segunda es la que es muy fuerte o excesivamente abundante por lo cual se ha determinado que el proceso de reparación (cicatrización) con su resultado (cicatriz) son dos procesos anormales o patológicos. (Arias, Aller, Arias, & Lorente, 1999, pp.121-125)

Los principales defectos de este proceso de reparación son diferentes causas que producen patologías como en el caso de:

Retraso de la cicatrización: este retraso de cicatrización se da principalmente por diferentes tipos de heridas crónicas debido a que no se ha determinado el tiempo en que se va a retrasar la

cicatrización con el objetivo de establecer si la herida es crónica. Entre los diferentes factores que afectan al proceso de cicatrización se dan en dos categorías entre ellas las intrínsecos y/o extrínsecos. (Arias, Aller, Arias, & Lorente, 1999, pp.121-125)

Cicatriz Hipertrófica: la cicatriz hipertrófica se define como prominente, eritematosa y puriginosa en las cuales se encuentre dentro de la cicatriz original, este tipo de cicatriz se da en casos de heridas que se curan por segunda intención dándose una reepitelación solicitada por más de 3 semanas. (Arias, Aller, Arias, & Lorente, 1999, pp.121-125)

Esta cicatriz se produce debido al aumento de los tejidos que intervienen en el proceso de la cicatrización como el colágeno, elastina, proteoglicanos y las células con diferencia en el proceso normal que son hipercelulares conteniendo una excesiva matriz extracelular. (Arias, Aller, Arias, & Lorente, 1999, pp.121-125)

Cicatriz queloide: es un queloide formado por tejido conjuntivo que tiene la similitud de un tumor benigno que penetra la dermis y el tejido subcutáneo con diferentes prolongaciones que se les afina con patas de cangrejo por lo cual toma el nombre de queloide. (Arias, Aller, Arias, & Lorente, 1999, pp.121-125)

Cicatriz retráctil :es el secuela de retracción que se va a producir durante la fase de remodelación que es la formación, degradación en la matriz extracelular y la contracción, esta cicatrización se da en lugares donde la piel tiene menor resistencia a la contracción estas zonas son donde aparecen pliegues como el cuello, articulaciones. (Arias, Aller, Arias, & Lorente, 1999, pp.121-125)

1.8.1 Fases de la cicatrización

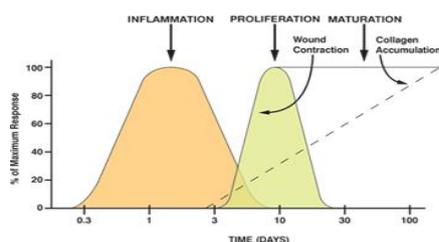


Figura 1-1: Fase de la cicatrización de heridas

Fuente: Simon, 2014,p.2

1.8.1.1 Fase inflamatoria

La palabra inflamatoria proviene del latín inflames que tienen como significado “prender” esta fase inicia en el momento de una lesión y es un periodo crítico debido a que se prepara para proteger de

los agentes del ambiente permitiendo que se realiza el proceso de la cicatrización incluyendo la hemostasia, la fase vascular y celular de la inflamación. (Cameron, 2009, pp. 5-41)

Los procesos hemostasia se van activar inmediatamente en una lesión debido a que hay constricción de los vasos lesionados iniciando la coagulación de la sangre por la vía de la activación y agregación plaquetaria después de un tiempo de constricción estos mismos vasos se dilatan y los capilares aumentan progresivamente su permeabilidad permitiendo que los componentes del plasma y de la sangre escapen hacia la área lesionada. (Cameron, 2009, pp. 5-41)

En las heridas superficiales pequeñas el coagulo pierden líquido y dando a la formación de una costra dura y seca protegiendo el área siguiendo la fase celular de la inflamación que se evidencia por la migración de los glóbulos blancos fagosíticos digiriéndolos y eliminando los microorganismos invasores como la fibrina, los tetrinos celulares y otros elementos extraños. (Cameron, 2009, pp. 5-41)

Una herida puede curarse en ausencia de neutrófilos pero no puede hacerlo en ausencia de macrófagos. (Cameron, 2009, pp. 5-41)

1.8.1.2 Fase proliferativa

Esta fase inicia dentro del segundo a terceros días después de haber tenido la lesión durando hasta tres semanas las heridas que se curan por primera intención. El proceso principal de esta fase se da en la producción de nuevo tejido para cubrir o llenar el espacio de la lesión, la célula más importante durante este periodo es el fibroblasto que es una célula de tejido conjuntivo que sintetiza y secreta colágeno y otros elementos intercelulares necesarios para la cicatrización de heridas. (Cameron, 2009, pp. 5-41)

Los fibroblastos también producen una familia de factores de crecimiento que inducen la angiogénesis, la proliferación y la migración de células endoteliales, después de 24 a 48 horas de la lesión los fibroblastos y las células endoteliales vasculares comienzan a la proliferación para formar el tejido de gran noción que sirve como de base para el tejido de cicatrización, este tejido es frágil y sangra con mucha frecuencia debido a los numerosos brotes capilares desarrollados de forma reciente. (Cameron, 2009, pp. 5-41)

El componente final de la proliferación es la epitemialización que consiste en la migración, proliferación y la diferenciación de las células epiteliales en los bordes de la herida para formar la nueva capa superficial que va hacer similar a la destruida. (Cameron, 2009, pp. 5-41)

1.8.1.3 Fase de remodelado

Esta fase se da después de 3 semanas de haber tenido la lesión y puede durar entre seis meses según la profundidad de la herida. (Cameron, 2009, pp. 5-41)

Como su nombre lo dice en esta fase va a ver un remodelado continuo de tejido cicatrizante por la síntesis simultánea de colágeno por los fibroblastos y la lisis por las coliginasas como resultado de estos dos procesos la arquitectura de la cicatriz se reorienta para aumentar la resistencia de la herida ya que en la mayor parte de las heridas no se produce una recuperación plena. (Cameron, 2009, pp. 5-41)

1.9 Metabolitos que intervienen en la cicatrización

1.9.1 Flavonoides

Su nombre proviene del latín flavus que significa amarillo, es un metabolito secundario que se encuentran en las plantas comúnmente en forma de polifenólicos en presencia de una cetona. (Biesaga, 2011, pp. 2505-2512)

Los flavonoides al no ser metabolitos primarios se los puede encontrar en cualquier planta superior, sabiendo que podemos encontrar más de 800 especies vasculares. (Biesaga, 2011, pp. 2505-2512)

Los flavonoides se clasifican según su acción farmacológica que son:

Flavonas: son de color amarillas y pueden estar presentes en diferentes flores como es el caso de la primula que le da el color característico a sus pétalos y/o frutos. (Pérez, 2003, pp. 1-3)

Flavonoles.- Son aquellas que son incoloras o en algunos casos amarillentas, las podemos encontrar en flores y en muchas hojas, entre los principales flavonoles podemos encontrar quercentina, mirecetnina y isetina. (Pérez, 2003, pp. 1-3)

Flavanoles.- son más conocidas como citroflavonoides ya que estas se encuentran en la cascara de todas las especies de cítricos su principal función es la protección vascular. (Pérez, 2003, pp. 1-3)

1.9.2 Taninos

Los taninos son moléculas polifenolicos generalmente amorfos, no cristalinas con sabor amargo, generalmente solubles en agua y alcohol, una de las funciones es que se utilizan para cicatrizar

heridas porque aceleran el proceso de regeneración y coagulación de la sangre, al combinarse con las proteínas de la piel eliminando agua de las fibras musculares de este modo curtiendo la piel. (Marcano, D. & Hasegawa, M., 2002 , pp. 177-179)

El proceso de cicatrización se da por la formación de diferentes costras ya que al ligarse las proteínas con los taninos van a formar un medio “seco” impidiendo el crecimiento de las bacterias. Al momento de contraerse los diferentes vasos sanguíneos van ayudar en el proceso de coagulación de la sangre ayudando a la restablecimiento de las heridas de este modo reduce el dolor producido en la piel. (Marcano, D. & Hasegawa, M., 2002 , pp. 177-179)

1.10 Actividad cicatrizante in vitro

1.10.1 Ácido Hialurónico

El ácido hialurónico pertenece a la familia de las macromoléculas más conocidas como glucosaminoglicanos estas están formadas en cadenas largas de polisacáridos en repeticiones de las unidades de disacáridos, en el cual el ácido hialurónico está compuesto de ácido glucorónico y N-acetilglucosamina. (Cossio, 2007, pp. 69-72)

El ácido hialurónico es una sustancia natural que se produce naturalmente en el organismo, se encuentran presentes en las articulaciones, cartilagos y la piel. La función principal en la piel es la atracción y retención del agua dándole la hidratación y elasticidad de la piel. (Melo & Cuamatzi, 2016, pp.70)

1.10.1.1 El ácido hialurónico en la matriz extracelular

El ácido hialurónico se halla en niveles altos de concentraciones en la matriz extracelular ya que en su fórmula contiene un disacárido glicosaminoglicano de más alto peso molecular, que está compuesto de D-ácido glucurónico (GlcUA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), las mismas que están formadas por cadenas lineales largas que en comparación con otras moléculas afines no contienen grupos sulfatos. (Stern, 2004, pp. 317-325)

Las altas concentraciones de ácido hialurónico en la matriz corresponden a la presencia de glicoproteína que comúnmente es conocida como actividad estimuladora de ácido hialurónico (AEAH), por lo tanto está presente en los periodos prolongados de la herida fetal, que abordan resultados ricos en ácido hialurónico de la herida, este mecanismo es generalmente ausente en la herida de un adulto. (DePalma, y otros, 1989, pp. 224-231)

Debido a que no existe un estímulo constante para la producción (déficit de AEAH) de ácido hialurónico presente en el adulto, su concentración es menor, a su vez es degradado por la enzima hialuronidasa (ácido hialurónico'asa) que va a originar la aparición de la cicatriz. En el feto, la AEAH no sólo se encarga de estimular la producción de ácido hialurónico para mantener las concentraciones óptimas en el área de la lesión, sino además inhibe la acción de la enzima hialuronidasa por tiempo considerado. (DePalma, y otros, 1989, pp. 224-231)

1.10.2 Utilidad terapéutica del ácido hialurónico

Las aplicaciones del ácido hialurónico son múltiples en el ámbito de la salud como en belleza dentro de estos podemos nombrar:

- Osteoporosis
- Oftalmología
- Ulceras en la boca
- Difusión molecular
- Movilidad celular

Una de las aplicaciones más relevantes es en la investigación científica debido a que nos permiten diagnosticar nuevas enfermedades ya que reaccionan con diferentes moléculas que nos permite la detección de nuevas rutas de señalización de enfermedades o patologías. (Ramírez, Quiroz, Báez, & Martínez, 2006, p.42)

1.11 Modelos *in vitro*

1.11.1 Enzima Hialuronidasa

Es una enzima de origen proteico que ayuda a cambiar la permeabilidad de tejidos conectivos durante la hidrólisis del ácido hialurónico, una vez que se haya hidrolizado el ácido hialurónico va a disminuir la viscosidad del cemento intercelular lo que nos permite una mayor absorción de los fluidos inyectables. (Romero, 2007, pp. 704)

También, los inhibidores de hialuronidasa potentes como cromoglicatos disódico, se ha comprobado que producen efectos anti-alérgicas fuertes, el uso de ellos se expresa como agentes de primeros auxilios como en la terapia de mordedura de serpiente que nos ayuda aumentar el tiempo de supervivencia de las víctimas. Dado que el ácido hialurónico es el encargado de formar la columna vertebral de la matriz del cartílago, debido a la degradación de la enzima hialuronidasa se

da el enlace con la patogénesis de diferentes enfermedades en las articulaciones como es el caso de; artritis, osteoartritis. (Wanigasekera, Walimuni, & Chatura, 2014, pp. 959-963)

1.11.1.1 Clasificación de las hialuronidasas según análisis bioquímico

- 1** Las hialuronato-4-glicanohidrolasas (EC. 3.2.1.35) actúa como una endo-β-N-acetil-hexosaminidasas que degradan tanto el ácido hialurónico como los condroitin sulfato A y C, la condroitina y el sulfato de dermatano, hasta fragmentos menores, en primer lugar un tetrasacárido con el resto de hexosamina en el extremo reductor libre; este es el caso de la **hialuronidasa testicular bovina**. (Lerma, 2006, pp.9-10).
- 2** Las hialuronato-3-glicanohidrolasas (EC. 3.2.1.36) o endo-β-gluconidasas, esta enzima es absolutamente específica para el ácido hialurónico capaces de generar tetrasacaridos con el ácido glucurónico en el extremo reductor libre; como ejemplo tenemos a las hialuronidasas de las glándulas salivales de las sanguijuelas. (Lerma, 2006, pp.9-10).
- 3** Las hialuronato liasas (EC. 4.2.99.1) o endo-β- N-acetil hexosaminidasas cuya acción hidrolítica degrada al sustrato hasta generar disacáridos Δ-4,5-insaturados siendo el caso típico el de las hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.2.1), microbianas. (Lerma, 2006, pp.9-10).

1.11.1.2 Hialuronidasas de las bacterias gram-positivas

Las bacterias gram-positivas no tienen endotoxinas, pero la presencia de esas bacterias en la piel o mucosas provoca una respuesta inflamatoria. (Wanigasekera, Walimuni, & Chatura, 2014, pp.959-963).

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

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

1.11.1.3 Metabolitos secundarios inhibidores de la hialuronidasa

Uno de los principales metabolitos secundarios son los Flavonoides dentro de ellos tenemos: catequinas, quercetina, galotaninos, EGCG, taninos, apigenina, kaempferol, ácido ascórbico, uno de los inhibidores potentes de hialuronidasa son los alcaloides, demás los polifenoles que poseen un alto peso molecular voluminoso son solicitados para actuar como inhibidores de hialuronidasa (Wanigasekera, Walimuni, & Chatura, 2014, pp. 959-963).

1.11.2 Hialuronato

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

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

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

1.11.3 Composición del veneno de cobra *Naja naja*.

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

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

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

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

1.12 Animales de experimentación

1.12.1 Ratones del laboratorio



Fotografía N° 1 Ratón (*Mus musculus*)

Fuente: Jenny Chávez. Bioterio de la Facultad de Ciencias. ESPOCH

Los ratones de laboratorio son animales roedores de la especie *Mus musculus* que son utilizados para la investigación científica, debido a que su cariotipo es formada por 40 cromosomas y generalmente suelen ser albinos. (Cuello, 1983, pp.107-108)

Para cada experimento se elige ratones del laboratorio que pertenezcan a una misma cepa pura o endogámica, debido a que estos tienen los mismos genes que facilitan la experimentación. (Cuello, 1983, pp.107-108)

1.12.1.1 Características

Los ratones comunes adultos pesan entre 12 y 40g, y miden entre 15 y 19 centímetros, incluyendo la cola, que supone algo más de la mitad de su longitud. Su pelaje es corto y de tonos grises, que se aclaran en el vientre. Los ratones de laboratorio y los utilizados como mascotas son generalmente blancos. Su pelo es escaso en la cola y las orejas. (Cuello, 1983, pp.107-108)

Posee unos largos bigotes (vibrisas) que son sensibles al tacto y le proporcionan información sobre el medio. Como su vista es muy débil el ratón, sólo identifica los objetos desde muy cerca. Su olfato en cambio es muy desarrollado, lo ayuda en encontrar los alimentos y a los demás ratones. Su oído es también desarrollado, el ratón oye hasta los sonidos de 100 kHz (80 kHz más que las personas). (Cuello, 1983, pp.107-08)

CAPITULO II

2 MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de recolección del material vegetal

El Arrayán (*Myrcianthes halli*), se recolectó en Ecuador, provincia de Chimborazo, cantón Guamote parroquia Cebadas, barrio Guadalupana a una altura de 2970.51msnm y con las coordenadas en X= 7762323.033 Y= 9788998.687.

2.2 Lugar de identificación taxonómica del Arrayán

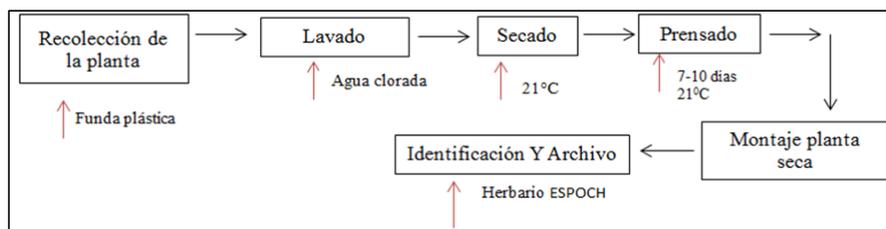


Figura 2-2: Diagrama de identificación taxonómica del arrayán (*Myrcianthes halli*), realizado en el Herbario de la ESPOCH

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

2.3 Lugar de investigación

La presente investigación se realizó en:

- **Control de calidad de la droga:** Laboratorio de Fitoquímica y Química Instrumental de la Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- **Evaluación de la Actividad Cicatrizante *in vitro* e *in vivo*:** Laboratorio Química Instrumental, Bioterio de la Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
- **Análisis Histopatológico:** Laboratorio Histopatológico SOLCA (Riobamba).

2.4 Materiales, equipos y reactivos

2.4.1 Material vegetal

Las partes que se utilizaron de la planta (*Myrcianthes halli*) fueron las hojas que se secaron a temperatura ambiente bajo sombra y se trituraron en el molino marca Arthur H. Thomas C.O para los diferentes análisis físicos químicos.

2.4.2 Materiales

Cápsulas de porcelana
Pinzas para cápsula
Pisceta
Refrigerante de bolas
Balones esmerilados
Pinzas universales
Mangueras
Embudo simple
Trípode
Tubos de ensayo
Tubos de vidrio
Pipetas
Vasos de precipitación
Gradilla
Capilares
Frascos de vidrio ámbar
Probeta
Micropipetas
Puntas azules y amarillas
Termómetro
Reverbero
Bisturí
Jeringuillas
Gasas
Papel filtro
Papel aluminio

2.4.3 Equipos

Molino
Sonicador
Estufa
Mufla
Balanza analítica
Cámara UV
Refrigerador
Refractómetro
Pea - chímetro
Cronómetro

2.4.4 Reactivos

Alcohol al 96 %
Reactivo de Dragendorff
Reactivo de Mayer
Reactivo de Wagner
Reactivo de Baljet
Reactivo de Lieberman Buchard
Reactivo para Catequinas
Reactivo para resinas
Reactivo de Fehling
Reactivo de FeCl₃
Reactivo de Borntrager
Reactivo de Shinoda
Reactivo de Antocianidinas
Cloruro férrico
Magnesio metálico
Cloruro de sodio (polvo)
Acetato de etilo
Ácido fórmico
Cloroformo
Acetona
Papel cromatográfico
Agua bidestilada

Buffer acetato 0.1M
Solución de hialuronidasa bovina
Di metil sulfóxido 5%
Cloruro de calcio 12.5mM
Hialuronato de sodio
Hidróxido de sodio 0.4M
Borato de sodio 0.2M
p-dimetil amino benzaldehído
Ácido clorhídrico 10N
Ácido acético glacial
Solución salina
Solución de veneno de cobra Naja naja
Ácido hialurónico
Buffer acetato
Cloruro de sodio 0.15N
Dimetilsulfóxido 5%
Formol al 10%
Éter
Lidocaína

2.5 Técnicas y Métodos

2.5.1 Determinación de los parámetros de calidad de la droga vegetal

2.5.1.1 Determinación del contenido de humedad

Para determinar el contenido de humedad se basó en el método gravimétrico, en el cual se pesan 2g de materia vegetal con una desviación estándar permitida de 0.5mg, se traslada una cápsula de porcelana previamente tarada, y se coloca en una estufa a 105°C por 3 horas para desecar la muestra. Posteriormente la cápsula se colocó en el desecador donde se dejó enfriar a temperatura ambiente y se pesó y seguidamente se colocó en la estufa durante 1 hora, y después se pesó, hasta obtener una masa constante.

Expresión de los resultados:

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

Hg = pérdida en peso por desecación (%).

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

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

M = masa de la cápsula vacía.

100= factor matemático.

2.5.1.2 Determinación de cenizas totales

El ensayo para determinar cenizas totales se realizó por un método gravimétrico, se fijó la masa de una fracción de muestras pulverizada y tamizada entre 2.0g a 3.0g con una desviación permitida de 0.5mg en un crisol de porcelana anteriormente tarado. En un reverbero primeramente se carbonizó la muestra para eliminar el residuo orgánico, subsiguientemente se incineró en un horno mufla a una temperatura de 700 a 750°C, durante 2 horas hasta obtener como resultado un polvo blanco. El crisol con las cenizas se colocó en el desecadora hasta que se enfrió y después se pesa hasta obtener un valor constante donde dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0.5mg por gramo. (Miranda, 2006, pp. 32-62)

Expresión de los resultados:

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

C = porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M = masa del crisol vacío (g)

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

M₂= masa del crisol con la ceniza (g)

100= factor matemático para los cálculos.

2.5.1.3 Determinación de cenizas solubles en agua

La determinación de cenizas solubles en agua se realizó por un método gravimétrico. A las cenizas totales obtenidas en el ensayo anterior, se le añadieron de 15 a 20 mL de agua. El crisol se tapó y se calentó en un baño de agua hirviente durante 5min. La solución obtenida se filtró a través del papel de filtro libre de cenizas. El filtro con el residuo se colocó en el crisol inicial, se carbonizó en un reverbero y luego se incineró en un horno mufla de 700-750°C, durante 2h. Ulteriormente se colocó

en el desecador hasta que se enfríe y se pesó. Se repite el procedimiento hasta alcanzar peso constante. (Miranda, 2006, pp. 32-62).

Expresión de los resultados:

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

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

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

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

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

M = masa del crisol vacío.

100 factor matemático.

2.5.1.4 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

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

Expresión de los resultados:

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

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

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

M = masa del crisol vacío (g)

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

100 = factor matemático.

2.5.2 Control de calidad del extracto

2.5.2.1 Determinación de las Características Organolépticas

Para esta prueba se tomó una alícuota de 25 mL del extracto y se colocó en un vaso de precipitación de 50 mL, para realizar el análisis sensorial de: color, olor y sabor. (Miranda, 2006, pp. 32-62)

2.5.2.2 Determinación del pH

Se tomó una alícuota de 25 mL, de la muestra y se procedió a medir directamente en el pHmetro previamente calibrado. (Miranda, 2006, pp. 32-62)

2.5.2.3 Determinación de la densidad relativa

Se lavó cuidadosamente el picnómetro y se secó bien, se colocó en la estufa durante una hora, se pesó el picnómetro (M), enrasó el picnómetro con agua destilada, se secó y pesó (M1), vaciar el contenido del picnómetro y llenarlo nuevamente, pero esta vez con la muestra (extracto) y finalmente enrasar el picnómetro con el extracto, secarlo y pesarlo. (M2). (Miranda, 2006, pp. 32-62)

Expresión de los resultados:

$$D_{25} = \frac{M_1 - MM_2 - M}{M_2 - MM_1 - M}$$

M₁ = peso del picnómetro en g con agua destilada

M₂ = peso del picnómetro en g con la muestra de ensayo

M = peso del picnómetro vacío

2.5.2.4 Determinación del índice de refracción

Se midió en un refractómetro de Abbe, calibrado el equipo con agua destilada se levantó cuidadosamente la tapa del refractómetro y limpiar con el papel filtro, previamente colocamos se colocó la muestra (extracto) y finalmente se anotó los resultados. (Miranda, 2006, pp. 32-62)

Expresión de los resultados:

$$n_d^{20} = n + 0.00044 (T - 20)$$

Dónde:

$(n)^{20}$ = índice de refracción corregido

$(n^T)^d$ = índice de refracción determinado

0.00044 y 20 = factores de corrección matemáticos

T = temperatura a la que se realiza la lectura.

2.5.3 Tamizaje fitoquímico

Se realizó una extracción según el esquema de la Figura 3-2, se obtuvo el extracto de las hojas y se midió el volumen obtenido, se calculó la concentración, esto es, gramos de sustancias extraídas por mL de extracto.

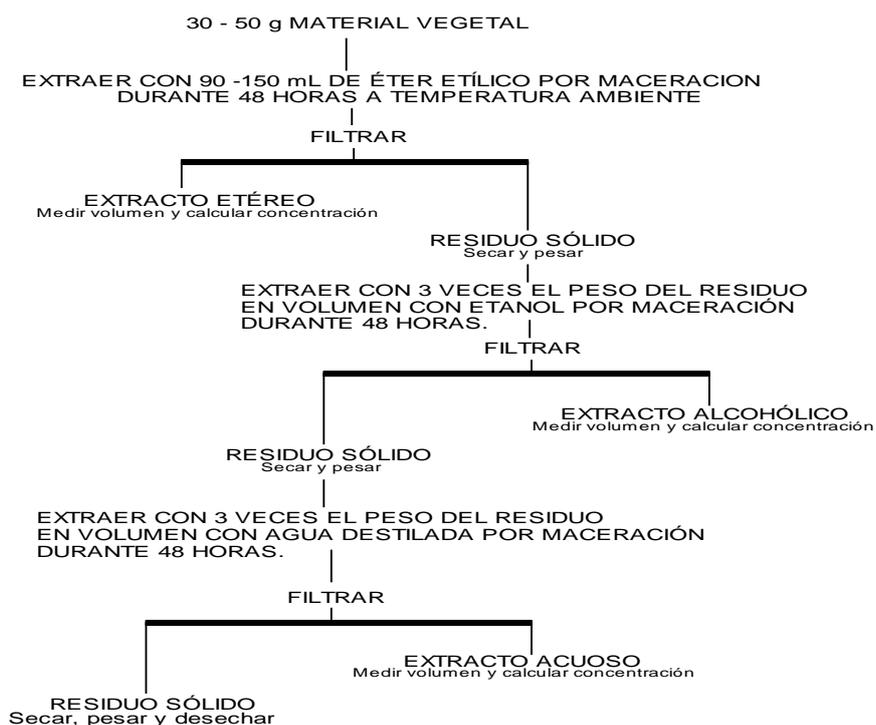


Figura 3-2: Obtención de metabolitos secundarios para realizar el tamizaje fitoquímico.

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

2.5.3.1 Ensayo de Dragendorff

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

2.5.3.2 Ensayo de Mayer

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

2.5.3.3 Ensayo de Wagner

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

2.5.3.4 Ensayo de Baljet

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Coumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo.

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1 mL). En estas condiciones se adiciona 1 mL del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++ y +++) respectivamente.

2.5.3.5 Ensayo de Borntrager

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

2.5.3.6 Ensayo de Liebermann-Burchard

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

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

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

2.5.3.7 Ensayo de catequinas

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

2.5.3.8 Ensayo de resinas

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

2.5.3.9 Ensayo de Fehling

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

2.6 Preparación del extracto de *Myrcianthes halli*

La obtención del extracto para hojas *Myrcianthes halli* se realizó de acuerdo al siguiente diagrama.

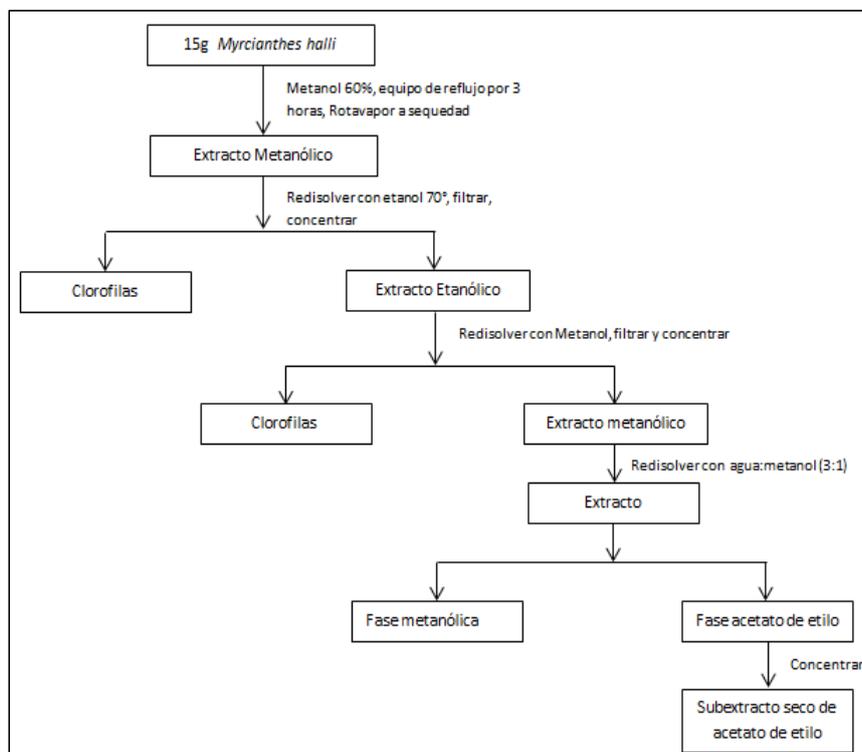


Figura 4-2: Diagrama de flujo para obtención del extracto *Myrcianthes hallii*

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

2.7 Cromatografía en capa fina (TLC)

2.7.1 Cromatografía de la fracción flavónica a partir del extracto metanólico 60% de (*Myrcianthes hallii*).

- A 20mg de subextracto seco de acetato de etilo se reconstituyo con 1mL del mismo solvente
- Utilizar para realizar la cromatografía
- Aplicar con la ayuda de un capilar 20µL del concentrado en la placa cromatográfica de sílica gel
- Introducir la placa en la cuba cromatográfica, y permitir correr la fase móvil hasta las tres cuartas partes de la placa.
- Retirar la placa de la cuba, secar al ambiente y observar en la lámpara UV.

- Revelar, secar la placa y medir el Rf. (Miranda, 2006, pp. 32-62)

Expresión de los resultados:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida de la muestra}}{\text{Distancia recorrida del solvente}}$$

2.8 Evaluación de las actividades farmacológicas

2.8.1 Determinación de la actividad cicatrizante *in vitro*

2.8.1.1 Determinación de la inhibición de la hialuronidasa.

Para la evaluación de la actividad inhibitoria de la hialuronidasa de la fracción flavónica obtenido de *Myrcianthes halli* se realizaron dos ensayos.

2.8.1.2 Inhibición de hialuronidasa bovina

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

- Tomar 50μL de hialuronidasa bovina, la cual se disuelve en buffer acetato 0.1M (pH 3.6)
- Mezclar la solución con 50μL de las fracciones flavónicas en diferentes concentraciones: 5; 10; 20; 40; 60 y 80 mg/mL de hojas de la materia vegetal disueltos en dimetilsulfóxido al 5%. Para el grupo control se toma 50μL de dimetilsulfóxido al 5%.
- La mezcla someter a incubación a 37°C por 20 minutos.
- Después añadir 50μL de CaCl₂ 12.5mM para activar la enzima e incubar a 37°C por 20 minutos.
- Seguidamente agregar a la mezcla 250μL de hialuronato de sodio (1.2mg/mL) e incubar a 37°C por 40 minutos.
- Posteriormente añadir 50μL de NaOH 0.4M y 100μL de borato de sodio 0.2M, someter a la mezcla a un baño de agua hirviendo por 3 minutos.
- Después de enfriar inmediatamente agregar 1.5mL de p-dimetilaminobenzaldehido (4g de p-dimetilaminobenzaldehido disolver en 50mL de HCl 10N con 350 mL de ácido acético glacial) e incubar a 37°C por 20 minutos hasta desarrollar color.
- Medir la absorbancia a 585nm en un espectrofotómetro, se expresa como el porcentaje de inhibición. (Suntar, Tumen, Ustun, Keles, & Akkol, 2012, pp. 533-540)

Cálculo del porcentaje de inhibición:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

A_c = Absorbancia del control

A_s = Absorbancia de la muestra a diferentes concentraciones

Tabla 2-2: Protocolo de tratamientos de *Myrcianthes halli* en inhibición de la hialuronidasa bovina.

Inhibición de hialuronidasa bovina								
BLANCO	CONTROL MÁXIMA ACTIVIDAD	HOJAS						REACTIVOS
		K1	K2	K3	K4	K5	K6	
50μL								Buffer acetato pH 3,6
	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL	hialuronidasa bovina en buffer acetato pH 3.6
	50μL							DMSO 5%
50μL		50μL	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL	Concentraciones flavónicas + DMSO 5%
Incubación a 37°C por 20 minutos								
50μL	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL	CaCl₂ 12.5mM
Incubación a 37°C por 20 minutos								
	250μL	250μL	250μL	250μL	250μL	250μL	250μL	Hialuronato de sodio
Incubación a 37°C por 40 minutos								
50μL	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL	NaOH 0.4M
100μL	100μL	100μL	100μL	100μL	100μL	100μL	100μL	Borato de sodio 0.2M
Baño de agua hirviendo por 3 minutos y enfriar								
1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL	p-dimetilaminobenzaldehido
Incubar a 37°C por 20 minutos								
Leer la absorbancia a 585 nm								

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

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

- Disolver en 20μL solución salina 100μg de veneno de cobra e incubar a 37°C con 50μg de ácido hialurónico en 250μL de buffer acetato 0.2M (pH 5.0) contenidos en cloruro de sodio 0.15N.
- Leer la absorbancia de dicha mezcla a 585nm

- Las fracciones flavónicas de las hojas de la material vegetal se disuelven como en el ensayo anterior.
- Expresar como el porcentaje de inhibición. (Suntar, Tumen, Ustun, Keles, & Akkol, 2012, pp. 533-540)

Cálculo del porcentaje de inhibición:

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

Ac = Absorbancia del control

As= Absorbancia de la muestra a diferentes concentraciones

Tabla 3-2: Protocolo de tratamientos de *Myrcianthes halli* en inhibición de la hialuronidasa presente en el veneno de cobra *Naja naja*

Ensayo de veneno de cobra								
BLANCO	CONTROL MÁXIMA ACTIVIDAD	HOJAS K1	HOJAS K2	HOJAS K3	HOJAS K4	HOJAS K5	HOJAS K6	REACTIVOS
250µl								Buffer acetato pH 5
	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	Veneno de cobra + solución salina
	250µl	250µl	250µl	250µl	250µl	250µl	250µl	Ácido hialurónico en buffer acetato 0.2M (pH 5) contenidos en NaCl 0,15N
50µL								DMSO 5%
		50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	Concentraciones flavónicas + DMSO 5%
Incubar a 37°C								
Leer absorbancia a 585 nm								

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

2.8.2 Evaluación de la actividad cicatrizante del extracto hidroalcohólicos de *Myrcianthes halli*

Se empleó un lote de 25 ratones (*Mus musculus*) machos y hembras, procedentes del Bioterio de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, de 2 a 3 meses de edad y con un peso promedio de 30-50 g. Estos se distribuyeron en 5 grupos de 5 ratones seleccionados aleatoriamente y ubicados de forma individual en cajas plásticas.

2.8.2.1 Periodo de ambientación o acondicionamiento

A todos los animales se los mantuvo bajo las mismas condiciones planteadas en el protocolo de investigación.

Humedad: 40-70%

Temperatura: 22 °C ±2

Fotoluminiscencia: 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad

Ruido: Ausente

Alimentación: Pellets y Agua *Ad libitum*

Se ambientó al reactivo biológico tanto al investigador como a la técnica a realizar mediante manipulación y adaptación. Se los mantuvo en periodo de adaptación por un lapso de 15 días, verificando que las condiciones sean las establecidas. (Cabezas, 2014, pp. 49-52)

2.8.2.2 *Inducción a la herida*

Se procedió a realizar la depilación de la zona dorsal de los ratones, con crema depilatoria Veet. Se humedeció con agua tibia previamente la zona a depilar, se colocó la crema depilatoria por un tiempo máximo de 5 min y se retiró con ayuda de gasas húmedas.

Este procedimiento se realizó 24 horas antes de la inducción de la herida para descartar de esta forma la aparición de alguna reacción alérgica.

Se desinfectó la zona depilada y se colocó como anestesia lidocaína con epinefrina, se marcó 2 cm de longitud perpendicularmente al eje longitudinal del ratón. Se procedió a realizar el corte con un bisturí en la zona delimitada con una profundidad de 2 mm. (Cabezas, 2014, pp. 49-52)

2.8.2.3 *Tratamiento*

Una vez obtenido el extracto madre, se realizaron las diluciones para obtener los extractos a las diferentes concentraciones establecidas: 40, 60 y 80mg/mL con el objetivo de identificar cuál de estas concentraciones presenta una mayor actividad cicatrizante sobre los reactivos biológicos. Para obtener estos extractos se realizaron diluciones tomando del extracto madre y diluyendo con alcohol al 40%.

Se administró tópicamente a cada grupo los tratamientos correspondientes, cada 12 horas, y se aplicó mediante hisopos, por aspersión y con jeringas.

Tabla 4-2 Grupos de experimentación

	CONTROL (-)	CONTROL (+)	EXTRACTO 40 %	EXTRACTO 60 %	EXTRACTO 80 %
	G1	H1	X1	Y1	Z1
	G2	H2	X2	Y2	Z2
	G3	H3	X3	Y3	Z3
	G4	H4	X4	Y4	Z4
	G5	H5	X5	Y5	Z5
GRUPOS	O1	O2	O3	O4	O5

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

O = Grupos

G = Animales sin tratamiento

H = Animales tratados con Lamoderm

X = Animales tratados con extracto 20 %

Y = Animales tratados con extracto 40 %

Z = Animales tratados con extracto 80 %

2.8.2.4 Tipos de respuesta

Los tipos de respuesta que se evaluaron durante y después de administrados los tratamientos fueron:

- **Días de cicatrización**

Se consideraron los días en que tardó en cerrar y cicatrizar completamente las heridas inducidas de cada grupo.

- **Longitud final de la cicatriz**

Se tomó la medida en centímetros de las cicatrices finales, después de caídas las costras de los grupos experimentales.

2.8.2.5 Examen histopatológico

Los animales fueron sacrificados después a la cicatrización de las heridas, mediante dislocación cervical. Se obtuvieron las muestras realizando un corte de 3 cm de largo y 2 cm de ancho

alrededor de la zona de tratamiento. Estas muestras fueron colocadas en frascos estériles con formol diluido al 10% para un posterior análisis histopatológico.

Con estas muestras se realizaron las placas para su observación microscópica y evaluar el porcentaje de regeneración celular con los diferentes tratamientos administrados mediante la observación de los tejidos.

CAPITULO III

3 MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Después de haber realizado el control de calidad de la planta cruda como del extracto y las pruebas de evaluación de la actividad cicatrizante de *Myrcianthes halli* se obtuvieron los siguientes resultados.

3.1 Control de calidad de la materia vegetal

CUADRO 1-3: Control de calidad de las hojas de la planta seca *Myrcianthes halli*

PARAMETRO	<i>Myrcianthes halli</i> Hojas	Desviación Estándar	Especificaciones USP # 28
HUMEDAD	9.84%	± 0.014	7-14%
CENIZAS TOTALES	8.82%	± 0.16	Hasta 12%
CENIZAS SOLUBLES EN AGUA	7.34%	± 0.09	Hasta 7%
CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO	1.07%	± 0.11	Hasta 5%

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

El cuadro N° 1-3, se expresan los resultados del control de calidad realizado a las hojas de *Myrcianthes halli* obteniendo un porcentaje de humedad de 9.84% que garantiza que la materia vegetal se encuentra dentro de los parámetros que especifica la USP #28 para prevenir la proliferación microbiana.

El contenido de cenizas totales está relacionado con sustancias minerales en una muestra vegetal ya que expresa como una medida general de calidad porque la materia mineral puede estar inmiscuida en alguna acción farmacológica; si existe un porcentaje elevado de cenizas insolubles en ácido quiere decir que la materia prima no se recolectó adecuadamente y puede estar contaminada con arena o tierra silícea.

Como se puede observar el porcentaje de cenizas totales con valor 8.82%, cenizas solubles en agua 7.34% y cenizas insolubles en ácido clorhídrico 1.07% están dentro de las especificaciones USP # 28 lo cual nos indica que la materia vegetal fue recolectada adecuadamente.

3.2 Calidad físico-química del extracto de arrayán

CUADRO 2-3: Determinación organoléptica, densidad relativa, índice de refracción y pH del extracto fluidos de arrayán

ARRAYÁN	
OLOR	Aromático
COLOR	Verde intenso
ASPECTO	Transparente, homogéneo
p²⁵	1.0092

η^{20}	1.358
pH	4.22

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

Los resultados revelaron las características típicas de un extracto, entre las cuales se encuentra una ligera acidez, la cual favorece: a) conservación del dentífrico elaborado, previniendo el desarrollo bacteriano a largo plazo, b) absorción óptima a nivel celular de los compuestos terapéuticos, c) su aromaticidad corroboró la presencia de aceites esenciales.

3.3 Tamizaje Fitoquímico

Se efectuó el tamizaje fitoquímico según la técnica indicada en bibliografía (Miranda, 2006, pp. 32-62) para la determinación de los metabolitos secundarios principales en hojas de *Myrcianthes halli*, los extractos se realizaron con diferentes solventes: éter dietílico, alcohol al 96% y agua destilada analizados presentaron los siguientes resultados.

CUADRO 3-3: Tamizaje fitoquímico de los extractos de hojas de *Myrcianthes halli*.

METABOLITO	ENSAYO	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
Alcaloides	Dragendorff		(+++)	(++)
	Wagner		(+++)	(++)
	Mayer		(+++)	(++)
Triterpenos y Esteroides	Lieberman-Buchard	(+)	(-)	
	Shinoda		(++)	
Flavonoides	Antocianidinas		(++)	
	Cloruro férrico		(+)	
Taninos y Fenoles	Espuma		(+)	(-)
Saponinas	Fehling			(-)
Azúcares reductores	Sudan III	(+)		
Compuestos grasos	Borntrager			
Quinonas	Baljet	(-)	(++)	

Catequinas	Catequinas	(+)
Resinas	Resinas	(-)

(-) Ausencia; (+) Posible presencia; (++) Presencia confirmada; (+++) Presencia de cantidad suficiente

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

El tamizaje fitoquímico del extracto de *Myrcianthes halli* evidenció la presencia de flavonoides, azúcares reductores, taninos, lactonas, triterpenos y esteroides, siendo destacable la presencia de flavonoides, lo cual se evidencia la presencia de compuestos fenólicos en hojas lo que nos permite deducir que estos compuestos actúan en la cicatrización, como se ha demostrado que poseen propiedades astringentes, antioxidantes y antimicrobianas, antiinflamatoria, antialérgica y antitrombótica comprobadas.

3.4 Cromatografía de capa fina

3.4.1 Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica de hojas de *Myrcianthes halli*

Se realizó una cromatografía de capa fina de la fracción flavónica, mostró características en buena resolución, presentó manchas separadas los cuales son compuestos de la fracción obtenido de acuerdo a las siguientes condiciones: **Fase móvil:** cloroformo: acetona: ácido fórmico 7:2:1, luego de haber probado con diferentes solventes se obtuvo mejores resultados que se muestran en la Figura 5-3. Al no encontrar en bibliografía valores de Rf de los flavonoides aislados en esta fase móvil, se eluyó el estándar quercetina.

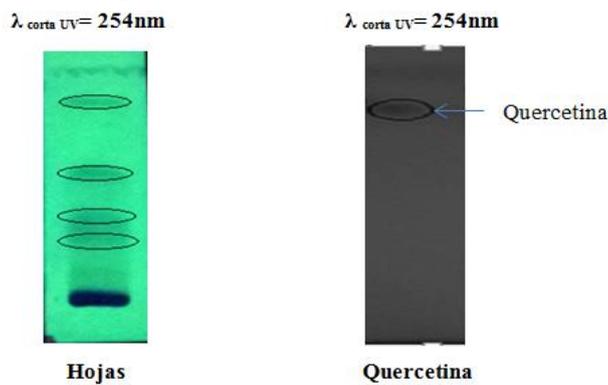


Figura 5-3: Cromatografía en capa fina de la fracción flavónica de las hojas de *Myrcianthes halli*

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

CUADRO 4-3: Resultados de la determinación de Rf de la cromatografía en capa fina de la

fracción flavónica de hojas de *Myrcianthes halli*.

MUESTRAS	Rf Teórico	Rf Práctico
HOJAS	0,27-0,37 (Luteolina)	-
	0,39-0,46 (Miricetina)	0.47
	0,48-0,51 (Apigenina)	-
	0,53-0,59 (Rutina)	0.59
	0,71-0,82 (Isoquercitrina)	0.80
	0,84-0,93 (Quercetina)	0.87

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

Adsorbentes: Sílica gel 60PF 254 (Sigma Aldrich)

Sistema de solventes: Cloroformo-acetona-ácido fórmico (7:2:1)

Revelador: UV λ larga λ corta

El perfil cromatográfico del extracto *Myrcianthes halli* mostró respectivamente 4 bandas, al calcular los Rf para el estándar y extracto, se puede indicar que la quercetina están presentes en la fracción flavónica. La quercetina al ser una aglicona tiene características farmacológicas importantes, entre las cuales se puede mencionar: antiinflamatorias, sedante, antiespasmódica, diurética, laxante y cardiotónico. (Martínez, 2001, pp. 8)

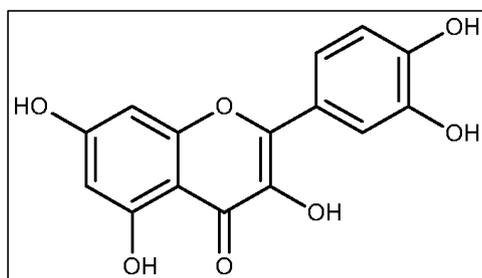


Figura 6-3: Estructura química de la Quercetina

Fuente: Martínez, 2001, pp. 8

Comentado [U1]: Busca alguna que esté en todo negro sino queda informal

3.5 Evaluación de la actividad cicatrizante *in vitro* mediante inhibición de la hialuronidasa

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

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

3.5.1 Inhibición de la hialuronidasa bovina

CUADRO 5-3: Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa bovina por efecto de las fracciones flavónicas de las hojas *Myrcianthes halli*.

MATERIAL VEGETAL	FRACCION FLAVONICA	CONCENTRACIÓN mg/mL	% INHIBICIÓN
<i>Myrcianthes halli</i>	Hojas	80	54.70
		60	18.00
		40	16.23
		20	12.82
		10	7.69
		5	5.98

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

En el cuadro N° 5-3 se puede observar que la fracción flavónica de hojas *Myrcianthes halli* tiene una actividad inhibitoria ya que se obtuvo un 50.70% de inhibición de la hialuronidasa bovina en la dosis de 80mg/mL esto quiere decir que a mayor dosis mayor efecto inhibitorio.

Con este resultado se puede demostrar la especificidad de la fracción flavónica, es decir cuanto mayor es la concentración de los compuestos flavónicos mayor será su actividad inhibitoria según bibliografía esto puede deberse a la mayor concentración presentes de Taninos los cuales van a participar en la reepitelización de los tejidos y aceleración de la cicatrización de las heridas, en conjunto con los flavonoides. (Cabezas, 2014, pp. 59)

Al comparar los resultados con Sánchez (2015, pp. 43-44) que llevó a cabo la inhibición de la hialuronidasa bovina con fracción de acetato de etilo de hojas de *Pelargonium x domesticum L.H. Bailey* partiendo de un extracto metanólico, se observa que a muy bajas concentraciones de la fracción inhiben significativamente a la hialuronidasa 0,625mg/mL inhiben un 92,49%. Se puede decir que a dosis bajas mejor efecto inhibitorio, a diferencia de la especie utilizada en este estudio.

Al comparar los resultados con los de Monge (2015, pp. 24-26) se puede ver que la fracción flavónica solo de las hojas de *Plectranthus amboinicus* presentan una inhibición de hialuronidasa bovina del 82,5% en la dosis de 20 mg/mL lo cual se demostro que a mayor dosis mejor efecto inhibitorio, al igual que el caso de *Myrcianthes halli* que a 80mg/mL inhiben un 54.70% .

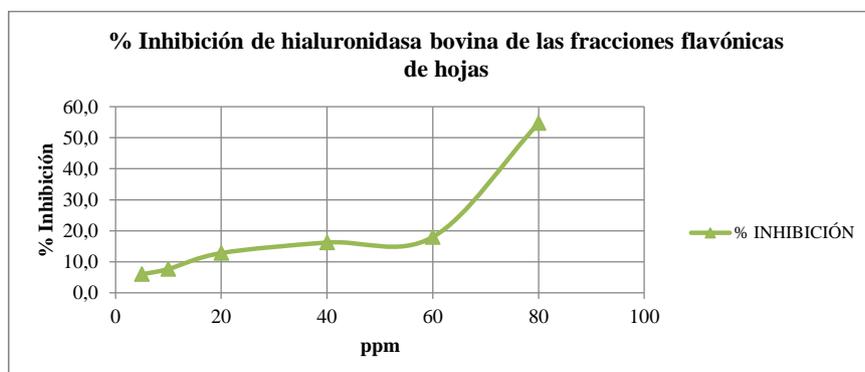


Figura 7-3: Curva del % de inhibición de la hialuronidasa bovina por efecto de la fracción flavónica de hojas de *Myrcianthes halli*

Fuente: Jenny Chávez, 2016

En la Figura 7-3, se puede observar que la fracción flavónica de hojas de *Myrcianthes halli* presenta mayor porcentaje de inhibición de la hialuronidasa bovina a mayor concentración o dosis la cual es 80mg/mL, es decir, a mayor concentración se logra mayor porcentaje de inhibición para esta enzima.

Por lo tanto podemos decir que a concentraciones menores de fracción flavónica de hojas tienden a formar complejos lo cual dificulta la inhibición enzimática, mientras que a dosis mayores los compuestos están más libres y pueden actuar de mejor manera inhibiendo mayor porcentaje de hialuronidasa bovina. (Sánchez, 2015, pp. 45)

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

CUADRO 6-3: Porcentaje de inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra *Naja naja* por efecto de la fracción flavónica de hojas *Myrcianthes halli*.

MATERIAL VEGETAL	FRACCION FLAVONICA	CONCENTRACIÓN mg/mL	% INHIBICIÓN
<i>Myrcianthes halli</i>	HOJAS	80	65.72
		60	43.90
		40	40.18
		20	35.24
		10	26.02

		5	17.75
--	--	---	-------

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

Según el cuadro 6-3, la fracción flavónica de las hojas *Myrcianthes halli* en dosis de 80mg/mL permite el 65,72% de inhibición de hialuronidasa encontrada en el veneno de cobra *Naja naja*, las demás dosis realizadas en la investigación son aceptables, es decir, que a dosis bajas se inhibe significativamente la hialuronidasa del veneno de cobra. Para las hojas, a una concentración de 60mg/mL admite un 43,90% de inhibición.

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

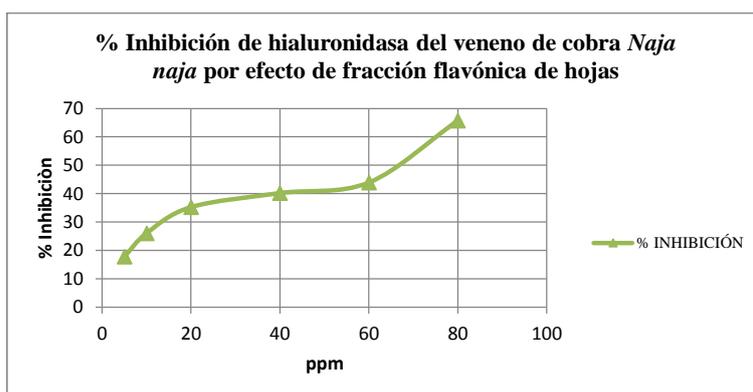


Figura 8-3: Curva del % de inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra *Naja naja* por efecto de fracción flavónica de hojas de *Myrcianthes halli*.

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

En la Figura 7-3 se observa que la fracción flavónica de hojas se presenta un 65,72% de inhibición de la hialuronidasa a 80mg/mL y un 17,75% de inhibición a una concentración menor de 5mg/mL, si se seguiría realizando concentraciones altas se obtendría mayor porcentaje de inhibición, por lo cual a mayores concentraciones va haber una mayor inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra *Naja naja*.

CUADRO 7-3: Efecto de la fracción flavónica de hojas del *Myrcianthes halli* en la inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra *Naja naja*.

Tiempo seg	Máxima actividad	80mg/mL	60mg/mL	40mg/mL	20mg/mL	10mg/mL	5mg/mL
0	0,034	0,010	0,018	0,019	0,023	0,026	0,029
30	0,058	0,012	0,021	0,030	0,032	0,036	0,043
60	0,075	0,020	0,048	0,042	0,045	0,050	0,052
90	0,095	0,038	0,059	0,059	0,062	0,069	0,079
120	0,109	0,052	0,072	0,072	0,079	0,085	0,092
150	0,112	0,052	0,086	0,088	0,089	0,094	0,098
180	0,118	0,052	0,086	0,088	0,090	0,096	0,104
210	0,122	0,052	0,084	0,088	0,090	0,099	0,110
240	0,122	0,048	0,073	0,079	0,090	0,099	0,110
270	0,122	0,029	0,038	0,055	0,059	0,087	0,101
300	0,122	0,020	0,032	0,038	0,049	0,072	0,085

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

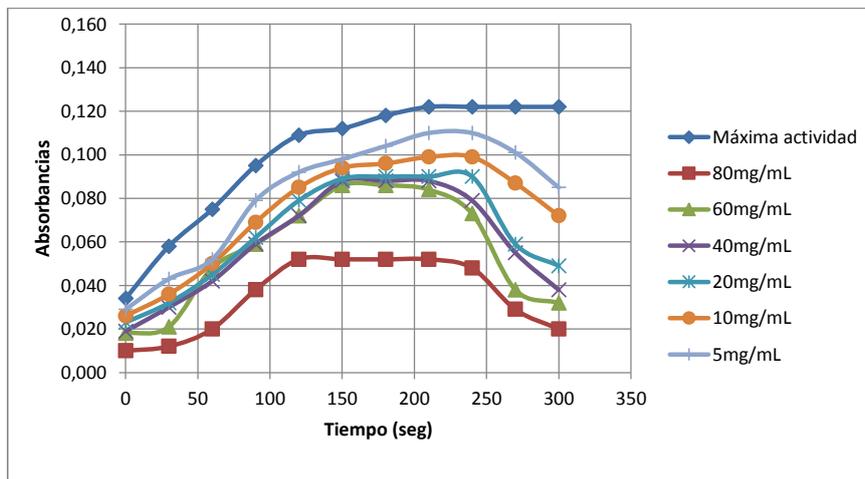


Figura 9-3: Curva del efecto de la fracción flavónica de hojas de *Myrcianthes halli* en inhibición de hialuronidasa del veneno de cobra

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

En la Figura 8-3, de igual forma se observa la curva de máxima actividad de la hialuronidasa presente en el veneno de cobra la que interviene en la degradación del ácido hialurónico liberando N-acetilglucosamina y ácido glucurónico.

Cuando la hialuronidasa interacciona con 80mg/ml de fitocompuestos flavónicos de hojas se liberaría en menor cantidad de N-acetilglucosamina y a los 120 segundos de la reacción se mantiene la absorbancia y después empieza a decrecer la curva. Se demuestra que a mayor

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

3.5.3 Análisis estadístico

Con los datos *in vitro* obtenidos del porcentaje de inhibición de la hialuronidasa bovina y el porcentaje de inhibición presente en el veneno de cobra con la fracción flavónica de hojas de *Myrcianthes halli* se efectuó la prueba de Shapiro-Wilk cumpliendo ambos el supuesto de Normalidad con un p-value $> 0,05$ respectivamente e indicando que los datos se encuentran normalmente distribuidos. Seguido de un test Levene para determinar la Homogeneidad de varianzas dando un p-value $> 0,05$ lo que indica la Heterogeneidad de las varianzas en ambos casos, y mediante el ANOVA Unifactorial con un valor p-value $< 0,05$ se observa que existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de hialuronidasa respectivamente. Corroborando con la prueba Post-hoc de HSD Tukey con p-value $< 0,05$ al 95% de confianza estadística en el porcentaje de inhibición de la hialuronidasa presente en veneno de cobra a 80mg/ml y un p-value $< 0,05$ al 95% de confianza estadística en el porcentaje de inhibición de la hialuronidasa bovina con diferencias significativas en los tratamientos de 20mg/ml y 80mg/ml (ver Anexo S y R). Para los análisis estadísticos se utilizó el Software IBM SPSS Statistics Versión 23.0.0.0 (2015).

3.6 Evaluación del efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de arrayán (*Myrcianthes halli*) *in vivo*.

Se evaluó la actividad cicatrizante del extracto hidroalcohólico de arrayán (*Myrcianthes halli*), administrando de forma tópica, con extractos hidroalcohólicos de planta al 40, 60 y 80 %. Al control (+) se administró Lamoderm y por último el control (-) al cual no se administró ningún tipo de tratamiento. Se observó el tiempo cicatrización y longitud de la cicatriz.

3.6.1 Reducción del tiempo de cicatrización

El proceso de cicatrización ocurre en varios días dependiendo del tipo de tratamiento. Los días del tratamiento fueron los necesarios para que las heridas de cada animal pierdan costra y presenten una piel renovada.

CUADRO 8-3 Efecto cicatrizante de extractos hidroalcohólicos de *Myrcianthes halli* evaluado mediante días de cicatrización y longitud de la herida. BIOTERIO. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Enero 2016

GRUPOS	CICATRIZACIÓN (DÍAS)	LONGITUD CICATRIZ (cm)
Sin tratamiento	15.74 ± 0.058	1.18 ± 0.058
Lamoderm	14.74 ± 0.058	1.07 ± 0.058
Extracto 40%	12.74 ± 0.058	1.18 ± 0.058
Extracto 60%	11.74 ± 0.058	0.86 ± 0.058
Extracto 80%	11.74 ± 0.058	0.86 ± 0.058

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

Según los datos obtenidos y expresados en el Cuadro 8-3 el tratamiento con mejores resultados y mayor efecto cicatrizante fue el tratamiento con el Extracto de 60% y 80% siendo la más efectiva que el control positivo. Debido a que este grupo llevó 11.74 días en cicatrizar completamente la herida inducida, a diferencia de los otros tratamientos que llevaron más días en hacerlo.

Comentado [U2]: Es bueno que también comentes que la cicatrización con tu planta es hasta más efectiva q el control +

Esto puede deberse a la mayor cantidad de flavonoides, metabolitos secundario encargado de la reepitelización de los tejidos que junto al contenido de taninos presentes producen un efecto sinérgico acelerando la cicatrización de las heridas. (Proaño, 2013, pp. 65)

Además se pueden observar las longitudes finales de las cicatrices de cada grupo después de finalizados los tratamientos. Identificando que las cicatrices que presentaron una menor longitud fueron aquellas a los cuales se les aplicó el tratamiento con extracto al 60 y 80%, determinando que se obtuvo una mayor eficacia con este tratamiento al disminuir de forma notable el tamaño de las cicatrices.

CUADRO 9-3: Reducción en porcentaje del tiempo de cicatrización de cada grupo en relación a la ausencia de tratamiento. Bioterio. Facultad de ciencias. ESPOCH. Enero 2016

GRUPO		CICATRIZACIÓN EN DÍAS	TIEMPO DE CICATRIZACIÓN (%)
Control (-)	Sin tratamiento	16	100
Control (+)	Lamoderm	15	94
	Extracto 40%	13	81
	Extracto 60 %	12	75
	Extracto 80 %	12	75

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

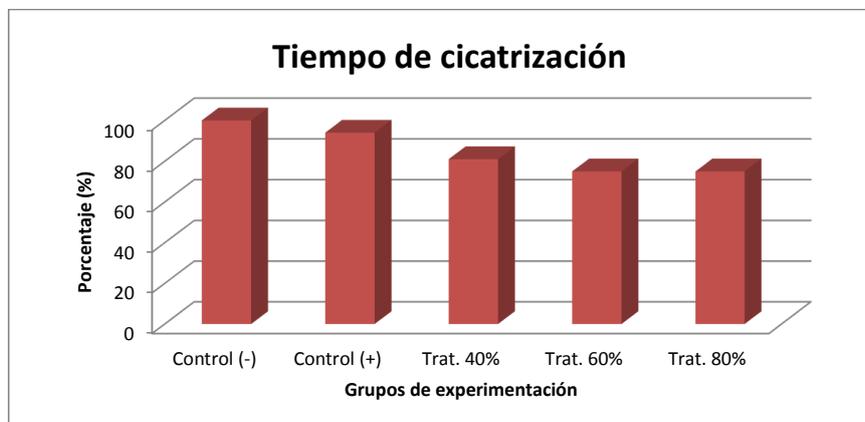


GRAFICO 1-3: Reducción del tiempo de cicatrización de cada grupo en relación a la ausencia de tratamiento. Bioterio de la facultad de ciencias. ESPOCH. Enero. 2016

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

En el cuadro 9-3 y gráfico 1-3 se toma como referencia los 16 días de cicatrización del Control (-), es decir, el grupo al que no se le administró el tratamiento, expresándose como el 100%. Al Control (+) se le aplicó Lamoderm como tratamiento, en este grupo se redujo el tiempo de cicatrización de 6%. En el extracto al 40%, el tiempo de cicatrización se reduce a un 19%, para el extracto al 60 y 80% se puede observar claramente que existe una reducción notoria del tiempo de cicatrización con respecto al Control (-), ya que tiene una reducción del 25%. Siendo un porcentaje menor también en comparación a los demás tratamientos.

Al comparar con los resultados de *in vitro* podemos notar que la inhibición de hialuronidasa se da en concentraciones altas al igual que en *in vivo* por lo que no existe mucha diferencia por lo que los dos métodos nos ayudan a corroborar la actividad cicatrizante.

3.6.2 Análisis estadístico

Este análisis se efectuó con los datos obtenidos de los grupos (Control +; Control -; Extracto 40%; Extracto 60%; Extracto 80%) de tratamientos evaluando el efecto cicatrizante mediante los días de cicatrización y la longitud de cicatrización, se realizó la prueba Shapiro-Wilk para determinar si los datos cumplen el supuesto de Normalidad obteniéndose un p-value > 0,05 para ambos métodos respectivamente e indicando que los datos se encuentran normalmente distribuidos. Luego se efectuó un test Levene para comprobar la Homogeneidad de varianzas arrojando un p-value > 0,05 manifestando la Heterogeneidad de las varianzas en ambos casos, seguido se realizó un ANOVA

Unifactorial con un p-value > 0.05 para el efecto cicatrizante considerando la longitud de cicatrización es decir, no existe diferencia significativa entre las medias de dicho ensayo y un valor p-value < 0,05 para el efecto cicatrizante considerando los días de cicatrización existiendo diferencias significativas en este tratamiento. Finalmente se ejecutó un Post-hoc de HSD Tukey al 95% de confianza estadística para el efecto cicatrizante considerando los días de tratamiento y se obtuvo un p-value > 0.05 en los tratamientos (80%, 60% y 40%) y controles respectivamente, se dividieron en 2 subgrupos con diferencias significativas en los tratamientos con respecto a los controles (ver Anexo T y U). Para los análisis estadísticos se utilizó el Software IBM SPSS Statistics Versión 23.0.0.0 (2015).

3.6.3 Examen Histopatológico

CUADRO 10-3: Examen histopatológico de piel de ratones (*Mus musculus*) a los cuales se administró extracto hidroalcohólico de Arrayán (*Myrcianthes halli*) para la evaluación del efecto cicatrizante.

MUESTRA	EXAMEN MACROSCÓPICO	EXAMEN MICROSCÓPICO
X 40% (Extracto <i>Myrcianthes halli</i>)	Largo: 2.5 cm Ancho: 2 cm Color: Rojizo Aspecto: Liso, algo agradable Forma/Trayecto: Longitudinal Profundidad: Ninguna/Superficial Herida cerrada	Proceso de cicatrización en 80 %. Piel con tejido fibroso.
Y 60 % (Extracto <i>Myrcianthes halli</i>)	Largo: 2.5 cm Ancho: 2cm Color: Blanco Aspecto: Algo liso, algo agradable Forma/Trayectoria: Longitudinal Profundidad: Ninguna/Superficial Herida cerrada	Proceso de cicatrización en 95%. Piel con tejido fibroso.
Z 80 % (Extracto <i>Myrcianthes halli</i>)	Largo: 2.5 cm Ancho: 2 cm Color: Blanco Aspecto: Algo liso, algo agradable Forma/Trayectoria: Longitudinal Profundidad: Ninguna/Superficial	Proceso de cicatrización en 95%. Piel con tejido fibroso.

	Herida cerrada	
H (Lamoderm)	Largo: 2.5 cm Ancho: 2 cm Color: Blanco Aspecto: Algo liso, algo agradable Forma/Trayectoria: Longitudinal Profundidad: Ninguna/Superficial Herida cerrada	Piel con proceso de cicatrización en 100%. Presencia de epitelio escamoso. Células basales de la epidermis proveen continuidad con tejido conectivo denso.
G (Control negativo)	Largo: 2.5 cm Ancho: 2cm Color: Blanco Aspecto: Algo liso, algo agradable Forma/Trayectoria: Longitudinal Profundidad: Ninguna/Superficial Herida cerrada	Piel con proceso de cicatrización en 40% Presencia de tejido de granulación y fibrosis.

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

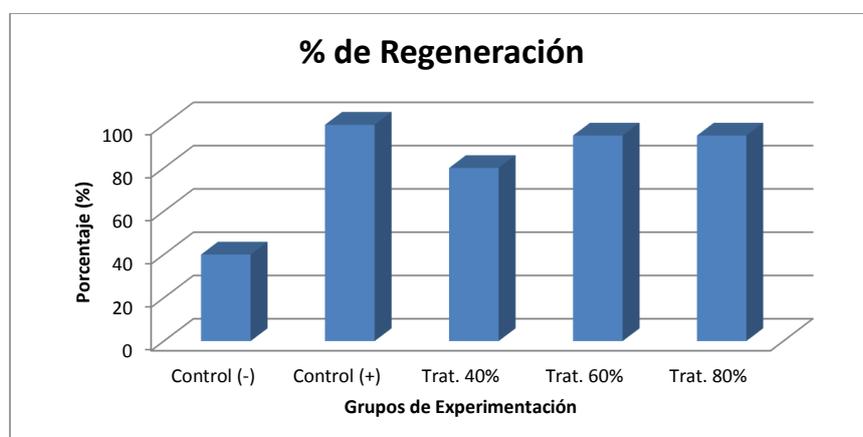


Grafico 2-3 Porcentaje de regeneración celular en ratones (*Mus musculus*) a los que se administró extracto hidroalcohólico de Arrayán (*Myrcianthes halli*).

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

En el gráfico 2-3 se encuentran representados los porcentajes de regeneración de cada grupo, pudiéndose observar que el tratamiento que presenta un 100% en regeneración es el grupo al cual se aplicó Lamoderm, mientras que el 95 % en regeneración corresponde al extracto al 60 y 80 %. El extracto al 40 % presenta una regeneración del 80%, mientras al que no se aplicó

ningún tratamiento, presentó apenas un 40% de regeneración. Estos datos en conjunto con los presentados en el cuadro 9-3 muestran que el extracto al 60 y 80 % resulta eficaz en la cicatrización de heridas superficiales.

CONCLUSIONES

- Se realizó el control de calidad de *Myrcianthes halli* de las hojas secas, de manera que tanto humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua como cenizas insolubles en ácido clorhídrico, están dentro de los valores establecidos por la USP # 28, indicando que existió adecuada recolección de la materia prima sin ningún tipo de contaminación; a la vez las condiciones de secado, conservación y almacenamiento fueron correctas. El tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso demostró la presencia de varios metabolitos secundarios entre ellos flavonoides, azúcares reductores, taninos, lactonas, triterpenos y esteroides, siendo destacable la presencia de flavonoides.
- Se determinó la actividad inhibitoria de la fracción flavónica del *Myrcianthes halli* en la hialuronidasa bovina y en la enzima hialuronidasa del veneno de cobra en hojas, siendo la dosis de 80 mg/mL dio un mayor porcentaje de inhibición, en este caso a mayor dosis mayor efecto inhibitorio, lo cual ofrece un mejor efecto cicatrizante en pacientes con heridas complicadas.
- Se comprobó el efecto cicatrizante del *Myrcianthes halli* sobre heridas inducidas, en relación a el control positivos Lamoderm, evidenciándose un mayor efecto en el tratamiento con el extracto hidroalcohólico de arrayán al 60 y 80 %, al presentar un menor tiempo de

cicatrización y una menor longitud de la cicatriz. Mientras que en el análisis macroscópico y microscópico el extracto hidroalcohólico a las diferentes concentraciones presenta altos niveles de regeneración celular durante la cicatrización.

RECOMENDACIONES

- Se debe realizar el estudio de cicatrización utilizando un vehículo similar al del control positivo, disminuyendo así la posibilidad de errores en los resultados debido este.
- Es necesario profundizar y realizar más investigaciones sobre el efecto cicatrizante de arrayán (*Myrcianthes halli*) con el objeto de poder obtener un fitofármaco que sea accesible a la población.
- Es necesario continuar con un análisis de toxicidad crónica para que el vegetal pueda ser comercializado como tal o sus principios activos en una forma farmacéutica.

BIBLIOGRAFIA

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

ARIAS, J., ALLER, M., ARIAS, J., & LORENTE, L. "Fisiopatología quirúrgicas" *Tébar*, vol.1 Madrid – España, 1999, pp.120-129

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

BETÉS, M. "Introducción a la farmacología –conceptos generales" *España: Medica panamericana, S.A*, vol.1 , 2008, pp. 4-5

BUENO, Mar. " Historia de las hierbas mágicas y medicinales". Nowtilus.S.L, vol.1, n°1,2008, pp.27-40

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

CABEZAS, G. *Evaluación del efecto cicatrizante de extractos a base de mastuerzo (tropaeolum majus) en ratones (Mus musculus).* (Tesis pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba -Ecuador. 2015, pp. 49-52

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

CAMERON, M. "Agentes físicos en rehabilitación de la investigación a la práctica." *Barcelona: Española*, 2009, Barcelona- España, pp.5 - 41

COSSIO, S. " Respuestas tisulares a materiales de relleno." *Santiago de costopela : Plastic and reconstructive surgery* , vol.1, n°1. 2007, España, pp. 69-72

CHEN, J., & ABATANGELO, G. "Functions of hyaluronan in wound repair. Wound Repair and Regeneration". *Biomedical* [en línea],2002, vol. 12, n° 20 pp.147–156. [Consulta: 03 de Noviembre 2015]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0124-81462010000100008&script=sci_arttext

CUELLO, J. " Didáctica de la genética". *Barcelona: Universidad de Barcelona*, vol.28 1983, Barcelona, pp. 107-108 mm

DEPALMA, R., KRUMMEL, T., DURHAM, L., MICHNA, B., THOMAS, B., NELSON, J., & DIEGELMANN, R. "Characterization and quantitation of wound matrix in the fetal rabbit". *Pubmed*, vol.1, n°1. 1989, USA, pp. 224-231

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

GÓMEZ, C., "Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de *Myrcianthes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku yuyo), especies reportadas en peguche – imbabura, sobre *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* causantes de enfermedades bucofaríngeas".(Tesis pregrado). Escuela Politécnica del Ejército, Escuela de Ingeniería en Biotecnología. Quito - Ecuador. 2010, pp. 114-115

GOVAERTS, R. "Catalogo de vida". [blog] 2010 [Consultado 23 de Diciembre 2015]. Disponible en: www.catalogueoflife.org

HERVÍAS, R.. "La medicina natural y su demanda". [blog] 2006 [Consultado 22 de Diciembre 2015]. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos34/medicina-natural/medicina-natural.shtml>

JARAMILLO, K. "Evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de arrayán (*Myrcianthes hallii*) (o. berg) mc vaugh. Quito, Pichincha" (Tesis pregrado). Universidad Central del Ecuador, Ingeniería Agronomica. Quito-Ecuador. 2013, pp. 4-5

LERMA, L. *Evaluación Bioquímica y Biológica de una Hialuronidasa del Veneno de la serpiente peruana Lachesis muta* (Tesis pregrado). [en línea] Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Ciencias Biológicas. Lima-Perú. 2006, pp. 9-10 [Consulta: 09 Noviembre 2015]. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/820/1/lerma_rl.pdf

MARCANO, D. & HASEGAWA, M. "Fitoquímica Organica." *Caracas : Torino*, vol. 2. 2002, Caracas, pp. 177 – 179

MATHEUS, C. "Plantas que sanan." *Quito: Ecuatorial*. [Consultado 29 de Diciembre 2015]. Disponible en: <http://www.imujer.com/salud/5563/para-que-sirve-el-arrayan>

MARTINEZ, A. " Flavonoides" [blog] 2001, pp.8 [Consulta: 23 Enero 2016]. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>

MELO, V., & CUAMATZI, O. "Bioquímica de los procesos Metabólicos." *Bogotá:Reverte*, vol. 2 2016, Bogotá, pp. 70

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

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

MORA, F. "Diagnostico del rodal del Arrayán (*Eugenia myrteloides*) en la comunidad la Quinta, Parroquia Bilován, Provincia Bolívar". (Tesis pregrado), 2005, Quito, pág. 102

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

MUÑOZ, F. " Plantas medicinales y aromáticas". España: Mundi- prensa, vol.1 .1996, España, pp.16 -18

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

PROAÑO, J. "*Comprobación del efecto cicatrizante de una crema a base de romero (Rosmarinus officinalis), Matico (Piperaduncum) y cola de caballo (Equisetum arvense) en heridas inducidas en ratones (Mus musculus)*" . (Tesis pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba -Ecuador. 2013, pp. 65

RAMÍREZ, QUIROZ, BÁEZ, & MARTÍNEZ, " Ácido Hialurónico – Propiedades, Beneficios y Efectos Secundarios". *Aceitedearganweb* [blog], 2006, [Consulta: 03 Enero 2016]. Disponible en: <http://www.aceitedearganweb.com/acido-hialuronico>

ROMERO,R. " Microbiología y parasitología humana " *Panamericana*, vol. 3, 2007, Mexico, pp. 704

SANCHEZ, S. *Evaluación de la actividad cicatrizante in vitro del geranio (pelargonium x domesticum l.h. bailey) mediante inhibición de hialuronidasa.* (Tesis pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba - Ecuador. 2015, pp. 43-44

SIERRA, M.,PÉREZ, M., "Medicina intensiva: Serpientes exóticas"vol.25 2001, España-Aragón, pp. 66-74

SIMON, P. "Skin Wound Healing". *Medscape* [en línea], 2014, (Estados Unidos) 1 (1), pp. 1-2. [Consulta: 02 Enero 2016]. Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/884594-overview#a4>

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

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

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

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

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

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

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

ZHAN, X. "Medicina tradicional: definiciones. "Obtenido de OMS/ GINEBRA: [blog] 2015 [Consultado 13 de Diciembre 2015]. Disponible en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es

ANEXOS

ANEXO A: Materia prima *Myrciastes halli*



Fuente: Jenny Chávez, 2016

ANEXO B: Parámetros de calidad del material vegetal





Fuente: Jenny Chávez, 2016



ANEXO C: Determinación de parámetros físicos del extracto: índice de refracción, pH.



Fuente: Jenny Chávez, 2016



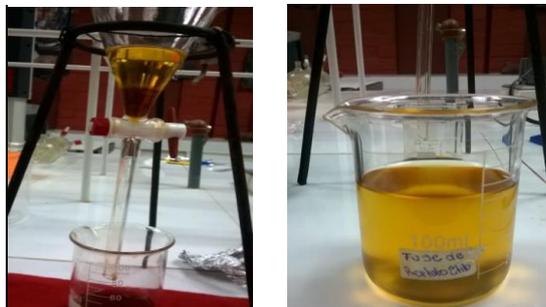
ANEXO D: Obtención del extracto de hojas de *Myrciathes halli*



Fuente: Jenny Chávez, 2016



ANEXO E: Tamizaje fitoquímico de los extractos



Fuente: Jenny Chávez, 2016

ANEXO G: Fracción flavónica de hojas



Fuente: Jenny Chávez, 2016

ANEXO H: Cromatografía en capa fina



Fuente: Jenny Chávez, 2016

ANEXO I: Ensayo de inhibición de la hialuronidasa bovina



Fuente: Jenny Chávez, 2016

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





Fuente: Jenny Chávez, 2016

ANEXO K: Acondicionamiento de los reactivos biológicos



Fuente: Jenny Chávez, 2016

ANEXO L: Extractos para la evaluación del efecto, ratones depilados previa inducción de heridas



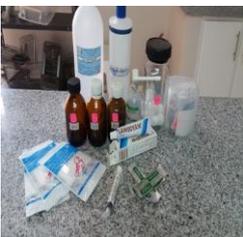
Fuente: Jenny Chávez, 2016

ANEXO M: Inducción de heridas



Fuente: Jenny Chávez, 2016

ANEXO N: Aplicación de tratamientos - control positivo animales tratados con Lamoderm



Fuente: Jenny Chávez, 2016

ANEXO O: Aplicación de tratamientos extractos 40%, 60% y 80%



Fuente: Jenny Chávez, 2016

ANEXO P: Cicatrización de las heridas con aplicación de tratamientos



Fuente: Jenny Chávez, 2016

ANEXO Q: Muestras de piel conservadas en formol al 10%



Fuente: Jenny Chávez, 2016

ANEXO R: Análisis estadístico de los resultados *in vitro* de la inhibición de la hialuronidasa bovina npor efecto de las hojas

Pruebas de normalidad							
mg/ml		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
% de Inhibición Hialuronidasa	5	.175	3		1.000	3	1.000
	10	.175	3		1.000	3	1.000
	20	.175	3		1.000	3	1.000
	40	.175	3		1.000	3	1.000
	60	.175	3		1.000	3	1.000
	80	.175	3		1.000	3	1.000

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas			
% de Inhibición Hialuronidasa			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
.000	5	12	1.000

ANOVA

% de Inhibición Hialuronidasa

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4854.400	5	970.880	970.880	.000
Dentro de grupos	12.000	12	1.000		
Total	4866.400	17			

Descriptivos

% de Inhibición Hialuronidasa

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
5	3	6.000	1.0000	.5774	3.516	8.484	5.0	7.0
10	3	7.700	1.0000	.5774	5.216	10.184	6.7	8.7
20	3	12.800	1.0000	.5774	10.316	15.284	11.8	13.8
40	3	16.200	1.0000	.5774	13.716	18.684	15.2	17.2
60	3	18.000	1.0000	.5774	15.516	20.484	17.0	19.0
80	3	54.700	1.0000	.5774	52.216	57.184	53.7	55.7
Total	18	19.233	16.9192	3.9879	10.820	27.647	5.0	55.7

% de Inhibición Hialuronidasa

HSD Tukey^a

mg/ml	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
5	3	6.000			
10	3	7.700			
20	3		12.800		
40	3			16.200	
60	3			18.000	
80	3				54.700
Sig.		.356	1.000	.303	1.000

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

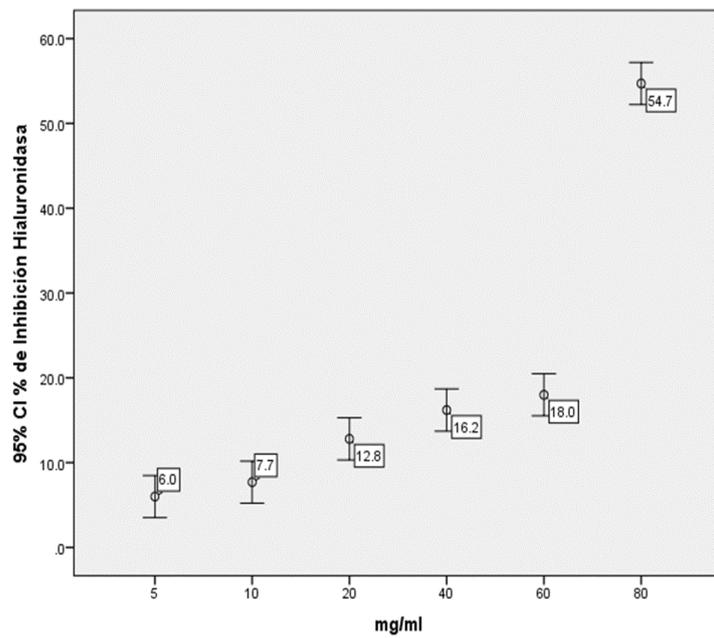
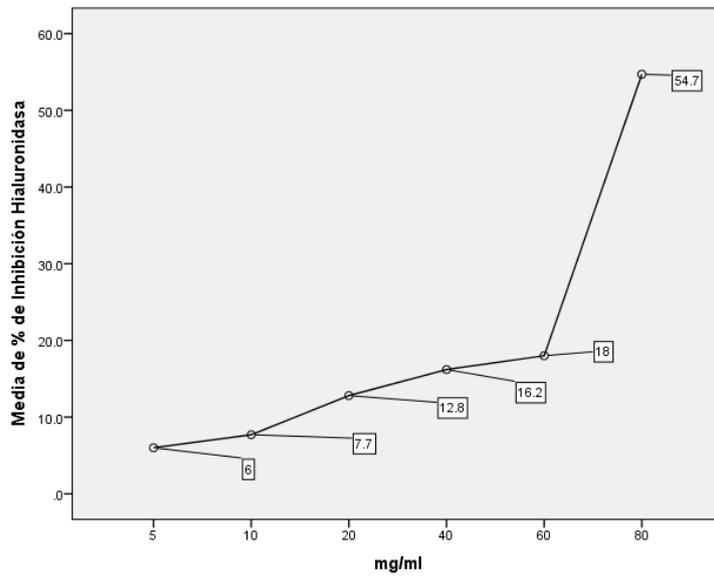
Comparaciones múltiples

Variable dependiente:

HSD Tukey

(I) mg/ml		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95%	
					Limite inferior	Limite superior
5	10	-1.7000*	.8165	.356	-4.443	1.043
	20	-6.8000*	.8165	.000	-9.543	-4.057
	40	-10.2000*	.8165	.000	-12.943	-7.457
	60	-12.0000*	.8165	.000	-14.743	-9.257
	80	-48.7000*	.8165	.000	-51.443	-45.957
10	5	1.7000	.8165	.356	-1.043	4.443
	20	-5.1000*	.8165	.000	-7.843	-2.357
	40	-8.5000*	.8165	.000	-11.243	-5.757
	60	-10.3000*	.8165	.000	-13.043	-7.557
	80	-47.0000*	.8165	.000	-49.743	-44.257
20	5	6.8000*	.8165	.000	4.057	9.543
	10	5.1000*	.8165	.000	2.357	7.843
	40	-3.4000*	.8165	.013	-6.143	-.657
	60	-5.2000*	.8165	.000	-7.943	-2.457
	80	-41.9000*	.8165	.000	-44.643	-39.157
40	5	10.2000*	.8165	.000	7.457	12.943
	10	8.5000*	.8165	.000	5.757	11.243
	20	3.4000*	.8165	.013	.657	6.143
	60	-1.8000	.8165	.303	-4.543	.943
	80	-38.5000*	.8165	.000	-41.243	-35.757
60	5	12.0000*	.8165	.000	9.257	14.743
	10	10.3000*	.8165	.000	7.557	13.043
	20	5.2000*	.8165	.000	2.457	7.943
	40	1.8000	.8165	.303	-.943	4.543
	80	-36.7000*	.8165	.000	-39.443	-33.957
80	5	48.7000*	.8165	.000	45.957	51.443
	10	47.0000*	.8165	.000	44.257	49.743
	20	41.9000*	.8165	.000	39.157	44.643
	40	38.5000*	.8165	.000	35.757	41.243
	60	36.7000*	.8165	.000	33.957	39.443

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.



Fuente: Jenny Chávez, 2016

ANEXO S: Análisis estadístico de los resultados de *in vitro* de la inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra por efecto de las hojas

Pruebas de normalidad							
mg/ml		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
% de Inhibición Veneno de Cobra	80	.220	11	.143	.909	11	.236
	60	.222	11	.136	.890	11	.137
	40	.115	11	.200 [*]	.962	11	.792
	20	.186	11	.200 [*]	.918	11	.304
	10	.167	11	.200 [*]	.913	11	.266
	5	.254	11	.046	.867	11	.071

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

% de Inhibición Veneno de Cobra

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2.111	5	60	.076

ANOVA

% de Inhibición Veneno de Cobra

	cuadrados	gl	cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	15057.454	5	3011.491	19.819	.000
Dentro de grupos	9116.995	60	151.950		
Total	24174.449	65			

Descriptivos

% de Inhibición Veneno de Cobra

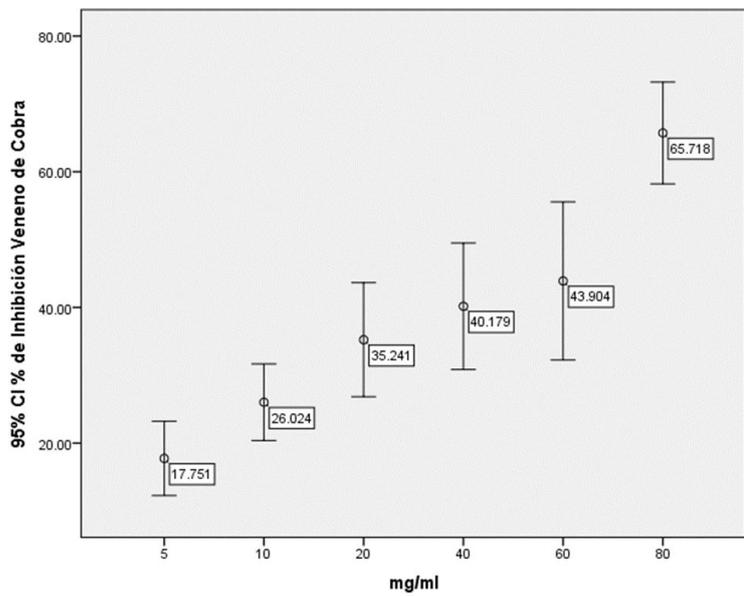
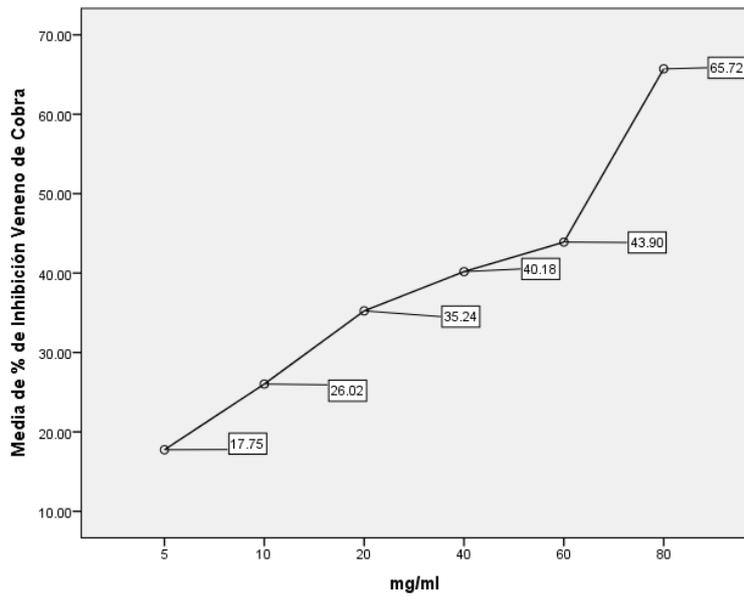
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
80	11	65.7182	11.17380	3.36903	58.2115	73.2248	52.29	83.61
60	11	43.9036	17.33275	5.22602	32.2593	55.5479	23.21	73.77
40	11	40.1791	13.87229	4.18265	30.8596	49.4986	21.43	68.85
20	11	35.2409	12.52149	3.77537	26.8289	43.6530	20.54	59.84
10	11	26.0236	8.40549	2.53435	20.3768	31.6705	16.07	40.98
5	11	17.7509	8.15726	2.45951	12.2708	23.2310	7.84	30.67
Total	66	38.1361	19.28509	2.37383	33.3952	42.8769	7.84	83.61

HSD Tukey ^a					
Subconjunto para alfa = 0.05					
mg/ml	N	1	2	3	4
5	11	17.7509			
10	11	26.0236	26.0236		
20	11		35.2409	35.2409	
40	11		40.1791	40.1791	
60	11			43.9036	
80	11				65.7182
Sig.		.619	.092	.571	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 11.000.

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente:						
HSD Tukey						
(I) mg/ml		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95%	
					Límite inferior	Límite superior
5	10	-8.27273	5.25616	.619	-23.7458	7.2004
	20	-17.49000	5.25616	.018	-32.9631	-2.0169
	40	-22.42818	5.25616	.001	-37.9013	-6.9551
	60	-26.15273	5.25616	.000	-41.6258	-10.6796
	80	-47.96727	5.25616	.000	-63.4404	-32.4942
10	5	8.27273	5.25616	.619	-7.2004	23.7458
	20	-9.21727	5.25616	.503	-24.6904	6.2558
	40	-14.15545	5.25616	.092	-29.6285	1.3176
	60	-17.88000	5.25616	.015	-33.3531	-2.4069
	80	-39.69455	5.25616	.000	-55.1676	-24.2215
20	5	17.49000	5.25616	.018	2.0169	32.9631
	10	9.21727	5.25616	.503	-6.2558	24.6904
	40	-4.93818	5.25616	.935	-20.4113	10.5349
	60	-8.66273	5.25616	.571	-24.1358	6.8104
	80	-30.47727	5.25616	.000	-45.9504	-15.0042
40	5	22.42818	5.25616	.001	6.9551	37.9013
	10	14.15545	5.25616	.092	-1.3176	29.6285
	20	4.93818	5.25616	.935	-10.5349	20.4113
	60	-3.72455	5.25616	.980	-19.1976	11.7485
	80	-25.53909	5.25616	.000	-41.0122	-10.0660
60	5	26.15273	5.25616	.000	10.6796	41.6258
	10	17.88000	5.25616	.015	2.4069	33.3531
	20	8.66273	5.25616	.571	-6.8104	24.1358
	40	3.72455	5.25616	.980	-11.7485	19.1976
	80	-21.81455	5.25616	.001	-37.2876	-6.3415
80	5	47.96727	5.25616	.000	32.4942	63.4404
	10	39.69455	5.25616	.000	24.2215	55.1676
	20	30.47727	5.25616	.000	15.0042	45.9504
	40	25.53909	5.25616	.000	10.0660	41.0122
	60	21.81455	5.25616	.001	6.3415	37.2876

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.



Realizado por: Jenny Chávez, 2016

ANEXO T: Análisis estadístico de los resultados *in vivo* del efecto cicatrizante de los grupos tratados considerando los días de cicatrización.

Pruebas de normalidad							
Grupos de Experimentación		Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Días de Cicatrización	Control (+)	,300	5	,161	,883	5	,325
	Control (-)	,300	5	,161	,883	5	,325
	Extracto 40%	,300	5	,161	,883	5	,325
	Extracto 60%	,300	5	,161	,883	5	,325
	Extracto 80%	,300	5	,161	,883	5	,325

a. Corrección de significación de Lilliefors

Descriptivos								
Días de Cicatrización								
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control (+)	5	16.00	.707	.316	15.12	16.88	15	17
Control (-)	5	15.00	.707	.316	14.12	15.88	14	16
Extracto 40%	5	13.00	.707	.316	12.12	13.88	12	14
Extracto 60%	5	12.00	.707	.316	11.12	12.88	11	13
Extracto 80%	5	12.00	.707	.316	11.12	12.88	11	13
Total	25	13.60	1.780	.356	12.87	14.33	11	17

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Días de Cicatrización			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
0.000	4	20	1.000

ANOVA					
Días de Cicatrización					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	66.000	4	16.500	33.000	.000
Dentro de grupos	10.000	20	.500		
Total	76.000	24			

Días de Cicatrización			
HSD Tukey ^a			
Grupos de Experimentación	N	0.05	
		1	2
Extracto 60%	5	12.00	
Extracto 80%	5	12.00	
Extracto 40%	5	13.00	
Control (-)	5		15.00
Control (+)	5		16.00
Sig.		.207	.207

Se visualizan las medias para los grupos en los

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente:						
HSD Tukey						
(I) Grupos de Experimentación		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95%	
					Límite inferior	Límite superior
Control (+)	Control (-)	1.000 [*]	.447	.207	-.34	2.34
	Extracto 40%	3.000 [*]	.447	.000	1.66	4.34
	Extracto 60%	4.000 [*]	.447	.000	2.66	5.34
	Extracto 80%	4.000 [*]	.447	.000	2.66	5.34
Control (-)	Control (+)	-1.000	.447	.207	-2.34	.34
	Extracto 40%	2.000 [*]	.447	.002	.66	3.34
	Extracto 60%	3.000 [*]	.447	.000	1.66	4.34
	Extracto 80%	3.000 [*]	.447	.000	1.66	4.34
Extracto 40%	Control (+)	-3.000 [*]	.447	.000	-4.34	-1.66
	Control (-)	-2.000 [*]	.447	.002	-3.34	-.66
	Extracto 60%	1.000	.447	.207	-.34	2.34
	Extracto 80%	1.000	.447	.207	-.34	2.34
Extracto 60%	Control (+)	-4.000 [*]	.447	.000	-5.34	-2.66
	Control (-)	-3.000 [*]	.447	.000	-4.34	-1.66
	Extracto 40%	-1.000	.447	.207	-2.34	.34
	Extracto 80%	0.000	.447	1.000	-1.34	1.34
Extracto 80%	Control (+)	-4.000 [*]	.447	.000	-5.34	-2.66
	Control (-)	-3.000 [*]	.447	.000	-4.34	-1.66
	Extracto 40%	-1.000	.447	.207	-2.34	.34
	Extracto 60%	0.000	.447	1.000	-1.34	1.34

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Realizado por: Jenny Chávez, 2016

ANEXO U: Análisis estadístico de los resultados *in vivo* del efecto cicatrizante de los grupos tratados considerando la Longitud de cicatrización

Pruebas de normalidad							
Grupos de Experimentación		Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Longitud de la Cicatriz (cm)	Control (+)	,157	15	,200 [*]	,923	15	,212
	Control (-)	,155	16	,200 [*]	,944	16	,401
	Extracto 40%	,165	13	,200 [*]	,942	13	,481
	Extracto 60%	,225	12	,093	,909	12	,205
	Extracto 80%	,189	12	,200 [*]	,874	12	,073

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.
a. Corrección de significación de Lilliefors

Descriptivos								
Longitud de la Cicatriz (cm)								
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control (+)	16	1.0688	.51214	.12804	.7958	1.3417	.30	2.00
Control (-)	16	1.1875	.53276	.13319	.9036	1.4714	.30	2.00
Extracto 40%	16	.8625	.45880	.11470	.6180	1.1070	.20	2.00
Extracto 60%	16	1.1813	.51409	.12852	.9073	1.4552	.30	2.00
Extracto 80%	16	.8563	.51247	.12812	.5832	1.1293	.20	2.00
Total	80	1.0313	.51523	.05760	.9166	1.1459	.20	2.00

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Longitud de la Cicatriz (cm)			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
.217	4	75	.928

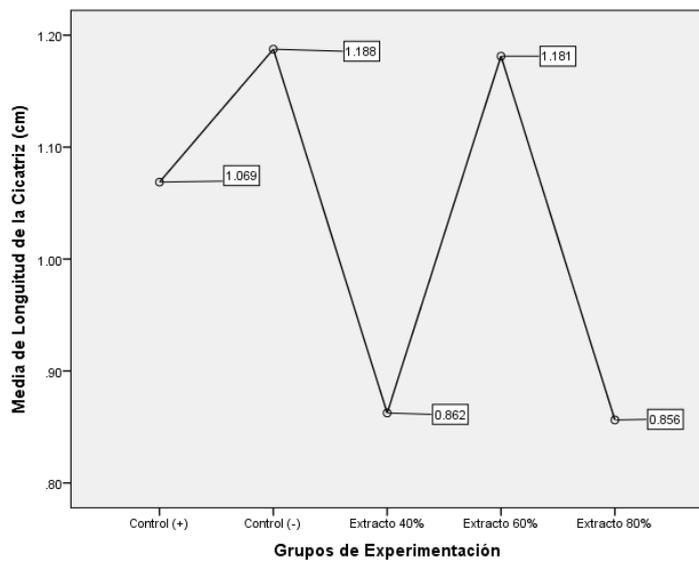
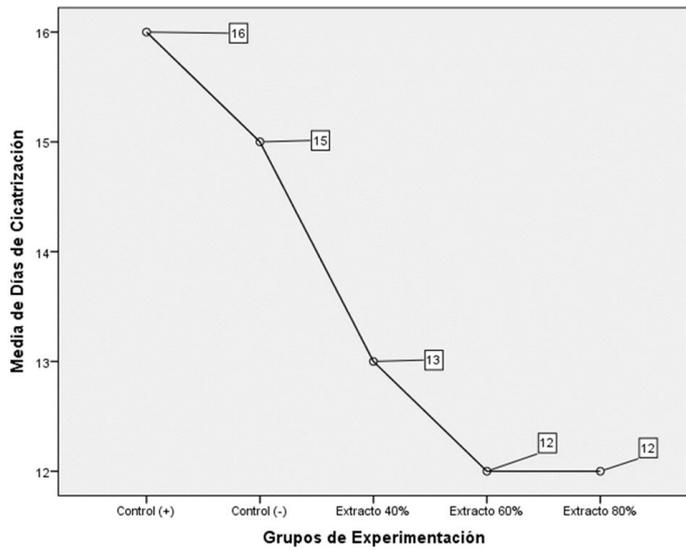
ANOVA					
Longitud de la Cicatriz (cm)					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1.719	4	.430	1.674	.165
Dentro de grupos	19.253	75	.257		
Total	20.972	79			

Longitud de la Cicatriz (cm)		
HSD Tukey ^a		
Grupos de Experimentación	N	Subconjunto para alfa = 0.05
Extracto 80%	16	.8563
Extracto 40%	16	.8625
Control (+)	16	1.0688
Extracto 60%	16	1.1813
Control (-)	16	1.1875
Sig.		.354

Se visualizan las medias para los grupos

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente:						
HSD Tukey						
(I) Grupos de Experimentación		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95%	
					Límite inferior	Límite superior
Control (+)	Control (-)	-.11875	.17913	.964	-.6195	.3820
	Extracto 40%	.20625	.17913	.779	-.2945	.7070
	Extracto 60%	-.11250	.17913	.970	-.6132	.3882
	Extracto 80%	.21250	.17913	.759	-.2882	.7132
Control (-)	Control (+)	.11875	.17913	.964	-.3820	.6195
	Extracto 40%	.32500	.17913	.373	-.1757	.8257
	Extracto 60%	.00625	.17913	1.000	-.4945	.5070
	Extracto 80%	.33125	.17913	.354	-.1695	.8320
Extracto 40%	Control (+)	-.20625	.17913	.779	-.7070	.2945
	Control (-)	-.32500	.17913	.373	-.8257	.1757
	Extracto 60%	-.31875	.17913	.393	-.8195	.1820
	Extracto 80%	.00625	.17913	1.000	-.4945	.5070
Extracto 60%	Control (+)	.11250	.17913	.970	-.3882	.6132
	Control (-)	-.00625	.17913	1.000	-.5070	.4945
	Extracto 40%	.31875	.17913	.393	-.1820	.8195
	Extracto 80%	.32500	.17913	.373	-.1757	.8257
Extracto 80%	Control (+)	-.21250	.17913	.759	-.7132	.2882
	Control (-)	-.33125	.17913	.354	-.8320	.1695
	Extracto 40%	-.00625	.17913	1.000	-.5070	.4945
	Extracto 60%	-.32500	.17913	.373	-.8257	.1757



Realizado por: Jenny Chávez, 2016