



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ACTIVIDAD CICATRIZANTE *in vivo* DE LOS EXTRACTOS
METANÓLICOS DE *Justicia chlorostochya* Y *Plectranthus amboinicus* EN
RATONES DIABÉTICOS INDUCIDOS MEDIANTE
ESTREPTOZOTOCINA”**

TESIS DE GRADO

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTOR: FRANCISCO XAVIER VÉLEZ CORREAL

TUTOR: BQF. DIEGO RENATO VINUEZA TAPIA M. Sc

RIOBAMBA-ECUADOR

2015

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “**ACTIVIDAD CICATRIZANTE *in vivo* DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Justicia chlorostochya* Y *Plectranthus amboinicus* EN RATONES DIABÉTICOS INDUCIDOS MEDIANTE ESTREPTOZOTOCINA**”, de responsabilidad del señor egresado Francisco Xavier Vélez Correal, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Nancy Veloz

DECANA FAC. DE CIENCIAS

Dra. Ana Karina Albuja Landi

**DIRECTORA ESCUELA
DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

M.Sc Diego Vinueza Tapia

DIRECTOR DE TESIS

M.Sc. Karen Acosta León

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Susana Abdo

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

COORDINADOR

SISBIB-ESPOCH

NOTA DE TESIS ESCRITA

Yo, **Francisco Xavier Vélez Correal**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FRANCISCO XAVIER VÉLEZ CORREAL

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a Dios por darme la fuerza, inspiración y sabiduría necesaria para terminar mi vida estudiantil. A mis Padres porque me dieron la vida y son el pilar fundamental, ya que sin su apoyo no hubiera podido concluir mi carrera. A mi Esposa e hija por estar ahí en cada momento de esta investigación brindándome su soporte y consejo. A mis suegros por darme sus consejos para no decaer y continuar hasta el final. A mis abuelos y tíos por su colaboración en cada proyecto realizado. A mis amigos y compañeros por brindarme su amistad hasta el final.

Francisco X. Vélez C.

AGRADECIMIENTO

Primeramente quiero agradecer a Dios por darme la vida y sabiduría para culminar mi período estudiantil. A mi familia por apoyarme en cada momento pasado durante mi vida estudiantil, y acompañarme hasta el final de esta etapa. A los docentes de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por brindarme la guía y conocimientos necesarios para mi formación académica. Al BQF. Diego Vinuesa y la Lcda. Karen Acosta por brindarme su apoyo y asesoramiento durante la elaboración de esta investigación. A cada persona que estuvo presente de una u otra manera en el desarrollo de este trabajo.

Francisco X. Vélez C.

RESUMEN

Se evaluó la actividad cicatrizante de los extractos metanólicos de *Plectranthus amboinicus* y *Justicia chlorostachya* en el modelo animal ratón de laboratorio (*Mus musculus*) cepa BALB/c al que previamente se indujo diabetes mediante la administración de estreptozotocina, luego de aplicar un diseño experimental de bloques al azar, se administraron los tratamientos a los grupos experimentales a las dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg de extracto metanólico por kilogramo de peso de animal, para cada especie vegetal. Se usaron un control positivo y un control negativo para discriminar el avance del proceso de cicatrización sin presencia de ingredientes activos. Los extractos se obtuvieron mediante un proceso de extracción por soxhlet a partir de 50 gramos de la parte aérea seca de las especies vegetales. Se obtuvo como resultado una disminución significativa de la superficie de las heridas de forma macroscópica durante el tiempo establecido en el protocolo experimental, demostrando la eficacia de los tratamientos sobre las heridas de ratones diabéticos. Este hecho fue comprobado aplicando un Análisis de varianzas (ANOVA) seguido de un post test TUKEY, siendo el extracto de *P. amboinicus* el más eficaz desde el punto de vista estadístico, hecho que resultó evidente dado que incluso existió desprendimiento total de la costra al término del tratamiento. Sin embargo, no se pueden despreciar los efectos producidos por los demás tratamientos, dado que exhiben un porcentaje de cicatrización considerable. En complemento, se evaluó el efecto tóxico del extracto de *P. amboinicus* a una dosis de 2000 mg/kg de peso en un grupo establecido del mismo modelo animal de experimentación, los resultados fueron satisfactorios ya que no se produjo ningún efecto tóxico, con lo cual se demuestra que la planta es inocua para el consumo, más aún si se la administra de manera tópica. La investigación produce nuevas expectativas en el estudio de los productos naturales y en la mejora la calidad de vida de los pacientes diabéticos.

Palabras clave: <DIABETES> <TAMIZAJE FITOQUÍMICO> <ESPECTROFOTOMETRÍA UV> <ESPECTROFOTOMETRÍA IR> <CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA TLC> <PRUEBAS IN VIVO> <USO TÓPICO> <PIE DIABÉTICO> <PLECTRANTHUS> <JUSTICIA CHLOROSTACHYA> <FLAVONOIDES>

SUMMARY

The healing activity of methanol extracts of *Plectranthus amboinicus* and *Justicia chlorostachya* in the animal model laboratory mouse (*Mus musculus*) strain BALB/c the previously diabetes was induced by administration of streptozotocin, was evaluated after applying a block design randomly to experimental treatment groups at the doses of 200 mg/kg and 400 mg/kg of methanol extract per kilogram of animal, for each plant species were administered. A positive control and a negative control for discriminating progress of the healing process without the presence of active ingredients were used. The extracts were obtained by soxhlet extraction process from 50 grams of the dried aerial part of the plant species. A significant decrease in wound area macroscopically for the time stated in the experimental protocol was obtained results, showing the effectiveness of the treatments on the wounds of diabetic mice. This was tested using ANOVA followed by TUKEY test post being *P. amboinicus* extract the most effective from the statistical standpoint, made it became apparent that even existed since the crust total detachment of the end of treatment. However, can't neglect the effects of other treatments, since exhibit a significant percentage of healing. In complement, the toxic effect of the extract of *P. amboinicus* at a dose of 2000 mg/kg in a group established in the same experimental model was evaluated, the results were satisfactory since there was no toxic effect, thereby which shows that the plant is safe to eat, especially if it is administered topically. Research yields new expectations in the study of natural products and improving the quality of life of diabetic patients.

Keywords: <DIABETES> <PHYTOCHEMICAL SCREENING> <UV SPECTROPHOTOMETRY> <SPECTROPHOTOMETRY IR> <THIN LAYER CHROMATOGRAPHY TLC> <TESTS IN VIVO> <TOPICAL USE> <DIABETIC FOOT> <PLECTRANTHUS> <JUSTICE CHLOROSTACHYA> <FLAVONOIDS>

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

ÍNDICE DE ANEXOS

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO	3
1.1. Diabetes	3
<i>1.1.1. Historia de la diabetes</i>	<i>3</i>
<i>1.1.2. Complicaciones que presenta la diabetes</i>	<i>4</i>
<i>1.1.2.1. Retinopatías</i>	<i>4</i>
<i>1.1.2.2. Pie diabético</i>	<i>4</i>
<i>1.1.2.3. Hipertensión</i>	<i>5</i>
1.2. <i>Plectranthus amboinicus</i>	5
1.3. <i>Justicia chlorostachya</i>	6
1.4. Compuestos fenólicos	7
<i>1.4.1. Flavonoides</i>	<i>7</i>
<i>1.4.2. Cumarinas</i>	<i>9</i>
<i>1.4.3. Quinonas</i>	<i>9</i>
1.5. Modelos de inducción a hiperglicemia temporal o permanente	9
<i>1.5.1. Estreptozotocina</i>	<i>9</i>
<i>1.5.2. Alloxano</i>	<i>10</i>
1.6. La piel	10
<i>1.6.1. Epidermis</i>	<i>11</i>
<i>1.6.2. Dermis</i>	<i>11</i>

1.6.3.	<i>Hipodermis o tejido subcutáneo</i>	11
1.7.	La herida	12
1.7.1.	<i>Tipos de heridas</i>	12
1.7.1.1.	<i>Según la integridad de la piel</i>	12
1.7.1.1.1.	<i>Herida abierta</i>	12
1.7.1.1.2.	<i>Herida cerrada</i>	13
1.7.1.2.	<i>Según la gravedad de la lesión</i>	13
1.7.1.2.1.	<i>Herida superficial</i>	13
1.7.1.2.2.	<i>Herida penetrante</i>	13
1.8	Cicatrización	13
1.8.1.	<i>Fase inflamatoria</i>	14
1.8.2.	<i>Fase proliferativa</i>	14
1.8.3.	<i>Fase de remodelación</i>	14
1.8.4.	<i>Tipos de cicatrización</i>	16
1.8.4.1.	<i>Cicatrización de primera intención</i>	16
1.8.4.2.	<i>Cicatrización de segunda intención</i>	16
1.9.	Fármacos cicatrizantes	16
1.10.	Animales de experimentación	17
1.10.1.	<i>Ratones de laboratorio</i>	17
1.11.	Vías de administración	18
1.11.1.	<i>Vía oral</i>	18
1.11.2.	<i>Vía subcutánea</i>	18
1.11.3.	<i>Vía intraperitoneal</i>	19
CAPÍTULO II		
PARTE EXPERIMENTAL		
2.1.	Lugar de investigación	20
2.2.	Materiales, equipos y reactivos	20
2.2.1.	<i>Materia prima</i>	20
2.2.2.	<i>Reactivo biológico</i>	20
2.2.3.	<i>Descripción</i>	21
2.2.4.	<i>Materiales y equipos</i>	22
2.2.5.	<i>Reactivos</i>	23
2.3.	Técnicas y métodos	24

2.3.1. Control de calidad de la droga cruda.....	24
2.3.1.1. Determinación del contenido de humedad.....	24
2.3.1.2. Determinación de cenizas totales.....	24
2.3.2. Tamizaje fitoquímico.....	25
2.3.2.1. Ensayo de Dragendorff.....	25
2.3.2.2. Ensayo de Mayer.....	26
2.3.2.3. Ensayo de Wagner.....	26
2.3.2.4. Ensayo de Lieberman- Buchard.....	26
2.3.2.5. Ensayo de Baljet.....	26
2.3.2.6. Ensayo de Sudán III.....	26
2.3.2.7. Ensayo de Borntrager.....	27
2.3.2.8. Ensayo de Catequinas.....	27
2.3.2.9. Ensayo de Saponinas.....	27
2.3.2.10. Ensayo de Cloruro férrico.....	28
2.3.2.11. Ensayo de Shinoda.....	28
2.3.3. Preparación de los extractos de <i>Justicia chlorostachya</i> y <i>Plectranthus amboinicus</i>	28
2.3.4. Cromatografías en capa fina (TLC).....	30
2.3.4.1. Cromatografías en capa fina del extracto de <i>Plectranthus amboinicus</i>	30
2.3.4.2. Cromatografías en capa fina del extracto de <i>Justicia chlorostachya</i>	31
2.3.5. Separación de los compuestos.....	32
2.3.6. Cuantificación de flavonoides totales.....	32
2.3.7. Determinaciones espectroscópicas.....	32
2.3.7.1. Determinación del UV.....	32
2.3.7.2. Determinación de IR.....	33
2.3.8. Preparación de los geles.....	33
2.3.8.1. Preparación de los geles vehículos.....	33
2.3.8.2. Preparación de los geles experimentales (200 mg/kg).....	34
2.3.8.3. Preparación de los geles experimentales (400 mg/kg).....	34
2.3.9. Protocolo farmacológico en los ratones.....	35
2.3.9.1. Inducción de diabetes a los ratones.....	35
2.3.9.2. Efecto cicatrizante en los ratones.....	36
2.3.9.3. Ensayo de toxicidad.....	37
2.3.10. Análisis estadístico.....	37

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	38
3.1. Control de calidad de la droga cruda.....	38
3.2. Tamizaje fitoquímico.....	39
3.3. Cromatografías en capa fina.....	40
<i>3.3.1. Cromatografías en capa fina del extracto de <i>Plectranthus amboinicus</i>.....</i>	<i>40</i>
<i>3.3.2. Cromatografías en capa fina del extracto de <i>Justicia chlorostachya</i>.....</i>	<i>44</i>
3.4. Cuantificación de flavonoides totales.....	45
3.4. Análisis espectroscópicos de los compuestos separados.....	46
<i>3.5.1. Análisis espectroscópicos de los compuestos separados de <i>Plectranthus amboinicus</i>.....</i>	<i>46</i>
<i>3.5.1.1. Compuesto 1.....</i>	<i>46</i>
<i>3.5.1.2. Compuesto 2.....</i>	<i>50</i>
<i>3.5.1.3. Compuesto 3.....</i>	<i>54</i>
<i>3.5.1.4. Compuesto 4.....</i>	<i>58</i>
<i>3.5.1.5. Compuesto 5.....</i>	<i>62</i>
<i>3.5.2. Análisis espectroscópicos de los compuestos separados de <i>Justicia chlorostachya</i>.....</i>	<i>63</i>
<i>3.5.2.1. Compuesto 1.....</i>	<i>63</i>
<i>3.5.2.2. Compuesto 2.....</i>	<i>67</i>
<i>3.5.2.3. Compuesto 3.....</i>	<i>71</i>
<i>3.5.2.4. Compuesto 4.....</i>	<i>73</i>
3.6. Lecturas de glicemias en los ratones.....	77
3.7. Análisis del protocolo de cicatrización de las heridas.....	78
3.8. Análisis estadístico.....	79
3.9. Análisis de toxicidad aguda.....	81
CONCLUSIONES.....	82
RECOMENDACIONES.....	83
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AlCl ₃	Cloruro de aluminio
ANOVA	Análisis de varianza
cm ²	Centímetro cuadrado
°C	Grado Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramo
HCl	Ácido clorhídrico
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
INEC	Instituto Nacional de Estadísticas y Censos
IR	Infrarrojo
kg	Kilogramo
MetOH	Metanol
mg	Miligramo
mg/kg	Miligramo por kilogramo de peso
min	Minuto
MINSAL	Ministerio de Salud de Chile
MINSAP	Ministerio de Salud de Cuba
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MSP	Ministerio de Salud Pública de Ecuador
NaOAc	Acetato de Sodio
NaOMe	Metóxido de Sodio
NRSP	Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas.
OMS	Organización Mundial de la Salud
STZ	Estreptozotocina
TLC	Thin Layer Chromatography
UV	Ultravioleta

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No. 1-3	Control de calidad de las plantas secas de <i>Plectranthus amboinicus</i> y <i>Justicia chlorostachya</i> . Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Marzo 2015.....	38
Cuadro No. 2-3	Tamizaje Fitoquímico de los extractos de <i>Plectranthus amboinicus</i> y <i>Justicia chlorostachya</i> . Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Marzo 2015.....	39
Cuadro No. 3-3	Rf de los compuestos obtenidos por cromatografía de capa fina del extracto de <i>Plectranthus amboinicus</i> . Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Marzo 2015.....	44
Cuadro No. 4-3	Rf de los compuestos obtenidos por cromatografía de capa fina del extracto de <i>Justicia chlorostachya</i> Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Marzo 2015.....	45
Cuadro No. 5-3	Lecturas de niveles de glucosa luego de la inducción a diabetes en los animales de experimentación. Bioterio. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Marzo 2015.....	77
Cuadro No. 6-3	Áreas de contracción de las heridas en los ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina. Bioterio. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Marzo 2015.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1-1	<i>Plectranthus amboinicus</i>	6
Figura No. 2-1	<i>Justicia chlorostachya</i>	7
Figura No. 3-1	Estructura básica de los flavonoides.....	8
Figura No. 4-1	Estructura de la piel.....	12
Figura No. 5-1	Fases de la cicatrización.....	15
Figura No. 1-2	Diagrama de obtención de metabolitos secundarios.....	25
Figura No. 2-2	Esquema de reacciones realizadas en el extracto etéreo.....	27
Figura No. 3-2	Esquema de reacciones realizadas en el extracto alcohólico.....	28
Figura No. 4-2	Diagrama de flujo para obtención de extracto de <i>P. amboinicus</i>	29
Figura No. 5-2	Diagrama de flujo para la obtención de extracto de <i>J. chlorostachya</i>	30
Figura No. 1-3	Posible estructura del compuesto 1 obtenido del extracto de <i>P. amboinicus</i>	50
Figura No. 2-3	Posible estructura del compuesto 2 obtenido del extracto de <i>P. amboinicus</i>	54
Figura No. 3-3	Posible estructura del compuesto 4 obtenido del extracto de <i>P. amboinicus</i>	61
Figura No. 4-3	Posible estructura del compuesto 2 obtenido del extracto de <i>J. chlorostachya</i>	71
Figura No. 5-3	Posible estructura del compuesto 4 obtenido del extracto de <i>J. chlorostachya</i>	76

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico No. 1-3	Curva de calibración de la quercetina.....	46
Gráfico No. 2-3	Espectro IR del compuesto número 1 obtenido del extracto de <i>P. amboinicus</i>	47
Gráfico No. 3-3	Espectro UV del compuesto 1 con MetOH.....	47
Gráfico No.4-3	Espectro UV del compuesto 1 con NaOMe.....	48
Gráfico No. 5-3	Espectro UV del compuesto 1 con AlCl ₃ y HCl.....	48
Gráfico No. 6-3	Espectro UV del compuesto 1 con NaOAc.....	49
Gráfico No. 7-3	Espectro UV del compuesto 1 con H ₃ BO ₃	49
Gráfico No. 8-3	Espectro IR del compuesto número 2 obtenido del extracto de <i>P. amboinicus</i>	51
Gráfico No. 9-3	Espectro UV del compuesto 2 con MetOH.....	51
Gráfico No. 10-3	Espectro UV del compuesto 2 con NaOMe.....	52
Gráfico No. 11-3	Espectro UV del compuesto 2 con AlCl ₃ y HCl.....	52
Gráfico No. 12-3	Espectro UV del compuesto 2 con NaOAc.....	53
Gráfico No. 13-3	Espectro UV del compuesto 2 con H ₃ BO ₃	53
Gráfico No. 14-3	Espectro IR del compuesto número 3 obtenido del extracto de <i>P. amboinicus</i>	55
Gráfico No. 15-3	Espectro UV del compuesto 3 con MetOH.....	55
Gráfico No. 16-3	Espectro UV del compuesto 3 con NaOMe.....	56
Gráfico No. 17-3	Espectro UV del compuesto 3 con AlCl ₃ y HCl.....	56
Gráfico No. 18-3	Espectro UV del compuesto 3 con NaOAc.....	57
Gráfico No. 19-3	Espectro UV del compuesto 3 con H ₃ BO ₃	57
Gráfico No. 20-3	Espectro IR del compuesto número 4 obtenido del extracto de <i>P. amboinicus</i>	58
Gráfico No. 21-3	Espectro UV del compuesto 4 con MetOH.....	59
Gráfico No. 22-3	Espectro UV del compuesto 4 con NaOMe.....	59
Gráfico No. 23-3	Espectro UV del compuesto 4 con AlCl ₃ y HCl.....	60
Gráfico No. 24-3	Espectro UV del compuesto 4 con NaOAc.....	60
Gráfico No. 25-3	Espectro UV del compuesto 4 con H ₃ BO ₃	61
Gráfico No. 26-3	Comparación del espectro IR de compuesto número 5 obtenido del extracto de <i>P. amboinicus</i> , vs. El espectro IR de la dihidroeuvarina.....	62
Gráfico No. 27-3	Espectro UV del compuesto 5 con MetOH.....	63

Gráfico No. 28-3	Espectro IR del compuesto número 1 obtenido del extracto de <i>J. chlorostachya</i>	64
Gráfico No. 29-3	Espectro UV del compuesto 1 con MetOH.....	64
Gráfico No. 30-3	Espectro UV del compuesto 1 con NaOMe.....	65
Gráfico No. 31-3	Espectro UV del compuesto 1 con AlCl ₃ y HCl.....	65
Gráfico No. 32-3	Espectro UV del compuesto 1 con NaOAc.....	66
Gráfico No. 33-3	Espectro UV del compuesto 1 con H ₃ BO ₃	66
Gráfico No. 34-3	Espectro IR del compuesto número 2 obtenido del extracto de <i>J. chlorostachya</i>	68
Gráfico No. 35-3	Espectro UV del compuesto 2 con MetOH.....	68
Gráfico No. 36-3	Espectro UV del compuesto 2 con NaOMe.....	69
Gráfico No. 37-3	Espectro UV del compuesto 2 con AlCl ₃ y HCl.....	69
Gráfico No. 38-3	Espectro UV del compuesto 2 con NaOAc.....	70
Gráfico No. 39-3	Espectro UV del compuesto 2 con H ₃ BO ₃	70
Gráfico No. 40-3	Espectro IR del compuesto número 3 obtenido del extracto de <i>J. chlorostachya</i>	72
Gráfico No. 41-3	Espectro UV del compuesto 3 con MetOH.....	72
Gráfico No. 42-3	Espectro IR del compuesto número 4 obtenido del extracto de <i>J. chlorostachya</i>	73
Gráfico No. 43-3	Espectro UV del compuesto 4 con MetOH.....	74
Gráfico No. 44-3	Espectro UV del compuesto 4 con NaOMe.....	74
Gráfico No. 45-3	Espectro UV del compuesto 4 con AlCl ₃ y HCl.....	75
Gráfico No. 46-3	Espectro UV del compuesto 4 con NaOAc.....	75
Gráfico No. 47-3	Espectro UV del compuesto 4 con H ₃ BO ₃	76
Gráfico No. 48-3	Diagrama de barras de las áreas de las heridas al final de los tratamientos en los ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina.....	78
Gráfico No. 49-3	Análisis de varianzas, ANOVA de un factor.....	80
Gráfico No. 50-3	Análisis mediante test de TUKEY para comparación de grupo experimentales.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1-1	Taxonomía del <i>Plectranthus amboinicus</i>	6
Tabla No. 2-1	Taxonomía de la <i>Justicia chlorostachya</i>	7
Tabla No. 3-1	Taxonomía del ratón de laboratorio.....	18
Tabla No. 4-2	Lista de materiales y Equipos utilizados.....	22
Tabla No. 5-2	Lista de reactivos utilizados en la investigación.....	23
Tabla No. 6-2	Formulaciones de los geles para actividad cicatrizante.....	34
Tabla No. 7-2	Esquemas de tratamientos para actividad cicatrizante.....	35
Tabla No. 8-2	Esquema de dosificación de estreptozotocina a los animales.....	36
Tabla No. 9-2	Esquema de tratamientos a cada animal de experimentación.....	37

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía No. 1-3	Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de <i>P. amboinicus</i> . Fase móvil: Acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:26).....	40
Fotografía No. 2-3	Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de <i>P. amboinicus</i> . Fase móvil: Acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: metil-isobutil-cetona: agua (50:7:3:30:10).....	41
Fotografía No. 3-3	Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de <i>P. amboinicus</i> . Fase móvil: cloroformo: acetato de etilo (60:40).....	41
Fotografía No. 4-3	Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de <i>P. amboinicus</i> . Fase móvil: Cloroformo: metanol: acetato de etilo (60:30:10).....	42
Fotografía No. 5-3	Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de <i>P. amboinicus</i> . Fase móvil: ácido acético: agua: ácido clorhídrico (30:10:3).....	42
Fotografía No. 6-3	Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de <i>P. amboinicus</i> . Fase móvil: Cloroformo: ácido acético: agua (30:15:2).....	43
Fotografía No. 7-3	Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de <i>P. amboinicus</i> . Fase móvil: Tolueno: acetato de etilo en forma progresiva (93:7)- (80:20)- (70:30)- (60:40).....	44
Fotografía No. 8-3	Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de <i>J. chlorostachya</i> . Fase móvil: Acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:26).....	45

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A	Determinación de humedad.....	88
Anexo B	Preparación de los extractos de <i>Justicia chlorostachya</i> y <i>Plectranthus amboinicus</i>	88
Anexo C	Tamizaje Fitoquímico del extracto de <i>Justicia chlorostachya</i>	89
Anexo D	Tamizaje fitoquímico del extracto de <i>Plectranthus amboinicus</i>	89
Anexo E	Preparación de geles para la actividad cicatrizante.....	90
Anexo F	Inducción de diabetes a los ratones.....	90
Anexo G	Lecturas de Glicemias a los animales, sangre obtenida por punción submaxilar.....	91
Anexo H	Inducción de las heridas a los ratones diabéticos.....	91
Anexo I	Diferentes estadios de la cicatrización de los ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina.....	92

INTRODUCCIÓN

Las plantas alrededor del mundo, no sólo han servido como principal fuente de alimentación sino también con fines medicinales. El aprovechamiento de las plantas medicinales se remonta a las civilizaciones más antiguas conocidas por el hombre, según consta en testimonios históricos (Muñoz, F. 2002 p.22).

En Ecuador, las plantas medicinales han constituido uno de los principales recursos existentes que se usan en el ámbito de la fitoterapia. Dado el acervo del conocimiento ancestral y su grado de extensión, estos vegetales se utilizan tanto en las poblaciones urbanas y rurales. La cultura milenaria ecuatoriana desde tiempos inmemoriales ha utilizado las plantas según sus cualidades, entre ellos, citamos a plantas cálidas, plantas frescas, medicinales y nutritivas. (Tazto, A., Rodríguez, G. 1992 p. 11)

El conocimiento etnobotánico de poblaciones de la Amazonía ecuatoriana de determinadas plantas que se pueden aplicar a este tipo de enfermedades es conocida por el contacto de colonos con etnias como la huaorani. Las hojas machacadas, como emplastos o extractos aplicados a heridas, luxaciones, etc.; contribuyen con las curaciones. Además que el empleo de productos elaborados a base de plantas ahorra mucho en cuanto se refiere a costo para quienes las usan (Aragadvay, S.P. 2009 p. 20).

En la actualidad, uno de los principales problemas de salud está representado por la diabetes. En el año 2011, aproximadamente 4.455 personas en Ecuador han fallecido a causa de la diabetes mellitus, llegando a ser la principal causa de mortalidad en el país. La incidencia de esta enfermedad se está incrementando exponencialmente debido al estilo de vida actual, entrando como un problema de salud pública que tiende a aumentar la comorbilidad en ciertos cuadros clínicos de muchos pacientes (INEC, 2011 p. 5).

Para el año 2012, en Ecuador se reportaron 116.937 casos de diabetes mellitus aumentando a una tasa de 753,64 personas con esta enfermedad por cada 100.000 habitantes del país, respecto al 2011. De estos casos, el 71% se presentan en la región costa, quedando el resto en la sierra, de igual manera estos casos se presentan en el 60% en la población masculina a nivel nacional. (Tamayo, M. 2014 pág. 25)

Este creciente aumento de población con diabetes en el Ecuador conlleva varios problemas que incluyen ulceraciones en los pacientes; una lesión muchas veces irreparable que finaliza con necrosis de la parte afectada. Además de presentar factores de riesgo en la evolución de heridas crónicas debido a que está asociada a enfermedades vasculares, neurológicas e inmunológicas.

La neuropatía diabética por si sola puede causar el desarrollo de úlceras en el pie. Esto sucede porque se produce un daño en los nervios sensitivos, además de que la piel se vuelve seca y susceptible a fisurarse. Por consiguiente, el problema de cicatrización en pacientes diabéticos es

mucho más lento que en una persona en condiciones normales, esto se debe a la falta de muchos factores de crecimiento necesarios entre los que encontramos a los factores para generación de queratinocitos y formación de colágeno; elementos vitales para la regeneración del tejido. Además, un paciente diabético presenta menos irrigación sanguínea en las extremidades lo que conlleva a dificultar el proceso de regeneración tisular. (Lira, L.F. 2012 p. 15).

Con el avance de la ciencia, la humanidad se encuentra inmersa en una gran cantidad de productos usados para curar sus diversas dolencias, pero muchas veces no es posible adquirirlos debido al elevado costo que representan. (Tamayo, M. 2014 p. 15).

Por este inconveniente, es necesario encontrar alternativas para facilitar el proceso de cicatrización en pacientes diabéticos, de una manera que resulte accesible a la población, ya que en Ecuador solo existe un medicamento llamado trolamina que es usado en protocolos para cicatrización, pero se encuentra limitado exclusivamente para pacientes que presentan quemaduras. Se han encontrado nuevas alternativas como el reciente uso del factor de crecimiento epidérmico recombinante, comercialmente llamado Heberprot-P®. Este medicamento mejora ostensiblemente la tasa de curación en el tratamiento del paciente con pie diabético, pero su adquisición es muy costosa; dos viales llegan a un valor de hasta 6.857,35 dólares si el paciente decide llevar el tratamiento por pago propio (MSP, 2013).

El uso de los extractos de *Justicia chlorostochya* y *Plectranthus amboinicus*, se debe a los compuestos o metabolitos secundarios presentes en las mencionadas especies vegetales, principalmente flavonoides que actúan regenerando el tejido dañado.

De este modo, brindar una alternativa para el tratamiento de la patología a un bajo costo, representa una ventaja con respecto a un producto farmacéutico convencional. Con el presente proyecto se presenta una nueva alternativa en el tratamiento de heridas causadas en pacientes diabéticos, basados en el conocimiento etnobotánico y las propiedades farmacológicas atribuidas a los metabolitos secundarios principales (flavonoides) de las especies vegetales en estudio.

Además de contribuir con la investigación nacional ya que dentro de las prioridades de líneas de investigación de salud, consta la diabetes como una de las principales enfermedades, a tener en cuenta. (MSP., 2013).

En consideración de este marco, existe la necesidad de investigar y desarrollar un producto que sea eficaz en el tratamiento y cicatrización de heridas en pacientes diabéticos y que, además, sea accesible para la población

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Diabetes

Se conoce como diabetes a un desorden en la manutención de los niveles de glucosa en el cuerpo humano. Los niveles de glucosa se estiman como referenciales cuando se encuentran entre 70-110 mg/dL de sangre, cuando aquellos aumentan se produce la diabetes.

La glucosa es obtenida mediante el metabolismo de los carbohidratos, en el tubo digestivo, esta glucosa una vez ingresada a la sangre actúa con una hormona llamada insulina, la cual permite que la glucosa ingrese a la célula. Cuando esta hormona falla la glucosa se empieza a acumular en la sangre aumentando sus niveles, entonces podemos observar dos tipos de diabetes: (Borja, A.I. 2013).

- Diabetes mellitus tipo I
- Diabetes mellitus tipo II

La diabetes mellitus tipo I, llamada también insulina dependiente, se produce cuando el páncreas que es el órgano encargado de producir la insulina, no produce dicha hormona en cantidad suficiente, por lo que no existe una concentración adecuada para disminuir los niveles de glucosa. (Tamayo, M. 2014 p.20).

La diabetes mellitus tipo II, o llamada no insulina dependiente, se produce una falta de utilización de la insulina, es decir, el cuerpo produce correctamente la insulina, pero las células del cuerpo no la pueden utilizar correctamente debido a falla genéticas o daños en los receptores de insulina. Este tipo de diabetes es la que se encuentra en la mayor cantidad de pacientes, llegando a presentarse en un 90% de todos los casos de diabetes conocidos. (Borja, A.I. 2013 p.26).

1.1.1. *Historia de la Diabetes*

La diabetes es una patología que ha estado presente a lo largo de los siglos, alrededor del mundo, los primeros hallazgos históricos datan de los años 1000-1500 a.C, en donde aparece en el texto egipcio “papiro de Ebers” y el grabado hindú “Ayur Veda Susruta”, en los cuales hacen

referencia a la diabetes con el nombre de “malhumeha” que significa orina de miel. (Álvarez, D; Rodríguez, Y, 2010 p. 8).

En los primeros siglos después de Jesucristo, Celso y Galeno, comienzan a describir a la diabetes, y sus síntomas como la polidipsia y la poliuria, además de describir a esta enfermedad como un daño renal, no pancreático, no es sino hasta el siglo XIII, en el cual ya descubren que la diabetes es un daño pancreático. Posteriormente aparece Paracelso comienza a defender a la diabetes como una enfermedad, y por primera vez aconsejan el ejercicio físico como tratamiento para ésta. Al final de los siglos XV y XVI empieza la verdadera revolución científica, y el estudio de los casos de diabetes no se quedan atrás, apareciendo muchas investigaciones que ayudan en el desarrollo de tratamientos para diabetes, así como el desarrollo de fármacos. (Álvarez, D; Rodríguez, Y, 2010 p. 9).

1.1.2. Complicaciones que presenta la Diabetes

La diabetes como enfermedad produce muchas patologías concomitantes, las cuales en su mayoría son las que pueden producir la muerte del paciente. Entre los principales daños que producen a largo plazo la diabetes encontramos:

1.1.2.1. Retinopatías:

Daños a la córnea, debido al deterioro de los vasos sanguíneos que irrigan esta zona, produciendo que la sangre quede libre causando enturbiamiento en la visión.

1.1.2.2. Pie diabético:

Patología producida en consecuencia del daño de los tejidos en los pacientes que poseen diabetes, este daño puede producir riesgo de infecciones e incluso amputaciones de miembros para evitar la sepsis y necrosis del área afectada.

Los daños causados por el pie diabético pueden incluir una hiperqueratosis, llegar a producir deformaciones óseas. Se produce en los bordes de los miembros inferiores, e incluso el talón, puede producir infecciones que sin cuidado alguno llega a formar una necrosis en todo el tejido. Esto se debe a la dificultad en el proceso de cicatrización en los pacientes diabéticos, en los cuales a partir de un corte solo se produce una costra tipo escara, que luego sigue supurando hasta llegar a infectarse por algún patógeno que produce la necrosis tisular, llegando en última estancia a necesitarse amputación. (MINSAL, 2006. Pág. 5-6).

1.1.2.3. Hipertensión:

Debido a la cantidad de glucosa que se acumula en los vasos sanguíneos las paredes de los vasos sanguíneos se vuelven rígidas provocando de este modo que la circulación de la sangre sea más forzada, por lo que aumenta la presión para poder mantener un flujo sanguíneo normal. (Tamayo, M. 2014 p. 17).

1.2. *Plectranthus amboinicus*

Nombre vulgar: Orégano orejón

Nombre científico: *Plectranthus amboinicus*

Familia: Lamiaceae

Partes Usadas: Hojas, tallos.

Esta planta es una especie nativa de Cuba, introducida al Ecuador por los colonos de la época, pertenece a la familia Lamiaceae, al género *Coleus*, en el cual se encuentran más de 200 especies distribuidas por Asia, África y las Islas del Pacífico. Se presenta como un arbusto de no más de 1 metro de altura, con hojas grandes, aserradas, en el envés presenta unas pequeñas vellosidades, de tallo delgado, no produce flores, se reproducen mediante yemas. Posee un aroma muy fuerte agradable debido al cual se le dio su nombre común. Ha sido utilizada a lo largo de los años para curar dolencias como dolores estomacales, hipo, curar heridas, como broncodilatador, etc. (Menéndez, R, 1999 p.4).

Fitoquímicamente esta planta es muy rica en metabolitos secundarios, entre los cuales encontramos monoterpenos aromáticos, encontrándose en mayor cantidad el carvacrol. También se refiere presencia de flavonoides como apigenina, luteolina, quercetina, criodyctiol, taxifolina, etc. Las hojas además poseen azúcares reductores, triterpenos, aminos, etc. Se han realizado varios estudios de dicha planta entre los cuales encontramos actividad antitumorigénica, antihipertensiva, antiéptica, antibacteriana.

Figura No.1-1. *Plectranthus amboinicus*



Fuente: Francisco Vélez C. 2015.

Tabla No.1-1. Taxonomía del *Plectranthus amboinicus*

Nombre Científico	<i>Plectranthus amboinicus</i>
Reino	Plantae
Phylum	Tracheobionta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Plectranthus</i>
Epíteto Específico	<i>amboinicus</i>
Autor Epíteto Específico	SPRENG

Fuente: Instituto de Ciencias Naturales UNAL, 2007.

1.3. *Justicia chlorostachya*

Nombre vulgar: Insulina

Nombre científico: *Justicia chlorostachya*

Familia: Acanthaceae

Parte usada: Partes aéreas, hojas y tallos.

Las denominaciones vulgares de esta especie vegetal conocida como justicia o también como insulina vegetal, es una planta propia de la región amazónica del Ecuador. Pertenece a la familia Acanthaceae; es un arbusto que presenta hojas ovaladas con los nervios bien definidos. Tiene flores tubulares que varían su color desde el rosa al naranja. Esta especie ha sido muy utilizada por los aborígenes nativos de la región para tratar problemas relacionados con la fertilidad en la mujer y como un potente alucinógeno. En la actualidad, se conoce su marcado efecto hipoglucemiante, el que ha sido muy utilizado para tratar desórdenes de diabetes (Pazmiño, C.O. 2011 p. 25).

Es conocido que el género *Justicia* ha sido ampliamente estudiado por los químicos, y se ha identificado la presencia de saponinas, lignanos, con posibles efectos anticonceptivos; así como, antiaritmicos y antidepresivos. También existe la presencia de mucílagos y aceites esenciales. Algunos nativos de la Amazonía utilizan esta planta en forma de decocción para obtener una actividad expectorante. Pero el uso que más ha llamado la atención en los últimos años es la capacidad que tiene este vegetal para disminuir los niveles de glucosa en la sangre, por lo cual se la ha llamado también como insulina vegetal. (Pazmiño, C.O. 2011 p. 26).

Figura No. 1-2: *Justicia chlorostachya* Leonard



Fuente: Francisco Vélez C. 2015.

Tabla No. 2-1. Taxonomía de la *Justicia chlorostachya*

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

Fuente: Instituto de Ciencias Naturales UNAL, 2007

1.4. Compuestos fenólicos

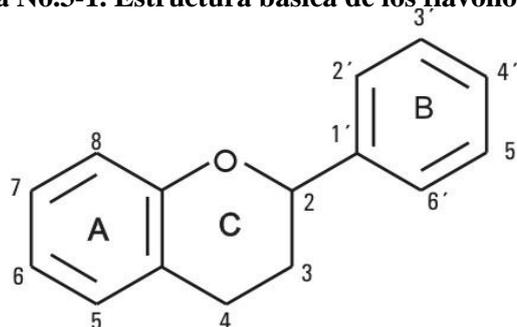
El término compuestos fenólicos se refiere a un conjunto de moléculas que poseen en común una estructura con un anillo aromático con uno o más radicales hidroxilos. Estos compuestos tienden a ser muy polares, por lo cual son solubles en agua. Debido a la presencia aromática en su estructura presentan una absorción intensa en el UV.

Dentro de los compuestos fenólicos encontramos a los flavonoides, cumarinas, antocianidinas, quinonas, catequinas, etc. Estos compuestos se encuentran en las plantas, y se pueden extraer especialmente por hidrólisis ácida de los tejidos vegetales. (Lock, O, 1994 p. 110).

1.4.1. Flavonoides

Entre los metabolitos secundarios más conocidos de las plantas están los flavonoides, compuestos derivados del fenilpropano que se encuentran en la naturaleza como glucósidos. Los flavonoides se encuentran en la mayoría de las plantas, llegando a identificar más de 8.000 compuestos de tipo flavónico.

Figura No.3-1. Estructura básica de los flavonoides



Fuente: Olga Lock Ugaz, 1994

Se conocen diez clases de flavonoides, los cuales contienen quince átomos de carbono en su núcleo, dispuestos en un sistema C₆-C₃-C₆, en el cual dos anillos aromáticos están unidos por tres carbonos, que muchas veces pueden formar un tercer anillo. Estos flavonoides se encuentran generalmente como mezcla de glucósidos y agliconas. (Lock, O, 1994 p. 114).

Entre las características de los flavonoides podemos destacar su solubilidad en agua y etanol, su carácter fenólico y su intensa absorción en la región del ultravioleta y visible, debido a la presencia de los sistemas aromáticos y conjugados. La separación e identificación de estos compuestos puede darse por métodos cromatográficos y espectroscópicos. Los flavonoides se biotransforman a través de la ruta del shikimato, y del malonato acetato, siendo las chalconas el primer flavonoide en formarse, de las cuales se derivan posteriormente los demás compuestos. (Lock, O, 1994 p. 115).

Dependiendo de la estructura química que presentan los flavonoides, estos pueden ser: flavonoles, flavanonas, flavonoles, flavonas, xantonas, quinonas, etc. Durante mucho tiempo se han utilizado los flavonoides como colorantes de lanas, y actualmente se utilizan en la conservación de grasas y jugos debido a su actividad antioxidante. Los flavonoides suelen dar el color a los alimentos y el sabor desde el dulce al amargo, llegando a ser los taninos los principales productores de este último. La acción farmacológica de éstos es vasta, y bien conocidas son sus propiedades vasodilatadoras, hepatoprotectora, colerética, diurética; además de otras funciones que cumplen como regular la utilización de la vitamina C, de modo que estimula la cicatrización de heridas (Redrobán, 2012. Pág. 30-32).

1.4.2. Cumarinas

Las cumarinas son compuestos que se encuentran en todas las partes de las plantas, pero especialmente en los frutos. El nombre cumarina fue dado debido a la estructura aislada por primera vez del árbol de Tonka, a partir de allí se considera cumarina a toda estructura que posea este anillo base.

El interés del estudio de estos compuestos se debe a su amplia gama de actividades biológicas, así tenemos que son antibacterianas, pro-estrogénicas, hepatotóxicas, carcinogénicas, insecticidas, saborizantes, etc. Todas las cumarinas se caracterizan por tener el sistema benzo- α -pirona, y su carácter lactónico hace que sean solubles en soluciones de álcalis. Además están biogénicamente relacionadas con los fenilpropanoides como los flavonoides, por lo cual se conoce que se sintetizan por las mismas vías de los flavonoides. (Lock, O, 1994 p.146).

1.4.3. Quinonas

Son compuestos que poseen coloración desde amarillo hasta negro. Se encuentran frecuentemente en las cortezas y raíces de las plantas, su coloración se halla presente en hongos y líquenes a diferencia de las antocianinas que se encuentran en plantas superiores. Se encuentran generalmente en estado libre, la identificación de estos compuestos es fácil utilizando reacciones redox para producir coloración. Poseen gran actividad biológica como antirreumática, antileishmaniasis, catártica, etc. (Lock, O, 1994 p. 182).

1.5. Modelos de inducción a hiperglicemia temporal o permanente

Es conocido por la comunidad científica que la utilización de modelos animales ayudan en el estudio de patologías y actividades farmacológicas siendo de gran utilidad para la investigación de nuevos fármacos, ya que dichos modelos pueden ser inducidos para presentar la patología de forma muy similar en función de lo posible al ser humano. (Pazmiño, C.O. 2011 p.35).

1.5.1. Estreptozotocina

La estreptozotocina fue identificada en el año de 1950 como un antibiótico derivado del hongo *Streptomyces achromogenes* en los Estados Unidos de Norteamérica. Sin embargo, a mediados de 1960 varios científicos encontraron que la STZ podría ser selectivamente tóxica para las células beta del páncreas, este descubrimiento sugirió el uso de la droga para uso en experimentación en modelos animales, y como tratamiento para cáncer de las células beta.

La estreptozotocina (STZ) es un compuesto derivado de la metilnitrosourea, ejerce un efecto citotóxico mediante metilación del DNA. Se utiliza como agente quimioterapéutico, ya que este fármaco bloquea el crecimiento de las células beta del páncreas.

La STZ posee una alta especificidad, atacando a las células beta del páncreas, que son las encargadas de la producción de insulina por medio de una reducción parcial de la masa de células β , lo cual puede ser utilizado para inducir un estado diabético. A su vez, la STZ es elegida en mayor cantidad debido a su mayor acción citotóxica, pero dicha sensibilidad varía según la especie animal.

Cuando la STZ es administrada, durante la primera semana provoca diabetes de modo tardío; ya que las células beta se destruyen en aproximadamente el 90%, sin embargo se regeneran gradualmente. (Pazmiño, C.O. 2011 p. 36).

La STZ es una droga aprobada por la Food and Drug administration (FDA), como un agente para el tratamiento del cáncer metastásico de las células pancreáticas, ya que presenta una alta toxicidad para las células beta del páncreas, también es utilizado para producir insulinitis y diabetes en animales de experimentación. (FDA, 2013).

1.5.2. Alloxano

Es una sustancia utilizada desde mucho tiempo atrás para inducir diabetes en animales de experimentación, aunque la principal desventaja que posee es su falta de selectividad, dañando de este modo no solo las células beta del páncreas, sino las demás células pancreáticas, provocando la muerte del animal. A pesar de ser muy utilizada, su mecanismo de acción todavía está en estudio. (Carrasco-Formiguera, R, 1947 p. 277).

Es notable que ciertos azúcares como la fructosa tienden a causar una protección de las células pancreáticas, provocando de esta manera que la inducción fracase, además de que existen ciertas especies animales que son resistentes a este tipo de tratamiento. Igualmente puede producir falla renal y muerte antes de completar el tratamiento. (Hard, J, C, 1985 p. 703).

1.6. La piel

Es el órgano más grande del cuerpo humano, que ocupa aproximadamente el 20% del peso del cuerpo humano cuya principal función es proteger al cuerpo de las radiaciones solares, microorganismos, y demás factores externos que puedan producir un daño al cuerpo. Además de servir como órgano de interrelación ya que proporciona sensibilidad y es posible obtener todos

los estímulos proporcionados por el medio ambiente. La piel está compuesta por tres capas principales: epidermis, dermis e hipodermis o tejido subcutáneo. (Hidalgo, O. 2010 p. 17).

1.6.1. Epidermis

La epidermis es la capa más superficial de la piel, está compuesta por un conjunto de células estratificadas que no presentan nervios. La principal célula de esta capa está representada por los queratinocitos que son células que producen queratina, formando cuatro capas epidérmicas o estratos: estrato basal, espinoso, granuloso y córneo. (Hidalgo, O. 2010 p. 17).

Cada estrato posee una característica sobre todo en la forma del queratinocito, en la capa germinativa o basal, el queratinocito empieza a formarse, luego en la capa granulosa y espinosa se denominan así por la disposición en la cual se encuentran las células los queratinocitos empiezan a recubrirse con queratina, finalmente el estrato córneo que es la zona de la piel que está dispuesta hacia el exterior las células están muertas y se presentan aplanadas. La función principal de la epidermis es producir una impermeabilidad que proporciona una protección contra los daños externos y contra los posibles daños mecánicos. (Hidalgo, O. 2010 p. 18).

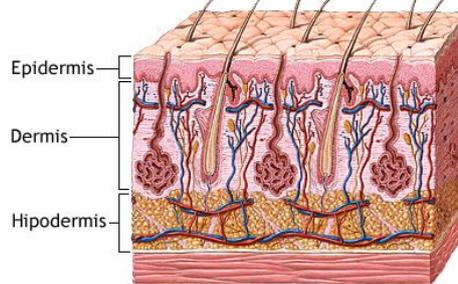
1.6.2. Dermis

La dermis es la capa en la cual se encuentra todas las glándulas anexas a la piel, además de ser aquella que le proporciona la sensibilidad, está compuesta principalmente por tejido fibroso en el cual se encuentran insertados las glándulas anexas, terminaciones nerviosas, contiene proteínas propias de la piel como el colágeno, elastina, glicosaminos etc. Todo esto en conjunto con el ácido hialurónico forma lo que se llama matriz que es el lugar en donde se forma la piel. La función de esta parte de la piel es ser sostén de todo el tejido además de aportar defensa inmunológica, y de termorregulación. (Hidalgo, O. 2010 p. 18).

1.6.3. Hipodermis o tejido subcutáneo

Es la capa más profunda de la piel, sirve como sostén para las otras capas, y se conecta con el tejido muscular. Posee en su interior macrófagos, células adiposas, nervios, y vasos sanguíneos encargados de irrigar el tejido cutáneo. (Hidalgo, O. 2010 p. 19).

Figura No.4-1. Estructura de la piel



Fuente: MedlinePlus, 2013.

1.7. La herida

Se denomina herida al área donde se ha perdido la continuidad de la piel, generalmente se da por una lesión tisular, ya que es el principal factor para toda herida, en la cual se pierden fluidos, existen impulsos nerviosos de dolor hacia el cerebro, liberación de productos celulares para favorecer su reparación. (Rivera et al. 2004 p. 10).

En toda herida suele haber:

- Espacio muerto que contiene sangre, linfa y restos de tejidos que pueden existir también cuando la herida es abierta, cuerpos extraños procedentes del exterior, como tierra, trozos de ropa o del agente causal, o bacterias del medio ambiente.
- Una zona de astricción marginal, que constituyen los bordes de la herida, contundidos e hipovitalizados.
- Interrupción de los vasos sanguíneos y linfáticos y de los nervios.
- Déficit funcional del territorio traumatizado.
- Dolor. (Guillamet, A. y Hernández, J.M, 2000 p. 126)

1.7.1. Tipos de heridas

1.7.1.1. Según la integridad de la piel

1.7.1.1.1. Herida abierta

Es una herida en la cual se encuentra daño en el tejido, en la cual existe una discontinuidad en la piel o la mucosa, se produce por objetos punzantes, los ejemplos clásicos de este tipo de herida son las de intervenciones quirúrgicas, o por corte con arma blanca. (UIS, 2008 p. 5).

1.7.1.1.2. Herida cerrada

Es una herida en la cual no se produce una discontinuidad en el tejido, esta se da por contusiones, torsiones, golpes, etc. Un ejemplo de este tipo de herida es una fractura ósea. (UIS, 2008 p. 5).

1.7.1.2. Según la gravedad de la lesión

1.7.1.2.1. Herida superficial

Es un tipo de lesión que solo afecta a la epidermis, es decir, no hay daño epitelial fuerte, se produce por algún roce, o fricción con alguna superficie, las heridas características de este tipo son los raspones, abrasiones, etc. (UIS, 2008 p. 5).

1.7.1.2.2. Herida penetrante

Es cuando aparte de existir discontinuidad de la piel, hay un daño de tejido más profundo que incluso puede afectar a órganos y vísceras. Se produce cuando un instrumento extraño penetra el tejido, ejemplos de estas heridas son las producidas por armas de fuego o armas blancas. (UIS, 2008 p. 5).

1.8. Cicatrización

La cicatrización es un proceso que se da en los seres vertebrados, que sirve para regenerar los tejidos de la piel cuando ha sufrido un daño. Cuando un individuo posee una herida, durante el proceso de recuperación se lleva a una gran variedad de fenómenos físicos y químicos.

Cuando la cicatrización es lenta o muy fuerte se puede considerar que el proceso de reparación es anormal o patológico (Redrobán, K.F. 2012. Pág. 22).

La cicatrización de una herida está producida por una serie de mecanismos cuyo objetivo es producir una masa de tejido fibroso (cicatriz), que es un tejido similar a la piel cuando está sin ninguna alteración. Para que se produzca la cicatriz se producen una serie de mecanismos continuos llamados como fases de reparación cutánea. Estas fases son tres: inflamación, proliferación, remodelación. (Benavides, 2008 p. 29).

1.8.1. Fase inflamatoria

Esta fase comienza en el momento en que se produce la herida, y puede estar formada por dos partes, una parte vascular en la cual actúan los diferentes factores que producen la coagulación para evitar la pérdida de sangre, y por otra parte llamada celular que lo que implica es la presencia de glóbulos blancos en la zona de la herida para evitar una posible infección. Esta fase puede durar de 24 a 48 horas dependiendo de la gravedad de la lesión producida. (Hidalgo, O. 2010 p. 20).

1.8.2. Fase proliferativa

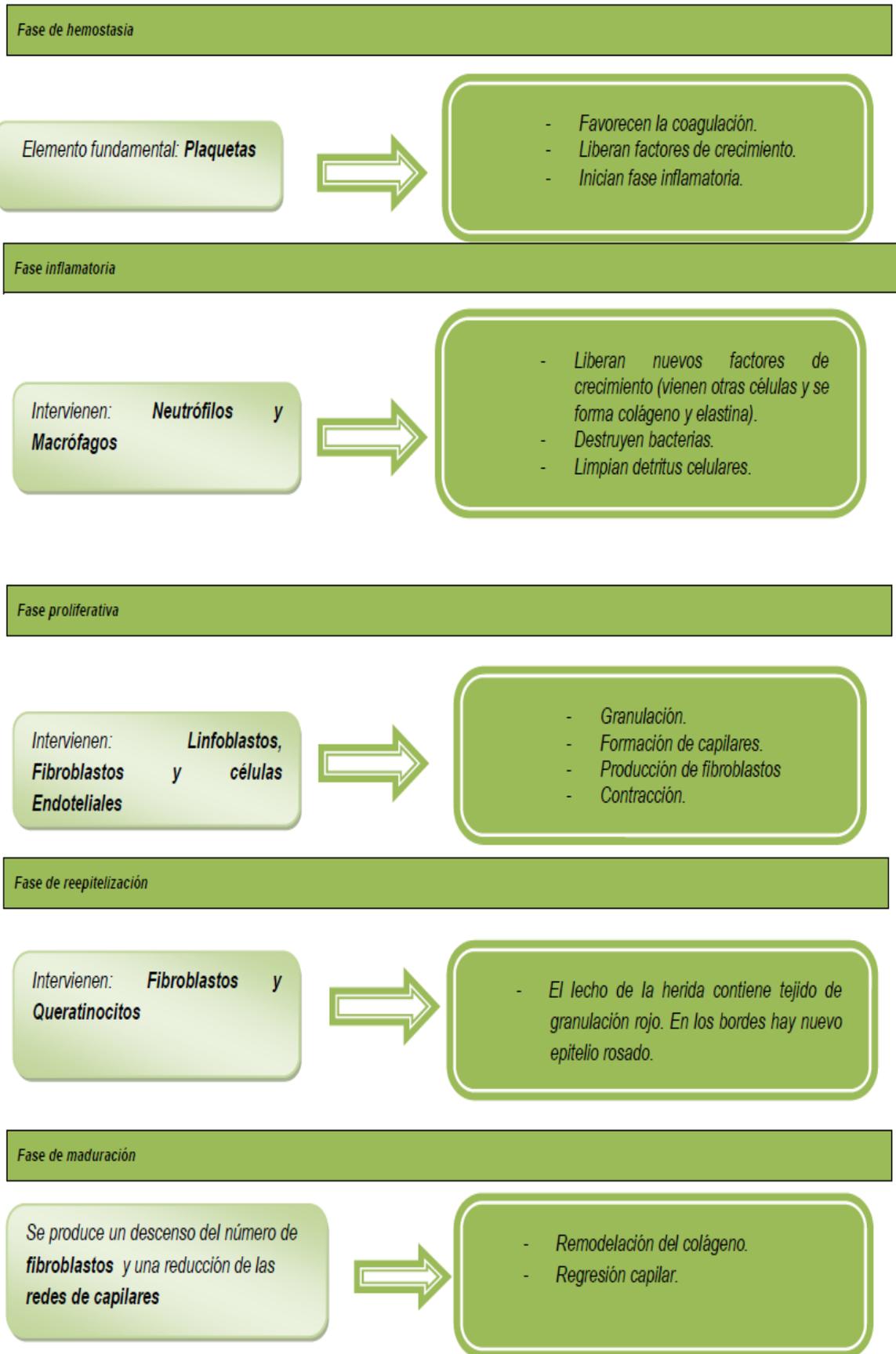
En esta fase se producen varios procesos, siendo los más importantes: la proliferación de los fibroblastos, reepitelización que ocurre para reponer el tejido epitelial perdido durante la lesión, para esto se produce una migración de queratinocitos desde la matriz basal. El siguiente proceso que sucede es la angiogénesis que ocurre el segundo día luego de realizarse la herida, este proceso es absoluto en la cicatrización ya que una vez activado favorece a la migración de células, reparación del tejido endotelial, y formación de nuevos vasos sanguíneos. . (Hidalgo, O. 2010 p. 20).

El último proceso que sucede en esta fase es la fibroplasia en donde se produce nuevo colágeno y otras proteínas que ayudan a formar la nueva matriz y granulación. Todos estos procesos se dan de los dos a los cuatro días de que se ha producido la lesión. . (Hidalgo, O. 2010 p. 20).

1.8.3. Fase de remodelación

Puede durar días, meses o años, consiste en la reparación del tejido hasta conseguir una similitud al tejido original.

Figura No.5-1. Fases de la cicatrización



1.8.4. Tipos de cicatrización

1.8.4.1. Cicatrización por primera intención

Uno de los ejemplos más simples de la reparación de una herida es la curación de la incisión quirúrgica, creada en condiciones de asepsia y aproximada por suturas quirúrgicas y recibe el nombre de unión primaria o basal epitelial y muere de un número relativamente escaso de células epiteliales y del tejido conjuntivo. Como consecuencia, la regeneración epitelial predomina sobre la fibrosis. Se forma una pequeña cicatriz, pero hay una mínima contracción de la herida (Velandia, D.A. 2009. Pág. 36).

1.8.4.2. Cicatrización por segunda intención

Se presenta cuando la pérdida celular o tisular es más extensa, como en las grandes heridas, formación de abscesos y úlceras, el proceso de reparación es más complejo. En este tipo de cicatrización, conocido como secundario o de segunda intención, la reacción inflamatoria es más intensa, hay un desarrollo abundante de tejido de granulación y la herida se contrae por acción de miofibroblastos. A continuación se produce acumulación de matriz extracelular y la formación de una cicatriz (Velandia, D.A. 2009. Pág. 36).

La cicatrización secundaria difiere de la primaria en varios aspectos:

- Se forma un coágulo de mayor tamaño o costra
- La inflamación es más intensa
- Se forman cantidades muchos mayores de tejido de granulación
- La curación de la herida implica la contracción de la herida.

1.9. Fármacos cicatrizantes

A lo largo del tiempo se han desarrollado varios fármacos utilizados con el fin de cicatrizar heridas, desde plantas como el matico, o la sábila, hasta medicamentos actuales como el β -sitosterol, corticoides, combinaciones con antiinflamatorios y antimicrobianos. El desarrollo de todo lo mencionado se debió a que en gran parte una herida podía constituirse mortal sin un tratamiento adecuado, no de forma directa, sino indirectamente debido al riesgo de infección que podría existir. (Bombardelli, E, et al. 2002 p. 2).

Los fármacos con actividad cicatrizante que existen en la actualidad realizan su efecto estimulando el proceso regenerativo del área afectada, o mantienen las condiciones adecuadas

para que se produzca una cicatrización natural, este es el caso de los medicamentos de acción tópica, que contienen en su mayoría colágeno con combinaciones antibióticas, para reducir el peligro de infecciones. (Bombardelli, E, et al. 2002 p. 2).

1.10. Animales de experimentación

1.10.1. *Ratones de laboratorio*

El ratón es un animal perteneciente a la familia de los mamíferos, posee sangre caliente, y tiene hábitos nocturnos. El sentido de la audición está muy desarrollado, por lo cual se alteran mucho con los sonidos fuertes, igualmente poseen un olfato muy desarrollado que no solo utilizan para detectar comida, sino para establecer un orden social. Sin embargo, poseen una visión pobre y no distinguen colores. Debido a su tamaño son muy susceptibles a los cambios ambientales, ya que una variación entre 2 a 3 grados puede afectar a la fisiología del animal.

El tamaño del ratón varía entre 12 a 15 cm de longitud, con un peso aproximado de 30 gramos en su etapa adulta. Tienen una vida media de 10 a 12 meses. Poseen un ciclo circadiano, con un pico máximo de actividad durante las horas de oscuridad, la cantidad de agua y comida varía dependiendo de la cepa de animal. Generalmente en las jaulas los ratones las dividen por áreas para comer, dormir, orinar, etc. (Instituto Nacional de Salud, 2008).

Las ventajas que presentan los ratones como modelo animal de experimentación es que son de fácil manipulación, tienen una tasa de reproducción muy elevada, se pueden obtener cepas definidas, gracias a la variabilidad genética que presentan. Anatómicamente presentan vesícula biliar, un canal inguinal abierto, y una cola con escamas, la cual cumple la función de termorregulación. (Instituto Nacional de Salud, 2008).

Tabla No.1-3. Taxonomía del ratón de laboratorio

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Mammalia
Orden	Rodentia
Familia	Muridae
Subfamilia	Murinae
Subgénero	Mus
Genero	Mus
Especie	<i>M. musculus</i>

Fuente: Instituto Nacional de Salud, 2008.

1.11. Vías de administración

Para la administración de sustancias a los ratones, se aconseja primero tener una manipulación adecuada del animal, para evitar posibles mordeduras, y daños al individuo.

Las formas más comunes de administración son:

1.11.1. Vía Oral

Esta vía de administración requiere una sujeción correcta del animal para que no exista daño a órganos internos del animal, y por lo tanto se produzca la muerte, se utiliza una sonda orogástrica, y se procede de la siguiente forma: se inmoviliza correctamente al ratón y se lo coloca en posición vertical de modo que el tracto gastroesofágico quede en posición recta, se introduce la sonda previamente lubricada por el lado derecho de la boca, de forma lenta y suave, no debe existir presión al introducir, de este modo el ratón empieza a tragar, y se administra la solución a experimentar. Por esta vía se pueden administrar cantidades hasta de 2 mL. (Instituto Nacional de Salud, 2008).

1.11.2. Vía subcutánea

Esta vía es opcional al uso de la vía intramuscular o intravenosa, se realiza la administración en zonas donde exista gran cantidad de tejido conectivo, se inserta la aguja en forma paralela a la columna vertebral, de este modo se puede administrar cantidades de hasta 3 mL para un animal adulto. (Instituto Nacional de Salud, 2008).

1.11.3. Vía intraperitoneal

Para la administración intraperitoneal se utilizan jeringuillas de insulina, ya que poseen agujas con un calibre no tan grueso, para utilizar esta técnica se inmoviliza al ratón y se lo coloca con la zona ventral del cuerpo hacia el investigador, y se lo ubica con una inclinación craneal, para que las vísceras se desplacen hacia abajo con el fin de no lesionarlas. Se inserta la aguja en la pared abdominal, la aguja debe estar paralela a la columna vertebral para evitar perforación del intestino, con esta técnica se pueden administrar hasta 1 mL en un ratón adulto. Sin embargo, una mala administración puede causar daños en el tejido y hemorragia interna. (Instituto Nacional de Salud, 2008).

CAPITULO II

PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Lugar de investigación

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales y Bioterio de la Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, de la ciudad de Riobamba, Provincia de Chimborazo.

2.2. Materiales, equipos y reactivos

2.2.1. *Materia prima*

Las materias primas utilizadas para la realización de esta investigación fueron la *Justicia chlorostachya* conocida como insulina vegetal, que fue recolectada en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, parroquia Alluriquín, barrio San Miguel Km. 24 vía a Quito, a una temperatura promedio de 22,9°C, a 635 msnm, con una humedad de 76% y *Plectranthus amboinicus* conocido como orégano orejón fue recolectada en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, parroquia Santo Domingo, barrio 17 de diciembre, a una temperatura promedio de 22,9°C, a 635 msnm, con una humedad de 76%.

2.2.2. *Reactivo biológico*

Para el ensayo *in vivo* se utilizaron ratones de laboratorio de la especie *Mus musculus* de cepa BALB/c, los cuales fueron obtenidos en el Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, los animales fueron mantenidos a una temperatura de 22±1 °C, con una humedad del 50%, cumpliendo un ciclo circadiano de 12 horas con luz, y 12 horas de oscuridad, con alimentación y agua *ad libitum*. Se utilizaron ratones de 8 semanas de vida, y tuvieron un período de adaptación a las condiciones de investigación de 15 días.

2.2.3. Descripción

- Peso promedio de los ratones: $35,7 \pm 5,6$ gramos.
- Sexo de los animales: machos
- Procedencia: Bioterio de la Facultad de Ciencias, de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ciudad de Riobamba, Provincia de Chimborazo.
- Ciclo circadiano de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.
- Alimento 1,5 gramos de balanceado por animal
- Agua *ad libitum*
- Cambio de camas diaria.

2.2.4. Materiales y equipos

Tabla No.4-2. Lista de materiales y equipos utilizados

MATERIALES	EQUIPOS
<ul style="list-style-type: none">• Espátulas• Fundas rojas y negras• Frascos color ámbar• Guantes de manejo• Bisturís• Jeringuillas de 1mL, 3 mL• Pinzas• Varillas de agitación• Mangueras• Papel filtro• Pipetas volumétricas• Tubos de ensayo• Embudo• Refrigerante• Vasos de precipitación• Balones aforados de 50 y 25 mL• Balón esmerilado• Pinzas universales• Codos• Extractor soxhlet• Cuba cromatográfica• Jaulas para animales• Rejillas• Franelas• Cápsulas de porcelana• Hojas de afeitar	<ul style="list-style-type: none">• Evaporador rotatorio• Reverbero• Estufa• Mufla• Balanza analítica• pH-metro• Desecador• Espectrofotómetro UV Helios- β• Espectrofotómetro IR JASCO FT/IR4100

Fuente: Francisco Vélez C, 2015.

Tabla No. 5-2. Lista de reactivos utilizados en la investigación

REACTIVOS GENERALES	REACTIVOS PARA TAMIZAJE FITOQUIMICO
<ul style="list-style-type: none"> • Agua destilada • Metanol • Etanol • Cloroformo • Acetato de etilo • Acetona • N-butanol • Diclorometano • Etilbutilcetona • Ácido acético glacial • Ácido fórmico • Estreptozotocina • Ácido cítrico • Citrato de sodio • Ácido sulfúrico • Carbopol • Trietanolamina • Propilenglicol 	<ul style="list-style-type: none"> • Reactivo de Dragendorff • Reactivo de Wagner • Reactivo de Mayer • Cloruro férrico 5% • Magnesio metálico • Reactivo de Baljet • Reactivo de Fehling • Alcohol amílico • Anhídrido acético • Ácido clorhídrico 1% • Ácido nítrico • Hidróxido de sodio 10% • Solución de ninhidrina 5%

Fuente: Francisco Vélez C, 2015.

2.3. Técnicas y métodos

2.3.1. CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA CRUDA

2.3.1.1. Determinación del contenido de humedad

La evaluación de la humedad en la planta cruda se realizó por método gravimétrico, en el cual se pesaron 2 gramos de droga en una cápsula de porcelana previamente tarada, posteriormente se sometió a calentamiento en la estufa a una temperatura de 105°C, durante 3 horas para eliminar el agua en la muestra. Seguido se trasladó a un desecador hasta que la cápsula se enfríe y se pesó, hasta obtener valores constantes. (Normas Ramales para drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311, 312, MINSAP 1992).

El porcentaje de humedad en la muestra se obtiene mediante el siguiente cálculo:

$$\% \text{Humedad} = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

Dónde:

- M_2 = Peso de la cápsula con la muestra
- M_1 = Peso de la cápsula con la muestra desecada
- M = peso de la cápsula vacía tarada

2.3.1.2. Determinación de cenizas totales

El ensayo para determinar cenizas totales se realizó por método gravimétrico, para lo cual se pesaron 2 gramos de droga cruda, y se colocó en un crisol previamente tarado, antes de colocar la muestra en la mufla se la carboniza para eliminar todo residuo orgánico, inmediatamente se colocó en la mufla a una temperatura de 600°C, durante 2 horas, o hasta obtener un polvo blanco, el crisol se retiró y se colocó en un desecador hasta que se enfríe. Se pesó la muestra hasta obtener un valor constante. (Normas Ramales para drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311, 312, MINSAP 1992).

La cantidad de cenizas se evalúa mediante la siguiente fórmula:

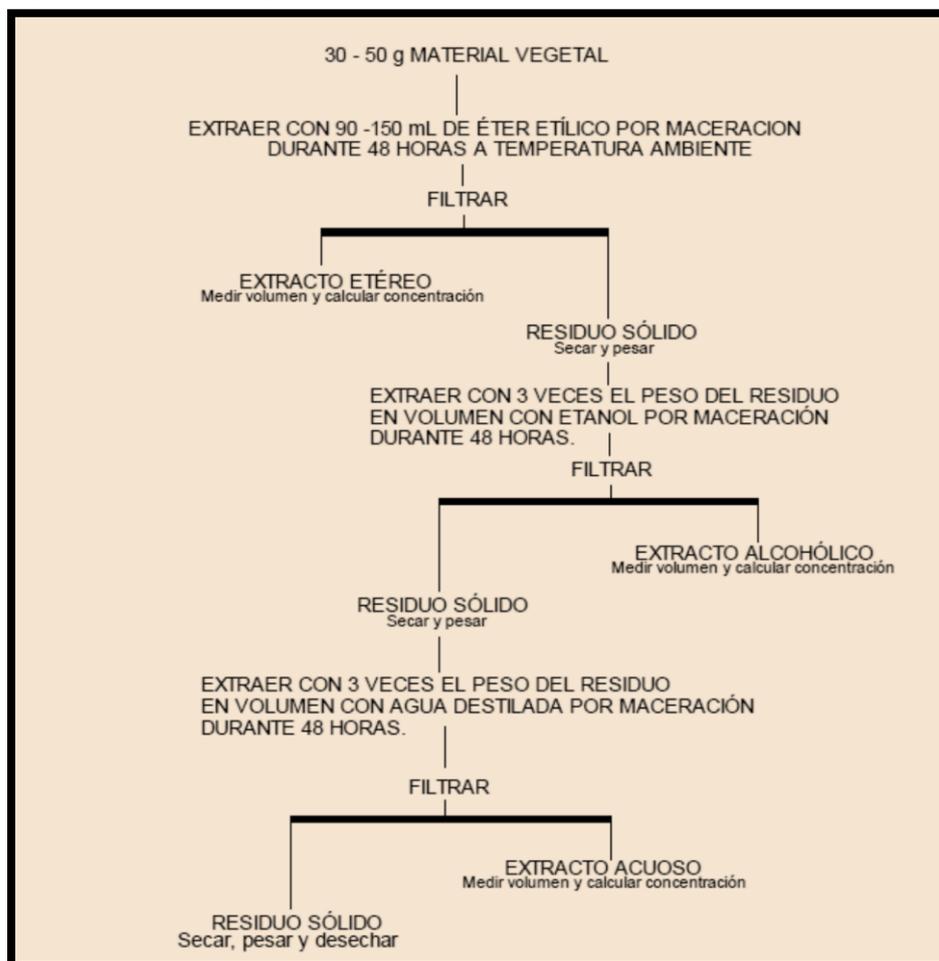
$$\% \text{Cenizas} = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

Dónde:

- M_2 : Peso del crisol con la ceniza
- M_1 : Peso del crisol con la muestra a ensayar
- M : Peso del crisol vacío

2.3.2. Tamizaje fitoquímico

Figura No.1-2. Diagrama de obtención de metabolitos secundarios



Fuente: Miranda M, Farmacognosia y productos naturales, 2011.

2.3.2.1. Ensayo de Dragendorff

La muestra seca disolver en ácido clorhídrico al 1%. Se calienta suavemente y se deja enfriar, con esta solución ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3 gotas del reactivo de Dragendorff, se agita, y se observa: (+) opalescencia, (++) turbidez definida, (+++) precipitado. Con este método podemos determinar la presencia de alcaloides en la muestra. (Miranda, M, 2006 p. 39).

2.3.2.2. *Ensayo de Mayer*

Se procede de la misma manera que el método anterior, se agrega una gota de cloruro de sodio en polvo, se agita y se filtra. Al filtrado se agrega 3 gotas de reactivo de Mayer, reporta: (+) opalescencia, (++) turbidez definida, (+++). Junto con el método anterior permite cualificar alcaloides. (Miranda, M, 2006 p. 39).

2.3.2.3. *Ensayo de Wagner*

Se procede que la técnica anterior para el ensayo de Dragendorff, y se agrega 2 gotas de reactivo de Wagner. Se reporta de la misma manera que los ensayos anteriores. (Miranda, M, 2006 p. 39).

2.3.2.4. *Ensayo de Lieberman- Buchard*

Se debe evaporar la muestra y re disolverla en cloroformo. Agregar 1 mL de anhídrido acético y mezclar bien. Por la pared del tubo dejar resbalar 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Con este ensayo se evalúan la presencia de compuestos terpénicos en la muestra. Se observa cambios de coloración de esta manera: (Miranda, M, 2006 p. 39).

- Rosado- azul muy rápido
- Verde intenso- visible medio rápido
- Verde oscuro- negro, final de la reacción.

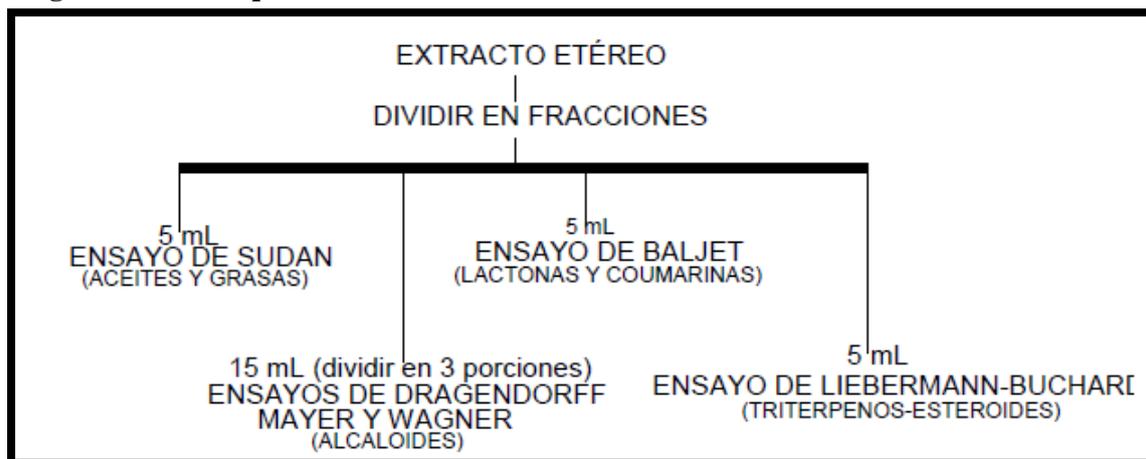
2.3.2.5. *Ensayo de Baljet*

Evaporar la muestra hasta sequedad y disolverla en alcohol. Agregar 1 mL de reactivo de Baljet, el ensayo es positivo cuando se presenta un precipitado color rojo. Sirve para determinar presencia de compuestos cumarínicos. (Miranda, M, 2006 p. 39).

2.3.2.6. *Ensayo de Sudán III*

A una alícuota del extracto obtenido se agrega 1 mL de reactivo de Sudán III, se calienta en baño María hasta evaporación del solvente. La presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotitas grasas o una película de color rojo. (Miranda, M, 2006 p. 39).

Figura No.2-2. Esquema de reacciones realizadas en extracto etéreo



Fuente: Miranda M, Farmacognosia y productos naturales, 2011.

2.3.2.7. *Ensayo de Borntrager*

Evaporar la muestra y disolverla en 1 mL de cloroformo, agregar 1 mL de hidróxido de sodio al 5%, agitar y dejar en reposo. Si la fase acuosa alcalina o parte superior cambia de color a rosa o rojo se considera positivo. Este ensayo permite detectar la presencia de quinonas. (Miranda, M, 2006 p. 39).

2.3.2.8. *Ensayo de catequina*

Con el extracto obtenido se llena un capilar, se coloca una gota en un papel filtro, sobre la gota se coloca una solución de carbonato de sodio, la aparición de una mancha verde brillante en la luz UV se considera positivo. (Miranda, M, 2006 p. 40).

2.3.2.9. *Ensayo de saponinas*

Permite detectar la presencia de saponinas en la muestra. Se debe diluir el extracto en agua 5 veces su volumen. Agitar durante 5 minutos. Observar la formación de la espuma, si persiste más de dos minutos se considera positivo el ensayo. (Miranda, M, 2006 p. 40).

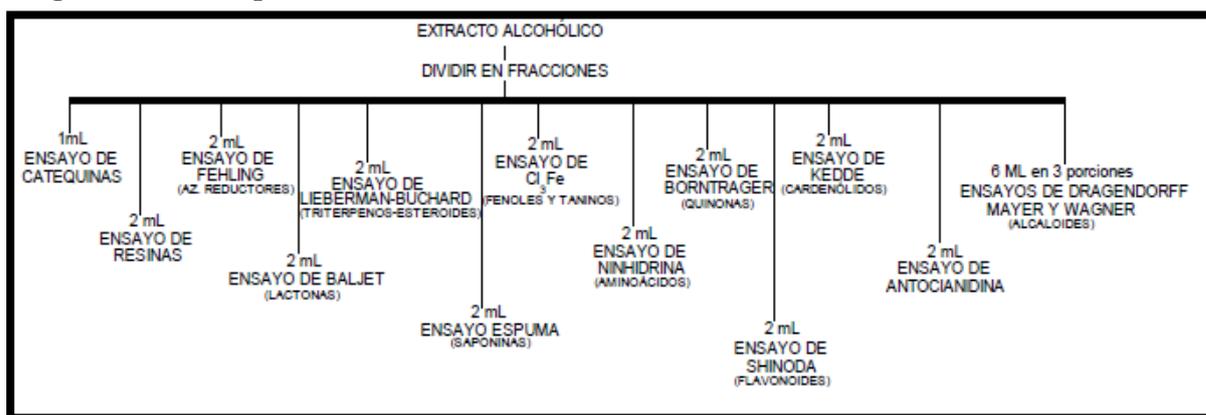
2.3.2.10. Ensayo de cloruro férrico

Sirve para determinar la presencia de compuestos fenólicos. A la alícuota de extracto se agrega unas gotas de tricloruro férrico al 5%. El desarrollo de color rojo se considera como positivo para compuestos fenólicos en general. (Miranda, M, 2006 p. 40).

2.3.2.11. Ensayo de Shinoda

Ayuda a determinar la presencia de flavonoides en la muestra. El extracto se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y se agrega un pedacito de cinta de magnesio metálico. Luego de la reacción se espera 5 minutos y se agrega 1 mL de alcohol amílico, se agita bien, y se deja reposar para su separación. El ensayo se considera positivo cuando la fase del alcohol se colorea amarillo, naranja, rojo intenso. (Miranda, M, 2006 p. 40).

Figura No.3-2. Esquema de reacciones realizadas en extracto alcohólico

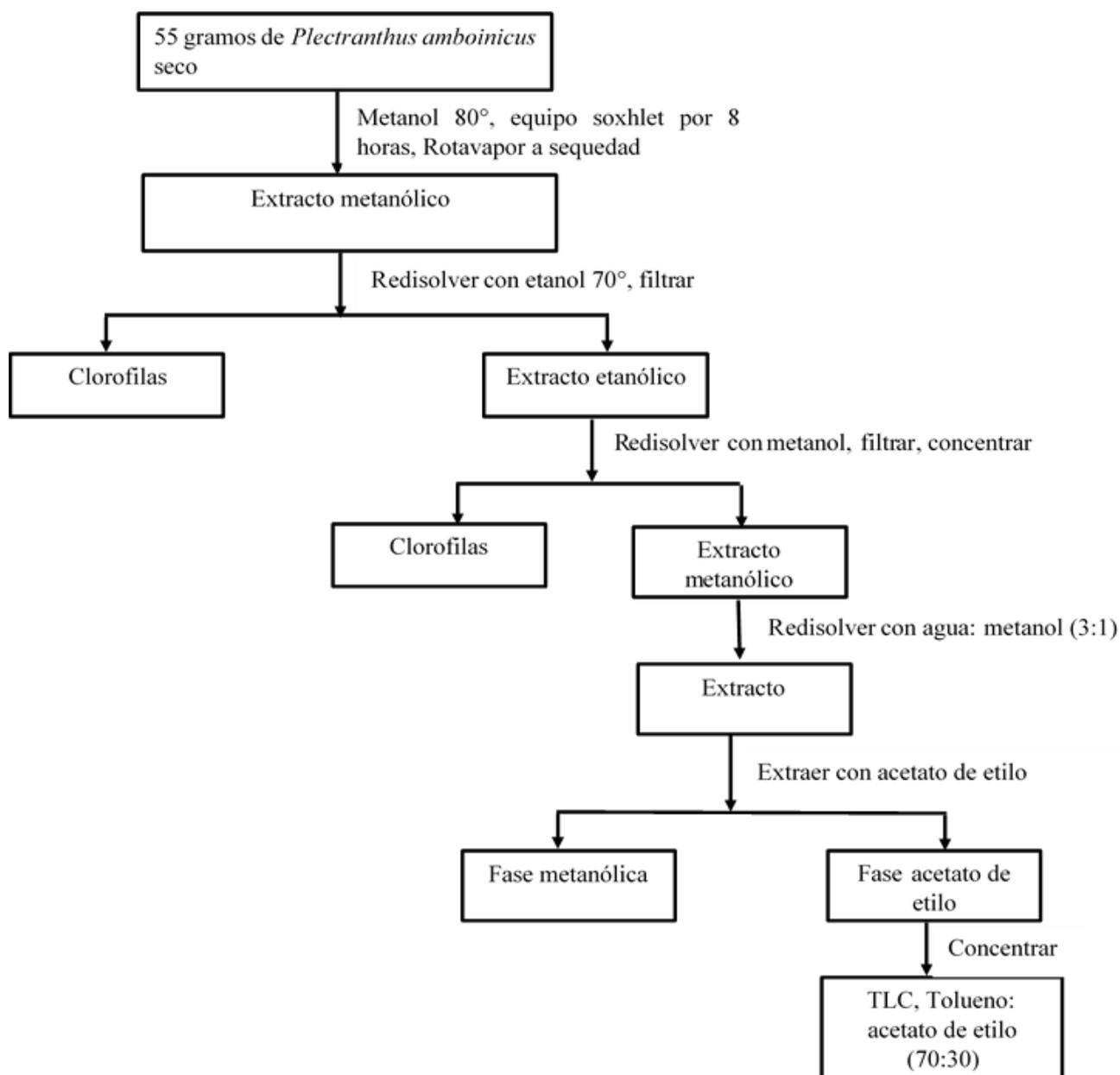


Fuente: Miranda M, Farmacognosia y productos naturales, 2011.

2.3.3. Preparación de los extractos de *Justicia chlorostachya* y *Plectranthus amboinicus*.

La elaboración de los extractos de las especies vegetales a estudiar se realizó como se detalla en el siguiente diagrama, tomando en cuenta que se utiliza la parte aérea de ambas plantas.

Figura No.4-2. Diagrama de flujo para obtención de extractos de *Plectranthus amboinicus*

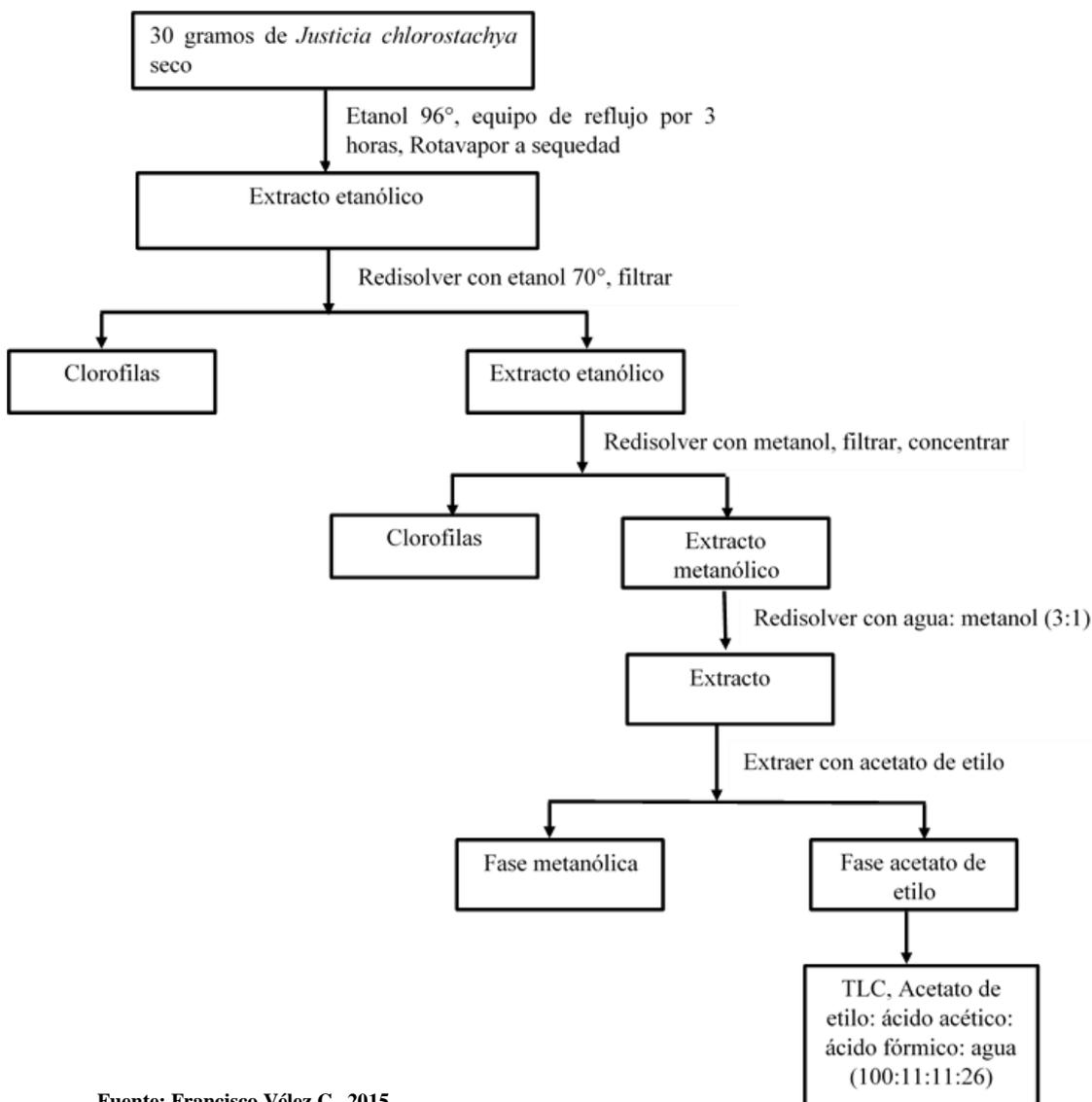


Fuente: Francisco Vélez C., 2015.

La obtención del extracto de *Plectranthus amboinicus* se realizó de acuerdo al siguiente diagrama:

La obtención del extracto de *Justicia chlorostachya* se obtuvo de acuerdo al siguiente diagrama:

Figura No. 5-2. Diagrama de flujo para obtención de extractos de *Justicia*



Fuente: Francisco Vélez C., 2015.

2.3.4. Cromatografía de capa fina (TLC)

2.3.4.1. Cromatografía del extracto de (*Plectranthus amboinicus*)

La fracción flavónica de *Plectranthus amboinicus* previamente aislada, se sometió a cromatografía de capa fina para poder visualizar y aislar los compuestos presentes en éste, para lo cual se ensayó la fase móvil comprendida de los componentes; acetato de etilo: ácido

fórmico: ácido acético glacial: agua en la proporción 100:11:11:26, dicho sistema no muestra una buena resolución, por lo cual se investiga en bibliografía y se probaron los siguientes sistemas:

- Cloroformo: acetato de etilo 60:40, no presenta buena resolución.
- Acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: metil-isobutil-cetona: agua, 5:0,7:0,3:3:1, no presenta buena resolución.
- Cloroformo: acetona: ácido fórmico, 7,5:1,65:0,85, no produce buena resolución.

Las siguientes fases fueron tomadas de bibliografía para separación de los compuestos (Lock, O, 2002 135).

- Cloroformo: metanol: acetato de etilo, 60:30:10, no presenta resolución de los compuestos, una sola mancha al UV
- Ácido acético: agua: ácido clorhídrico, 30:10:3, no presenta resolución.
- N-butanol: ácido acético: agua, 60:35:15, presenta una sola mancha fluorescente al UV, pero sin resolución.
- Cloroformo: ácido acético: agua, 30:15:2, no presenta resolución
- Tolueno: dioxano: ácido acético glacial, 90:25:4, presenta dos manchas al UV, pero sin resolución.
- Diclorometano: metanol, 70:30, no presenta resolución.

Finalmente se realizó cromatografías sucesivas a la misma placa, aumentando la polaridad, se empieza con tolueno: acetato de etilo (93:7), posteriormente se procedió a subir la polaridad y se ensayó con tolueno: acetato de etilo (80:20), a continuación se probó con tolueno: acetato de etilo (70:30), y finalmente con tolueno: acetato de etilo (60:40) con el cual se obtuvo cinco manchas definidas, fluorescentes al UV.

2.3.4.2. Cromatografías del extracto de (*Justicia chlorostachya*)

La fracción flavónica previamente aislada del extracto de *Justicia chlorostachya*, se sometió a cromatografía de capa fina para poder aislar los compuestos presentes en éste, para lo cual se sometió a la fase móvil con acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua en la proporción 100:11:11:26, dicho sistema presenta la mejor resolución para este extracto. Con el cual se obtienen 4 manchas bien definidas, que presentan fluorescencia al UV.

2.3.5. Separación de los compuestos

Al determinar la correcta fase móvil para obtener una resolución adecuada de los compuestos se realizó una placa cromatográfica preparativa para proceder a su aislamiento. Después de preparada la placa se eluyó en el mismo sistema de solventes utilizados para obtener franjas de los componentes. Una vez desarrollada la placa, se secó y se señaló cada mancha; se raspó el soporte que contiene los compuestos, cada uno de los cuales fueron colocados en frascos. Posteriormente, se procedió a extraer con solventes adecuados los compuestos a partir del soporte, los más apolares con tolueno y los polares con acetato de etilo. Finalmente, se filtró los eluidos así obtenidos y se desarrollaron placas cromatográficas a fin de verificar una sola mancha y con aquello una separación apropiada de cada compuesto, los cuales después de purificados se concentraron a sequedad y redisolviéron en metanol para posteriores determinaciones espectroscópicas.

2.3.6 Cuantificación de flavonoides totales

Se procedió a cuantificar los flavonoides totales presentes en la muestra, para lo cual se preparó una curva de calibración con un estándar de quercetina a las siguientes concentraciones: 1; 2,5; 5; 7,5 y 10 ug/mL. Luego se midió la fracción flavónica de cada planta a una longitud de onda de 770 nm. Los flavonoides cuantificados se detallan como flavonoides totales expresados como quercetina.

2.3.7. Determinaciones espectroscópicas

2.3.7.1. Determinación UV

Las muestras cristalizadas se diluyen en 3 mL de metanol, para lectura en el UV, se utiliza un rango en el intervalo de longitudes de onda de 200- 400 nm. Posteriormente, a los compuestos se les realiza tratamiento con las siguientes sustancias, para comprobación de desplazamientos batocrómicos, para determinar posibles sustituciones/grupos presentes en la estructura.

Los tratamientos a utilizar para observar ver desplazamiento de los picos son:

- Metóxido de sodio: se agregan tres gotas de metóxido de sodio a la solución del compuesto, se homogeniza, y se lee al UV inmediatamente y después de 5 minutos.
- Cloruro de aluminio: a la solución con el compuesto se le agrega tres gotas de solución de AlCl₃, leer al espectro UV.
- Cloruro de aluminio/ ácido clorhídrico: a la solución con el compuesto se le agrega tres gotas de solución de AlCl₃, y tres gotas de ácido clorhídrico, leer al espectro UV.

- Acetato de sodio: a la solución del compuesto que se encuentra en la cubeta, se le agrega exceso de acetato de sodio, se lee luego de dos minutos de adicionar el acetato, luego a los 5 minutos y finalmente a los 10 minutos para comprobar si hay o no hay descomposición.
- Acetato de sodio/ ácido bórico: se agrega 5 gotas de esta solución a la solución del compuesto separado, saturar con acetato de sodio y leer inmediatamente. (Lock, O, 1994 p. 138).

2.3.7.2. Determinación IR

Se registraron los espectros IR de los componentes separados y redisueltos en metanol como se indicó preliminarmente, en un espectrofotómetro infrarrojo JASCO FT/IR4100. De los espectros obtenidos se analizó cada pico para determinar los grupos funcionales correspondientes.

2.3.8. Preparación de los geles

2.3.8.1. Preparación de los geles vehículos

- Previamente se colocan 2 gramos de Carbopol en 100 mL de agua destilada, hasta lograr la humectación total del producto.
- Se miden 70 gramos del Carbopol humectado, se lleva a 90 mL con agua destilada.
- Colocar 1 mL de etanol, y 1 mL de propilenglicol como hidratante.
- Se agregan gotas de trietanolamina, y se agita hasta obtener la viscosidad deseada del gel.

2.3.8.2. Preparación de los geles experimentales (200 mg/kg de peso).

- Previamente se colocan 2 gramos de Carbopol en 100 mL de agua destilada, hasta lograr la humectación total del producto.
- Se miden 70 gramos del Carbopol humectado, se lleva a 90 mL con agua destilada.
- Se pesan 6,8 mg de cada extracto seco por separado para formular cada gel, y se diluye en 1 mL de etanol.
- El extracto diluido se mezcla con el Carbopol, y 1 mL de propilenglicol.
- Se agrega poco a poco la trietanolamina, hasta obtener la misma composición del gel vehículo.

- Se envasa rotulado, y se guarda. Con esta formulación se obtiene un gel con una concentración adecuada a fin de que cada aplicación corresponda a una dosis de administración por vía tópica de 200 mg/kg de peso para los animales.

2.3.8.3. Preparación de los geles experimentales (400 mg/kg de peso).

- Previamente se colocan 2 gramos de Carbopol en 100 mL de agua destilada, hasta lograr la humectación total del producto.
- Se miden 70 gramos del Carbopol humectado, se lleva a 90 mL con agua destilada.
- Se pesan 13,6 mg de cada extracto seco por separado para formular cada gel, y se diluye en 1 mL de etanol.
- El extracto diluido se mezcla con el Carbopol, y 1 mL de propilenglicol.
- Se agrega poco a poco la trietanolamina, hasta obtener la misma composición del gel vehículo.
- Se envasa rotulado, y se guarda. Con esta formulación se obtiene un gel con una concentración adecuada a fin de que cada aplicación corresponda a una dosis de administración por vía tópica de 400 mg/kg de peso para los animales.

Tabla No. 6-2: Formulaciones de los geles para actividad cicatrizante

Formulación gel vehículo	Formulación geles con extracto 200 mg/kg	Formulación geles con extracto 400 mg/kg
Carbopol humectado 70 g	Carbopol humectado 70 g	Carbopol humectado 70 g
Agua destilada 20 mL	Agua destilada 20 mL	Agua destilada 20 MI
Etanol 1mL	Etanol 1mL + 6,8 mg de extracto seco	Etanol 1mL+ 13,6 mg de extracto seco
Propilenglicol 1mL	Propilenglicol 1mL	Propilenglicol 1mL
Trietanolamina 0,15 mL	Trietanolamina 0,15 mL	Trietanolamina 0,15 mL

Fuente: Francisco Vélez C, 2015.

2.3.9. Protocolo Farmacológico

Se utilizaron 21 ratones machos *Mus musculus*, de 8 semanas de edad, divididos aleatoriamente en 7 grupos de 3 individuos cada uno. Fueron aclimatados durante un periodo de dos semanas.

Tabla No. 7-2: Esquema de tratamientos para la actividad cicatrizante

Blanco negativo	Blanco positivo	Ensayo toxicidad	<i>Justicia chlorostachya</i>				<i>Plectranthus amboinicus</i>
			K1	K2	K3	K4	K5
Solo buffer citrato	STZ	STZ	STZ	STZ	STZ	STZ	STZ
Vehículo de gel	Vehículo de gel	Dosis fija	Gel+ extracto 200 mg/mL	Gel+ extracto 400 mg/mL	Gel+ extracto 200 mg/mL	Gel+ extracto 400 mg/mL	Gel+ extracto 400 mg/mL

Fuente: Francisco Vélez C, 2015.

2.3.9.1. Inducción de diabetes a los ratones

La inducción de la diabetes se realizó por medio de la administración de una dosis de 50 mg/kg de estreptozotocina disuelta en una solución buffer de citrato 0.1 M (pH 4.5), durante 5 días consecutivos. La administración se realizó por vía intraperitoneal de acuerdo al peso del animal. (Zaman, M.M, Shinagawa. T, Ishii. S, 2014 p. 2)

Tabla No. 8-2: Esquema de dosificación de estreptozotocina a los animales

		peso, g	dosis, mg/kg	cantidad STZ, mg	STZ, mg/mL	Vol. Administración, mL
K1	Ratón 1	28,8	50	1,440	15	0,10
	Ratón 2	29,2	50	1,460	15	0,10
	Ratón 3	30,4	50	1,520	15	0,10
K2	Ratón 4	30,4	50	1,520	15	0,10
	Ratón 5	30,7	50	1,535	15	0,10
	Ratón 6	30,8	50	1,540	15	0,10
K3	Ratón 7	31,8	50	1,590	15	0,11
	Ratón 8	32	50	1,600	15	0,11
	Ratón 9	33,2	50	1,660	15	0,11
K4	Ratón 10	33,2	50	1,660	15	0,11
	Ratón 11	33,4	50	1,670	15	0,11
	Ratón 12	34,7	50	1,735	15	0,12
K5	Ratón 13	35,8	50	1,790	15	0,12
	Ratón 14	36,1	50	1,805	15	0,12
	Ratón 15	38,3	50	1,915	15	0,13
K6	Ratón 16	39,1	50	1,955	15	0,13
	Ratón 17	42,9	50	2,145	15	0,14
	Ratón 18	43,2	50	2,160	15	0,14
K7	Ratón 19	44,1	50	2,205	15	0,15
	Ratón 20	45,2	50	2,260	15	0,15
	Ratón 21	45,8	50	2,290	15	0,15

Realizado por: Francisco Vélez C, 2015.

2.3.9.2. Actividad cicatrizante en los ratones

- Se depila el lomo de cada ratón utilizando crema depilatoria Veet, para eliminar toda la velloalidad presente en el animal.
- A las 24 horas después de haber realizado la depilación, se procede a anestesiarse a los animales con lidocaína en una dosis de 7 mg/kg peso, vía subcutánea, se procede a inducir la herida en el animal mediante un corte con un bisturí de 1 cm de diámetro.
- Se aplica 0,1 mL de gel preparado diariamente, durante 15 días
- Adicionalmente, se controló la glicemia en muestras de sangre obtenidas por punción submaxilar.
- Se mide la contracción de la herida al primer día luego de la aplicación, al cuarto, séptimo, décimo primero y décimo quinto días. (Singh., A. et al, 2014 p. 2).

Tabla No. 9-2: Esquema de tratamientos a cada animal de experimentación

	Animales	Tratamientos
K1(No diabético+ vehículo gel)	Ratón 1	Gel vehículo
	Ratón 2	Gel vehículo
	Ratón 3	Gel vehículo
K2(diabético+ vehículo gel)	Ratón 4	Gel vehículo
	Ratón 5	Gel vehículo
	Ratón 6	Gel vehículo
K4(diabético+ Justicia 200 mg/mL)	Ratón 10	Gel con extracto 200 mg/kg
	Ratón 11	Gel con extracto 200 mg/kg
	Ratón 12	Gel con extracto 200 mg/kg
K5(diabético+ Justicia 400 mg/mL)	Ratón 13	Gel con extracto 400 mg/kg
	Ratón 14	Gel con extracto 400 mg/kg
	Ratón 15	Gel con extracto 400 mg/kg
K6(diabético+ Plectranthus 200 mg/mL)	Ratón 16	Gel con extracto 200 mg/kg
	Ratón 17	Gel con extracto 200 mg/kg
	Ratón 18	Gel con extracto 200 mg/kg
K7(diabético+ Plectranthus 400 mg/mL)	Ratón 19	Gel con extracto 400 mg/kg
	Ratón 20	Gel con extracto 400 mg/kg
	Ratón 21	Gel con extracto 400 mg/kg

Realizado por: Francisco Vélez C, 2015.

2.3.9.3. Ensayo de toxicidad

Se prepara una dosis de extracto a 2000 mg/kg de peso y se administra por vía oral a tres animales, se les observa por 14 días, aunque no existan signos de toxicidad aparente, adicionalmente se realizan cortes histológicos para observar posibles daños en los principales órganos farmacocinéticos.

2.3.10. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se tratan con el programa ImageJ, para obtener el área de la herida de cada animal a lo largo de tiempo, luego se procede a obtener las áreas bajo la curva para cada individuo. Con los datos obtenidos se realiza un análisis de varianza y un post-test de TUKEY, para comprobar diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$ se consideró como significativo).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Control de calidad de la droga cruda

La elaboración de los extractos se realizó de acuerdo a la Guía de Farmacognosia y Productos Naturales, y en base a las Normas Ramales para Drogas crudas, extractos y tinturas. (NRSP 309, 311 y 312). Posteriormente, el extracto y la droga cruda fueron sometidas a los ensayos descritos en el capítulo anterior. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

CUADRO No. 1-3. Control de calidad de las plantas secas *Plectranthus amboinicus* y *Justicia chlorostachya*. Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba Marzo 2015.

PARAMETRO	<i>Plectranthus amboinicus</i>	<i>Justicia chlorostachya</i>	Límites aceptados (Real Farmacopea Española 2002)
HUMEDAD (%)	10%	12,3%	14%
CENIZAS TOTALES (%)	3,5%	4,6%	5%

Realizado por: Francisco Vélez C.

El porcentaje de humedad fue de 10% y 12,5%, para cada especie vegetal respectivamente; los cuales en comparación con los datos encontrados en la Real Farmacopea Española (2002), se encuentran dentro de los parámetros de referencia. En consecuencia, existe conformidad en los resultados obtenidos, este ensayo expresa el porcentaje de agua, en referencia a las condiciones ambientales en donde se encontraron las plantas, y la parte de ésta que fue sometida al estudio en este caso; tallos y hojas.

El contenido de cenizas totales para cada especie fue de 3,5% y 4,6%, respectivamente, los cuales comparados con la bibliografía citada, cumplen con los parámetros establecidos, este ensayo nos ayuda a determinar el contenido de minerales. Dado que los valores de humedad y ceniza se encuentran dentro de los parámetros de referencia, se puede inferir que existen minerales en una proporción relativamente baja, los cuales no causarán interferencia en la elaboración de los extractos. (Brunenton, J, 2001 p. 59).

3.2. Tamizaje fitoquímico

Se realizó el tamizaje fitoquímico, siguiendo la técnica explicada en bibliografía (Miranda, M, 2006). Para la determinación de los metabolitos secundarios principales en ambas especies de plantas, los extractos analizados exhibieron los siguientes resultados:

CUADRO No. 2-3. Tamizaje fitoquímico de los extractos de *Plectranthus amboinicus* y *Justicia chlorostachya*. Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias.

Ensayo realizado	Compuesto a identificar	Resultado <i>Plectranthus amboinicus</i>	Resultado <i>Justicia chlorostachya</i>
Sudán III	Grasas	+	+
Dragendorff	Alcaloides	-	-
Wagner	Alcaloides	-	-
Mayer	Alcaloides	-	-
Baljet	Cumarinas	++	+
Borntrager	Quinonas	++	++
Lieberman-Buchard	Terpenos	-	-
Catequinas	Catequinas	+	+
Shinoda	Flavonoides	+++	+++
Antocianidinas	Antocianidinas	++	+++
Espuma	Saponinas	-	-
Resinas	Resinas	+	-
Cloruro Férrico	Compuestos fenólicos	+++	+++
Fehling	Azúcares reductores	+	-

ESPOCH. Riobamba Marzo 2015.

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

Realizado por: Francisco Vélez C.

Los resultados observados del tamizaje del extracto metanólico de ambas especies, demuestran la presencia de los siguientes metabolitos: cumarinas, flavonoides, antocianidinas, catequinas y quinonas, en mayor cantidad. Lo cual, da a entender que la acción principal para la cicatrización estaría posiblemente dada por estos compuestos de naturaleza fenólica. Además, de que se ha citado que presentan actividad: antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana, comprobada. (Lock, O. 1994 p. 114).

No se observa presencia de alcaloides en las especies vegetales y tampoco terpenos, por lo cual, una posible actividad por parte de éstos; en esta investigación queda descartada, a menos que se trate de moléculas muy activas y no estén al alcance del límite de detección de los ensayos del tamizaje fitoquímico. Los flavonoides se encuentran en mayor cantidad, por lo cual se decidió trabajar con esta fracción para caracterizar los posibles compuestos presentes.

3.3. Cromatografías en capa fina

3.3.1. Cromatografías del extracto de (*Plectranthus amboinicus*)

El sistema de solventes acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:26), como se puede observar no presentó una buena resolución, solo aparece una mancha al final del recorrido. La mancha presenta fluorescencia de color rojo al observarse al UV cercano y una cola.

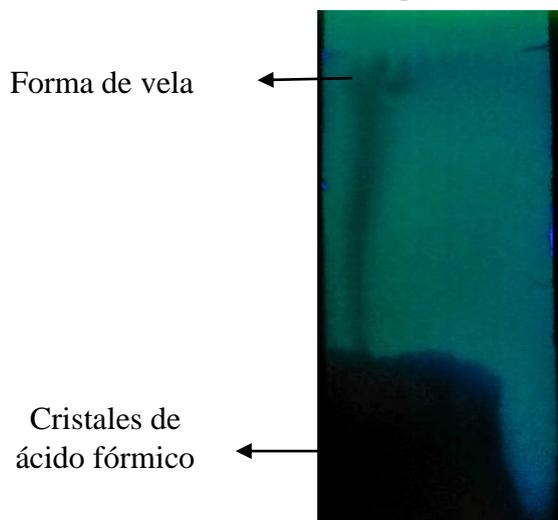
Fotografía No. 1-3. Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de *P. amboinicus*. Fase Móvil: Acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:26)



Realizado por: Francisco Vélez C.

Se procedió a eluir la fracción flavónica en la fase móvil de acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: metil-isobutil-cetona: agua, (5:0,7:0,3:3:1), se observó falta de resolución, además por la presencia de los ácidos, posiblemente afectaron el soporte de la placa, y se evidenció por la presencia de los compuestos en forma de vela.

Fotografía No. 2-3. Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de *P. amboinicus*. Fase Móvil: Acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: metil-isobutil-cetona: agua, (5:0,7:0,3:3:1)



Realizado por: Francisco Vélez C.

Se procedió a eluir con cloroformo: acetato de etilo (60:40), se produce un recorrido uniforme, sin presencia de ninguna mancha, ni fluorescencia marcada, por lo cual se decide que dicha fase móvil no es la óptima para la separación de los compuestos.

Fotografía No. 3-3. Cromatografía en capa fina del extracto metanólicos de *P. amboinicus*. Fase Móvil: Cloroformo: acetato de etilo (60:40).



Realizado por: Francisco Vélez C.

Posteriormente, se eluyó con la fase móvil cloroformo: metanol: acetato de etilo, 60:30:10; en la que se presentó una mancha color rojo fluorescente al UV cercano, con un R_f de 0,71; sin embargo, existió la presencia de una cola alrededor de la mancha que no permitió separar correctamente el compuesto. Por lo cual, no se utiliza esta fase para la separación.

Fotografía No. 4-3. Cromatografía en capa fina del extracto metanólicos de *P. amboinicus*. Fase Móvil: Cloroformo: metanol: acetato de etilo, (60:30:10)



Realizado por: Francisco Vélez C.

Con la fase móvil: ácido acético: agua: ácido clorhídrico, (30:10:3), los vapores del ácido producen cristalización en la placa dañándola, por lo cual no se realiza una adecuada elución; de modo que se descarta esta fase móvil.

Fotografía No. 5-3. Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de *P. amboinicus*. Fase Móvil: Ácido acético: agua: ácido clorhídrico. (30:10:3)



Realizado por: Francisco Vélez C.

Con la fase cloroformo: ácido acético: agua, (30:15:2), los compuestos no presentan resolución alguna, por lo cual se descarta dicha fase.

Fotografía No. 6-3. Cromatografía en capa fina del extracto de metanólico *P. amboinicus*. Fase Móvil: Cloroformo: ácido acético: agua, (30:15:2)

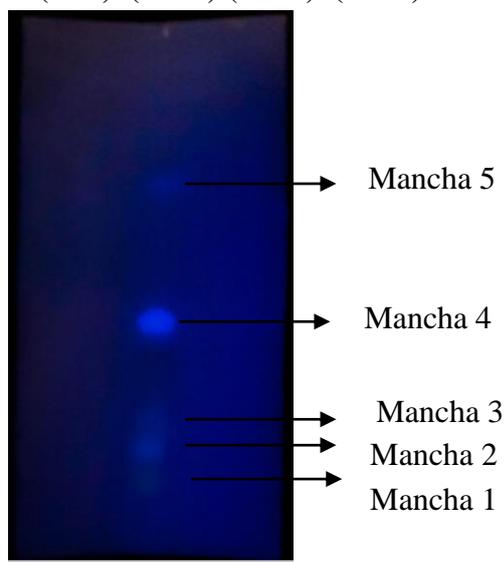


Realizado por: Francisco Vélez C.

En las fases móviles anteriores se observó que los compuestos no se separan y como conclusión en base a la polaridad de los sistemas empleados se estableció que el uso de compuestos apolares posiblemente daría mejores resultados, y asimismo se evidenciaba la posibilidad de que los compuestos probablemente serían agliconas metoxiladas.

Finalmente se realizaron cromatografías sucesivas a la misma placa, aumentando la polaridad, se empezó con tolueno: acetato de etilo (93:7), posteriormente se procede a subir la polaridad y se ensaya con tolueno: acetato de etilo (80:20), a continuación se prueba con tolueno: acetato de etilo (70:30), y finalmente con tolueno: acetato de etilo (60:40) con el cual se obtiene cinco manchas definidas, fluorescentes al UV cercano. Este sistema se utilizó para realizar la placa preparativa y separar los compuestos.

Fotografía No. 7-3. Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de *P. amboinicus*. Fase Móvil: Tolueno: acetato de etilo forma progresiva (93:7)- (80:20)-(70:30)- (60-40).



Realizado por: Francisco Vélez C.

CUADRO No. 3-3. Rf de los compuestos obtenidos por TLC del *Plectranthus amboinicus*. Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba Marzo 2015.

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

Realizado por: Francisco Vélez C.

3.3.2. Cromatografías del extracto de (*Justicia chlorostachya*)

La fracción flavónica previamente separada, se sometió a cromatografía en capa fina, utilizando como fase móvil, el sistema de solventes: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (100:11:11:26). Luego del recorrido se obtuvieron cuatro manchas definidas, todas fluorescentes al UV cercano.

Fotografía No. 8-3. Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de *J. chlorostachya*. Fase Móvil: Acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (100:11:11:26)



Realizado por: Francisco Vélez C.

CUADRO No. 4-3. Rf de los compuestos obtenidos por TLC de la *Justicia chlorostachya*. Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba Marzo 2015.

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

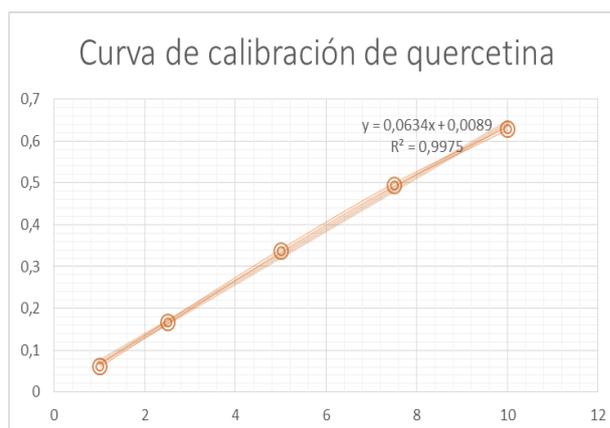
Realizado por: Francisco Vélez C.

3.4. Cuantificación de flavonoides totales

Se cuantificaron los flavonoides totales expresados como quercetina, para lo cual se construyó una curva de calibración con un estándar de quercetina a diferentes concentraciones, y mediante la ecuación de la curva se calculó la concentración de flavonoides presentes en las fracciones extraídas, a partir de la absorbancia resultante, luego de una lectura en el espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 377 nm. La curva de calibración realizada se detalla a continuación:

Gráfico No. 1-3. Curva de calibración de quercetina

[] ug/mL	Abs
1	0,063
2,5	0,167
5	0,338
7,5	0,496
10	0,63



Realizado por: Francisco Vélez

Podemos ver la gráfica de la curva de calibración, una vez interpolado los datos de las muestras leídas, se obtuvo una concentración de 0,2 mg/g de planta para el *P. amboinicus* y 0,15 mg/g de planta para *J. chlorostachya*. Los valores obtenidos demuestran la presencia de flavonoides expresados como quercetina en las muestra, en una cantidad significativa.

3.5. Análisis espectroscópicos de los compuestos separados

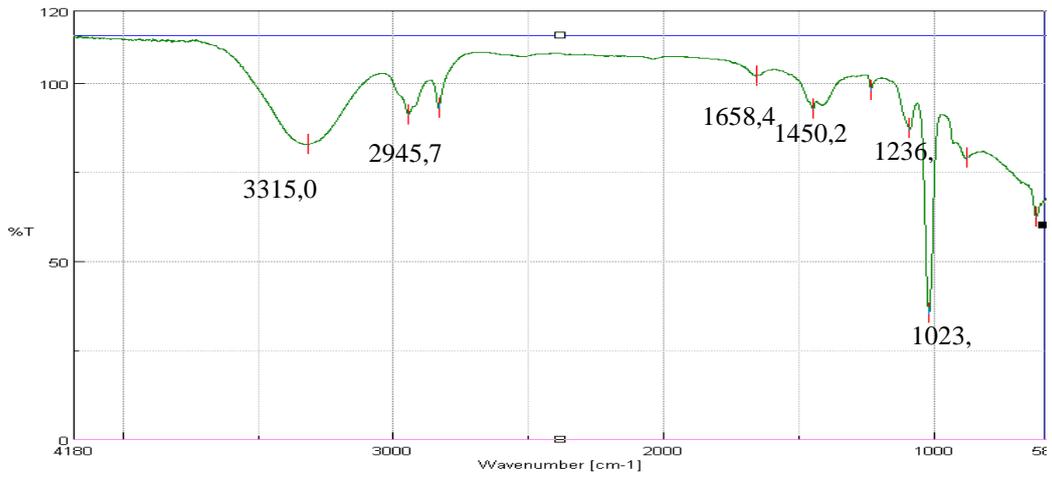
3.5.1. Análisis espectroscópico de los compuestos separados de (*Plectranthus amboinicus*)

Los compuestos previamente separados de la sílica gel fueron sometidos a lecturas de barrido en el infrarrojo y UV.

3.5.1.1. Compuesto 1

El compuesto 1 se presentó como cristales translúcidos, solubles en metanol, se analizó por espectroscopia IR, obteniéndose los siguientes picos: a $\approx 3315,03 \text{ cm}^{-1}$ correspondientes a una vibración por tensión del grupo O-H, $2945,73 \text{ cm}^{-1}$, vibración por tensión del grupo C-H del grupo aromático. Tenemos una vibración de tensión en $\approx 1658,48 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al grupo C=C, y un pico de $1450,21 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al anillo aromático; en la región de la huella dactilar encontramos una vibración de tensión del grupo C-O a los $1236,15 \text{ cm}^{-1}$, y una vibración de deformación del grupo C-H libre, a los $1023,05 \text{ cm}^{-1}$. (Hesse M, et al, 1997).

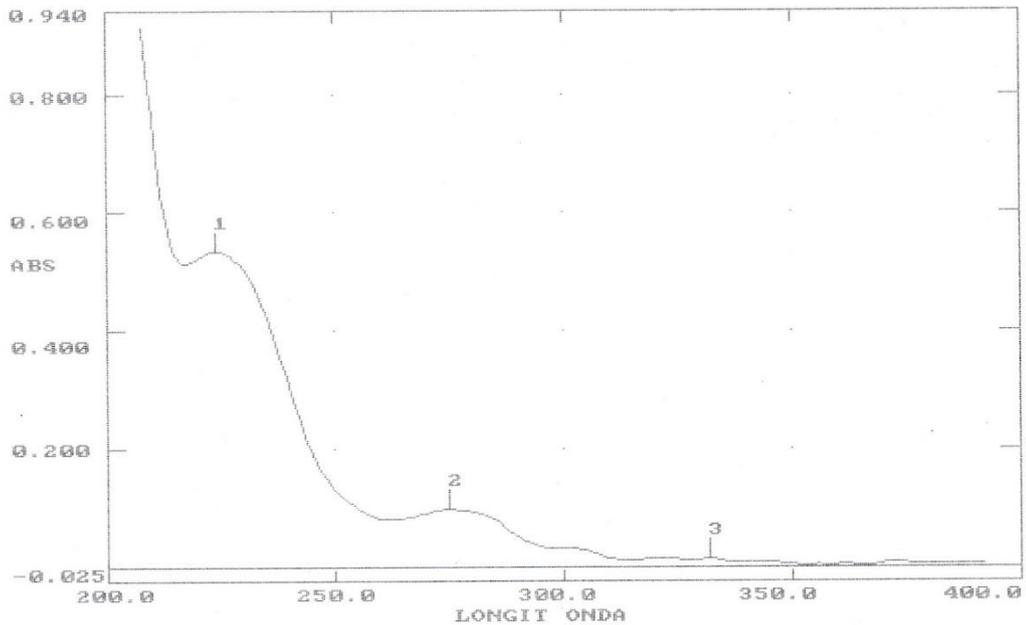
Gráfico No. 2-3. Espectro IR del compuesto número 1 obtenido del extracto de *Plectranthusamboinicus*



Realizado por: Francisco Vélez C.

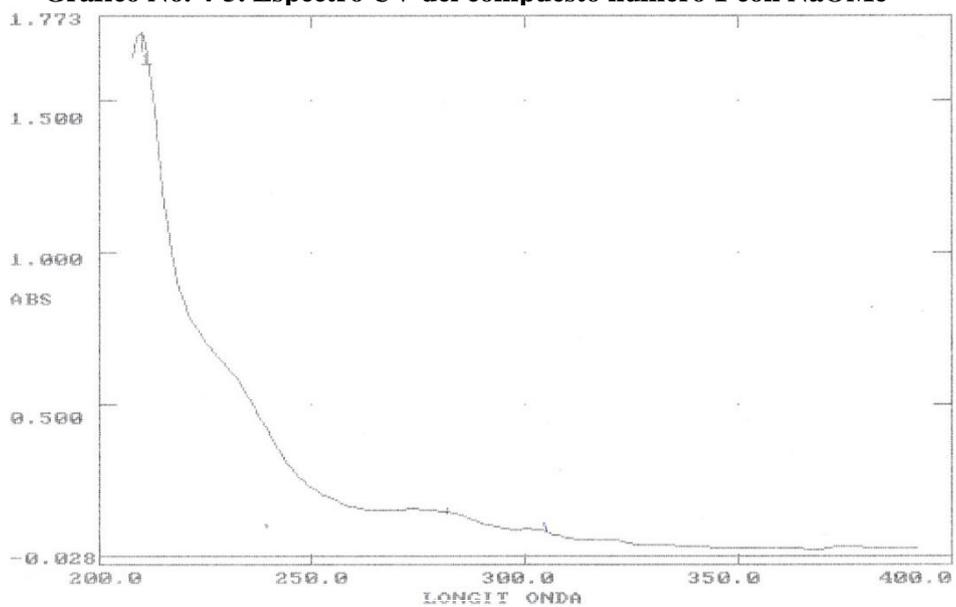
El análisis espectroscópico ultravioleta se realizó en el espectrofotómetro Helios β , en barrido a una longitud de onda de 200 a 400 nm. Utilizando reactivos de desplazamiento se obtuvieron siguientes espectros:

Gráfico No. 3-3. Espectro UV del compuesto número 1 con MetOH



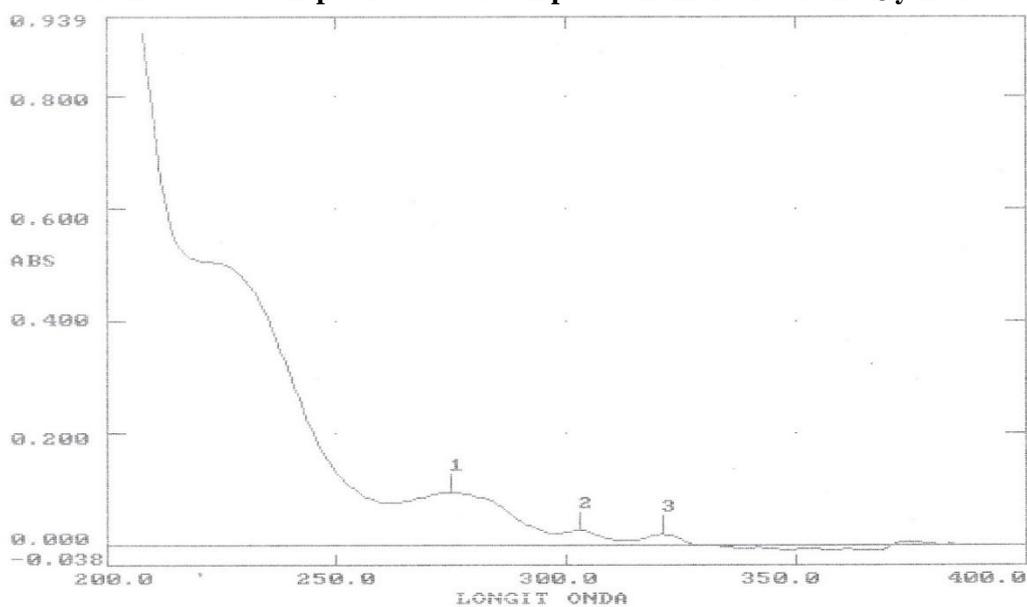
Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 4-3. Espectro UV del compuesto número 1 con NaOMe



Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 5-3. Espectro UV del compuesto número 1 con AlCl₃ y HCl



Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 6-3. Espectro UV del compuesto número 1 con NaOAc

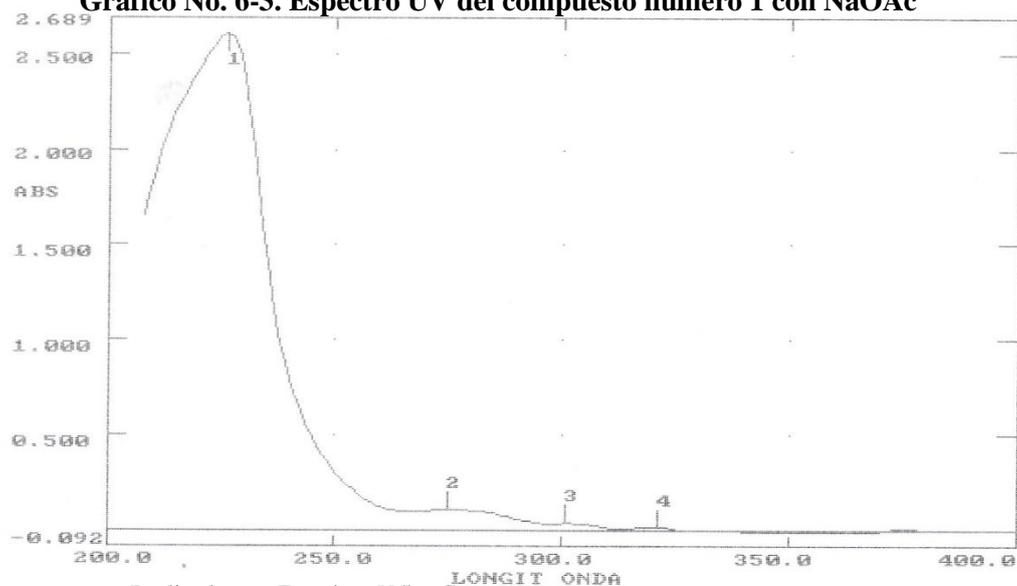
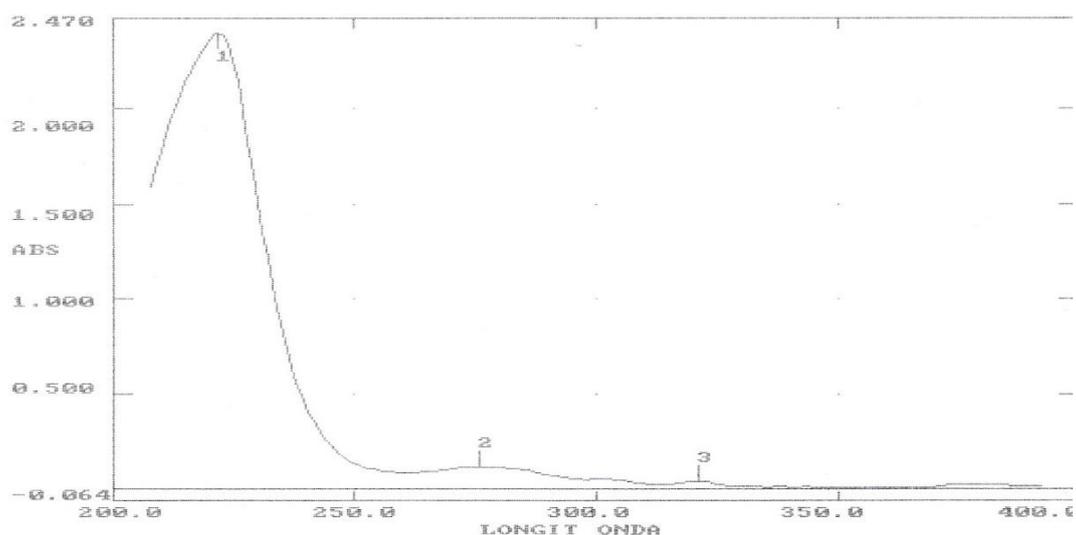


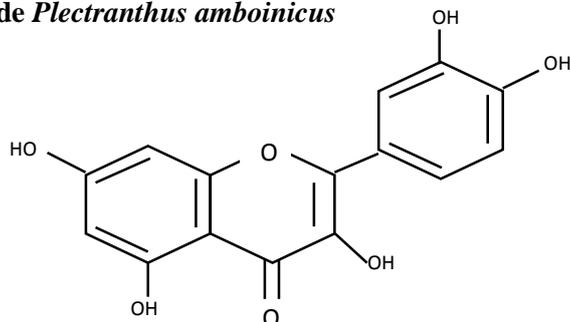
Gráfico No. 7-3. Espectro UV del compuesto número 1 con H₃BO₃



Como podemos observar en los espectros la banda I absorbió a los 332 nm, y la banda II con menor intensidad a los 275 nm. Al aplicarse reactivos de desplazamiento se produjeron las siguientes variaciones: con NaOMe se descompone el espectro totalmente, con AlCl₃ y HCl existe un movimiento batocrómico de la banda I a 321 nm, con NaOAc absorbió a 321 nm, mientras que la banda II no se desplazó, estos movimientos característicos implican la posibilidad de la presencia de un flavonol-3- sustituido, con hidroxilaciones en 5, 7 en el anillo A, e hidroxilaciones en 3 y 4 en el anillo B, con los desplazamientos realizados se pudo proponer la posible estructura de este compuesto la cual es la siguiente. (Martínez, A. 2005 p. 15).

En complemento con los datos obtenidos se puede sugerir que la estructura coincide con la quercetina, que según Menéndez, (1999), existe en la especie vegetal.

Figura No.1-3. Posible estructura del Compuesto 1 extraído del extracto de *Plectranthus amboinicus*

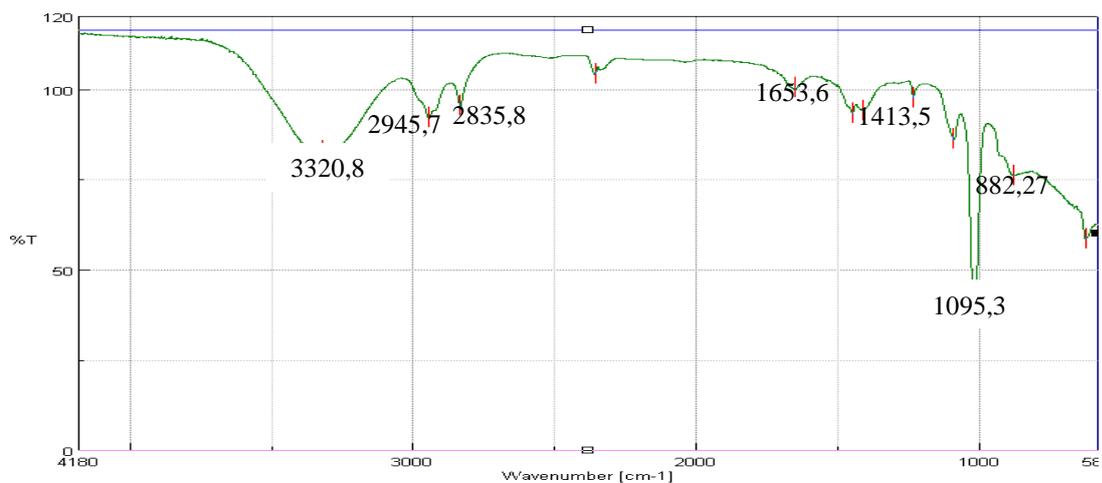


Realizado por: Francisco Vélez C.

3.5.1.2. Compuesto 2

El compuesto 2 se presentó como cristales de color amarillo pálido, soluble en metanol, se analizó por espectroscopia IR, obteniéndose los siguientes picos: a $\approx 3320,82 \text{ cm}^{-1}$ correspondientes a una vibración por tensión del grupo O-H, $2945,73 \text{ cm}^{-1}$, vibración por tensión del grupo C-H₃ libre. Existe una vibración de tensión del C-H del anillo bencénico en los $2835,81 \text{ cm}^{-1}$. Tenemos una vibración de tensión en $\approx 1653,66 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al grupo C=C, y un pico de $1413,57 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la vibración de tensión del anillo aromático; en la región de la huella dactilar encontramos una vibración de tensión del grupo C-O a los $1095,37 \text{ cm}^{-1}$ característica de los flavonoides, y una vibración de deformación del grupo C-H libre, a los $882,27 \text{ cm}^{-1}$. (Hesse M, et al, 1997 p. 60)

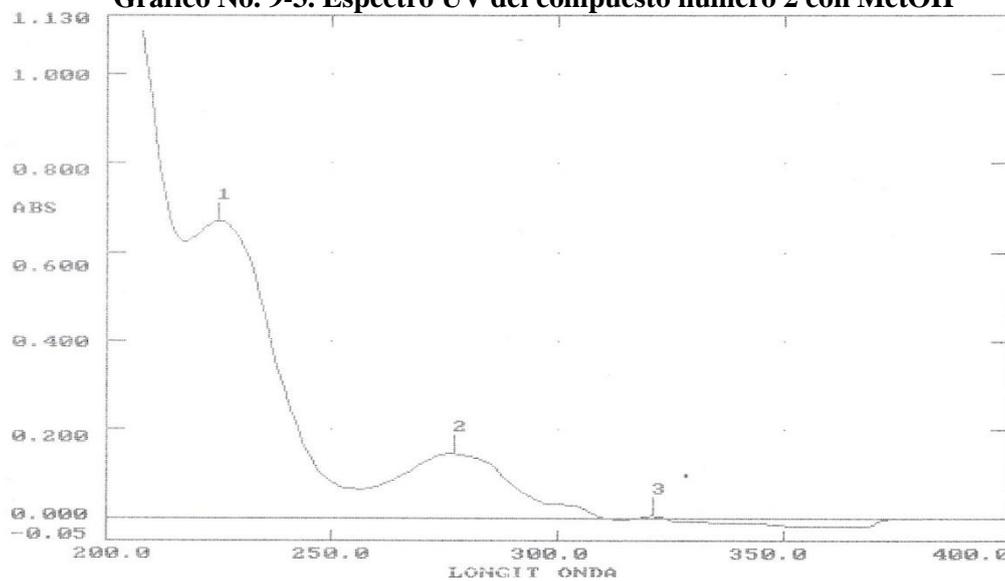
Gráfico No. 8-3. Espectro IR del compuesto número 2 obtenido del extracto de *Plectranthus amboinicus*



Realizado por: Francisco Vélez C.

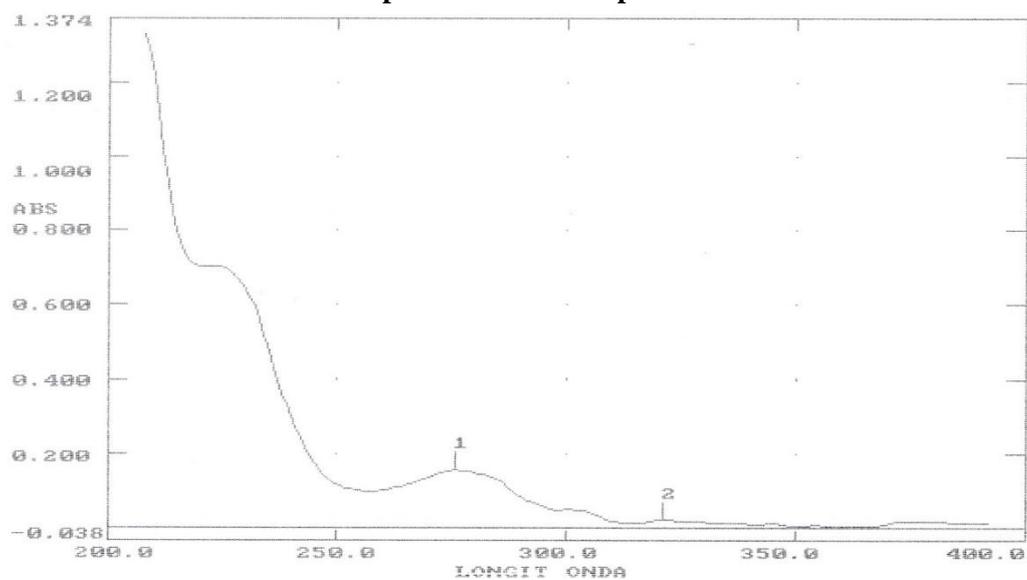
El análisis en el espectrofotómetro ultravioleta se realizó en el equipo Helios β, utilizando la técnica de barrido las longitudes de onda de 200 a 400 nm. Utilizando reactivos de desplazamiento se obtuvieron siguientes espectros:

Gráfico No. 9-3. Espectro UV del compuesto número 2 con MetOH



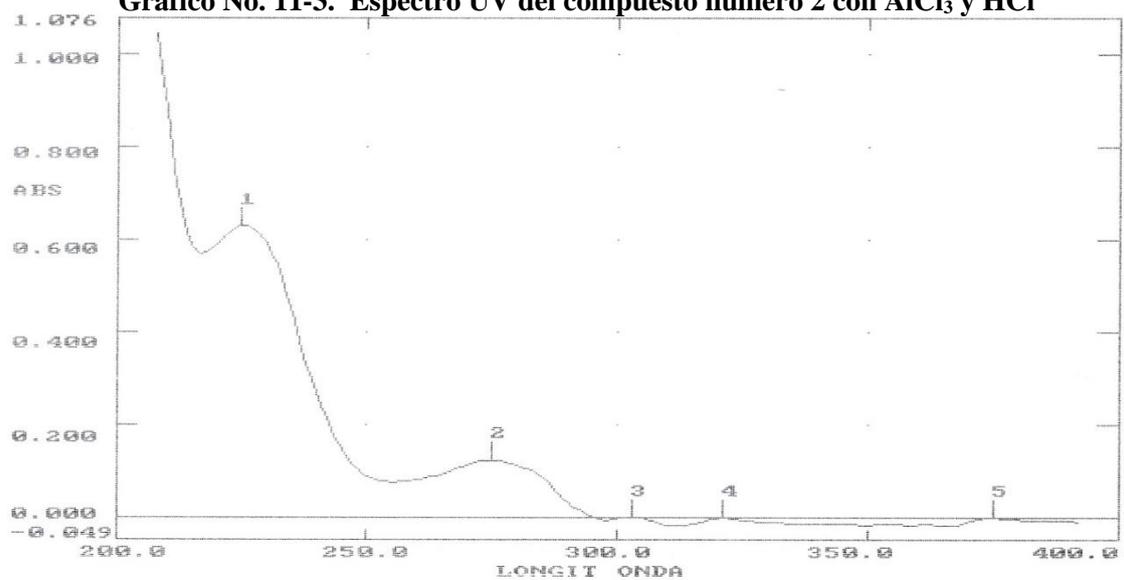
Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 10-3. Espectro UV del compuesto número 2 con NaOMe



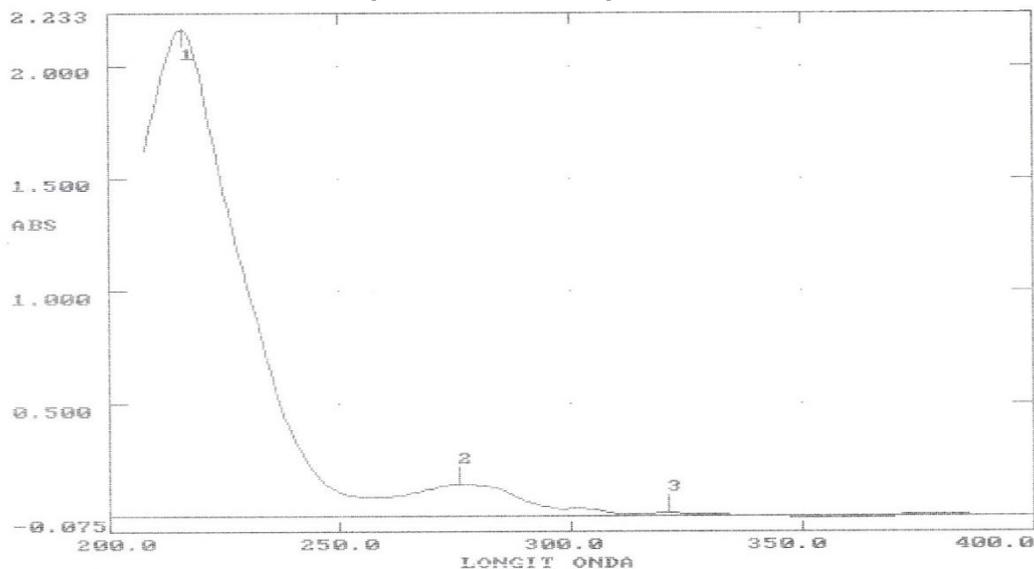
Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 11-3. Espectro UV del compuesto número 2 con AlCl₃ y HCl



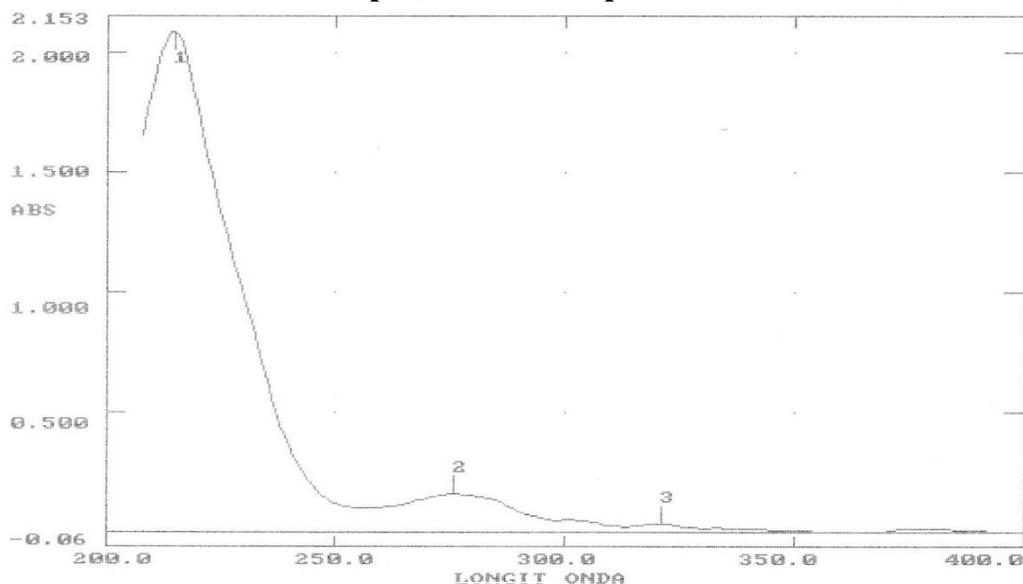
Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 12-3. Espectro UV del compuesto número 2 con NaOAc



Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 13-3. Espectro UV del compuesto número 2 con H₃BO₃

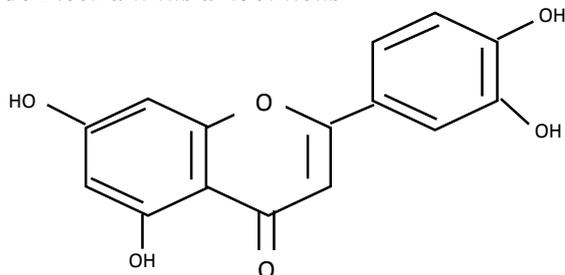


Realizado por: Francisco Vélez C.

En los espectros se puede prestar especial atención en los picos de absorción de la banda I (321 nm) y de la banda II (277 nm), lo cual nos lleva a estimar la presencia de una flavona, con la aplicación de los reactivos de desplazamiento se producen los siguientes cambios: con NaOMe se produce un desplazamiento batocrómico de la banda I hasta los 333 nm, con AlCl₃ y HCl existe un movimiento batocrómico de la banda I a 375 nm, con NaOAc no se observa desplazamientos, igualmente con el H₃BO₃, estos desplazamientos llevan a cavilar en la presencia de una flavona con hidroxilación en posición orto en el anillo, e hidroxilación en el carbono 4, 5 y 7 de anillo B y A, respectivamente. Por lo cual se puede especular que la estructura del compuesto podría proponerse como la siguiente, la cual coincide con bibliografía

como la taxifolina (Martínez, A. 2005 p.10). En estudios realizados se ha identificado la luteolina en esta planta. (Menéndez, R. 1999 p.8).

Figura No.2-3. Posible estructura del compuesto 2 extraído del extracto de *Plectranthus amboinicus*

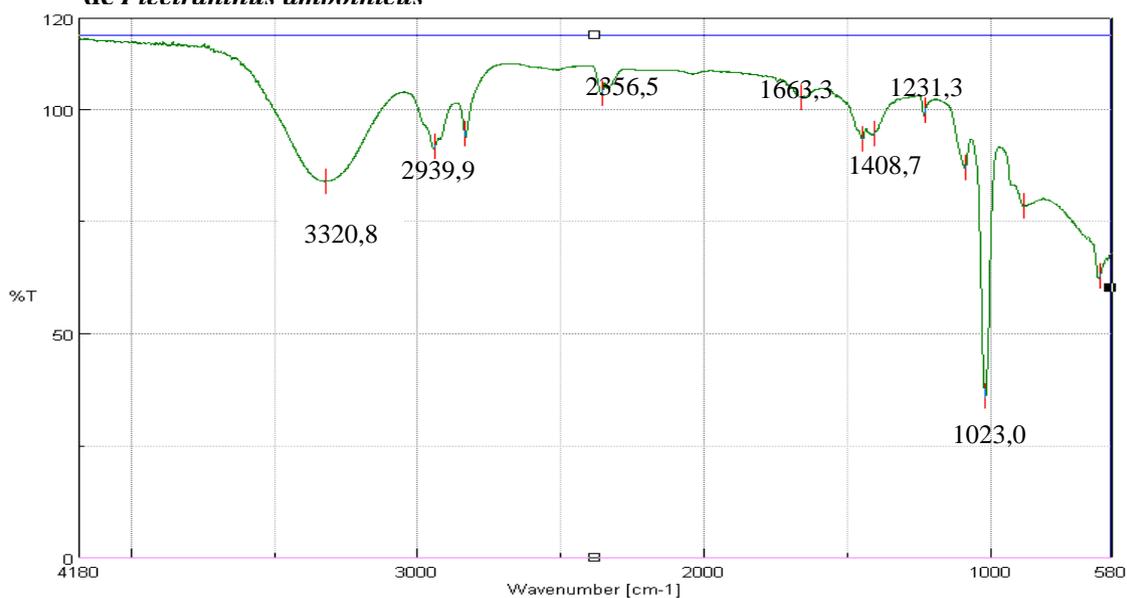


Realizado por: Francisco Vélez C., 2015.

3.5.1.3. Compuesto 3

El compuesto 3 se observó como cristales translúcidos en forma de aguja, poco soluble en metanol, se analizó por espectroscopia IR, obteniéndose los siguientes picos: a $\approx 3320,82 \text{ cm}^{-1}$ correspondientes a una vibración por tensión del grupo O-H, $2939,97 \text{ cm}^{-1}$, vibración por tensión del grupo C-H₃ libre. Existe una vibración de tensión del C-H del anillo bencénico en los $2356,59 \text{ cm}^{-1}$. Tenemos una vibración de tensión en $\approx 1663,3 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al grupo C=C, y un pico de $1408,75 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la vibración de tensión del anillo aromático; en la región de la huella dactilar encontramos una vibración de tensión del grupo C-O a los $1231,33 \text{ cm}^{-1}$ característica de los flavonoides, y una vibración de deformación del grupo C-H libre, a los $1023,05^{-1}$. (Hesse M, et al, 1997 p. 60)

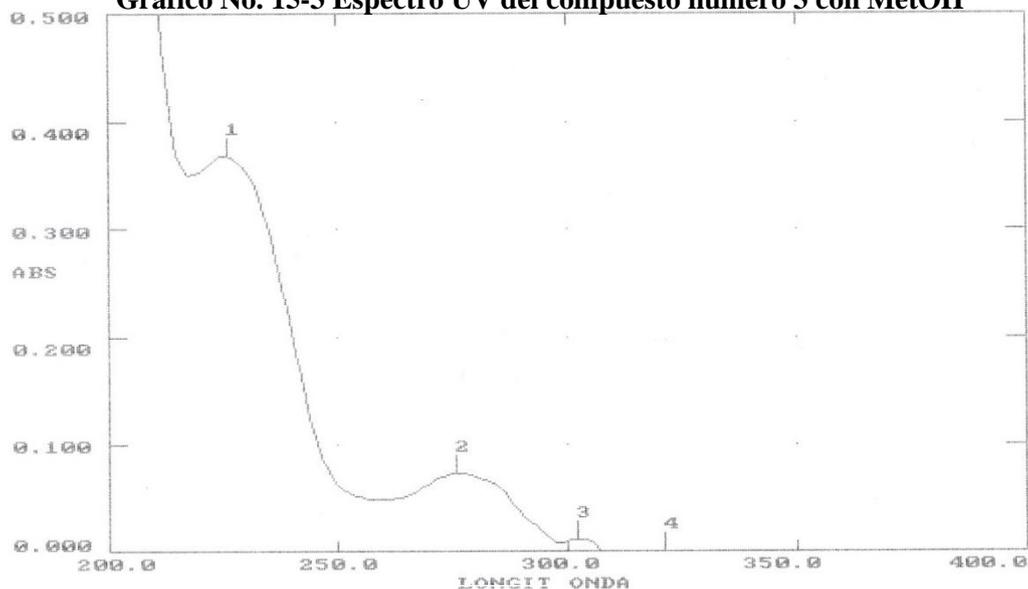
Gráfico No. 14-3. Espectro IR del compuesto número 3 obtenido del extracto de *Plectranthus amboinicus*



Realizado por: Francisco Vélez C.

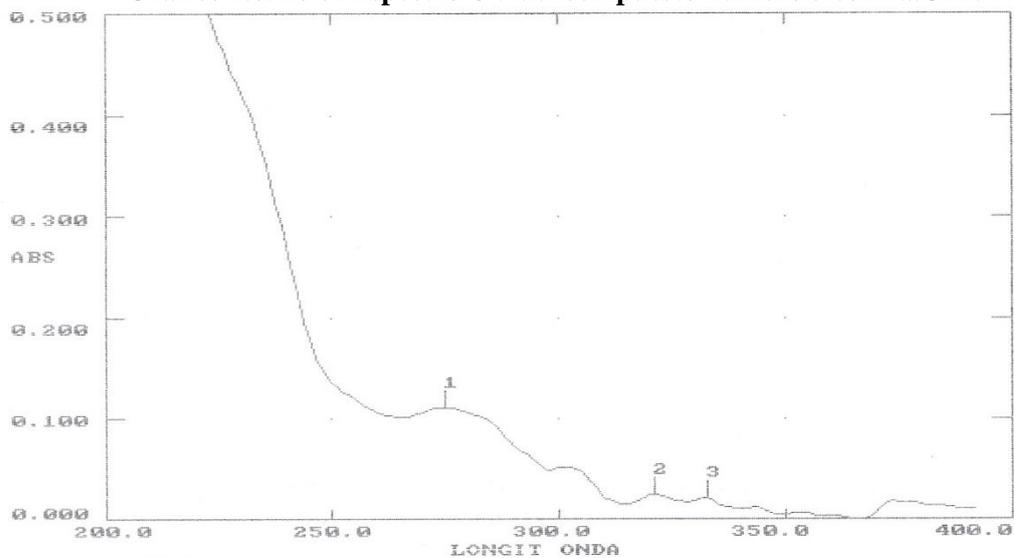
Posteriormente se procedió a analizar las muestras en el espectrofotómetro UV Helios β , utilizando el barrido inteligente a las longitudes de onda de 200 a 400 nm. Utilizando reactivos de desplazamiento se obtuvieron siguientes espectros:

Gráfico No. 15-3 Espectro UV del compuesto número 3 con MetOH



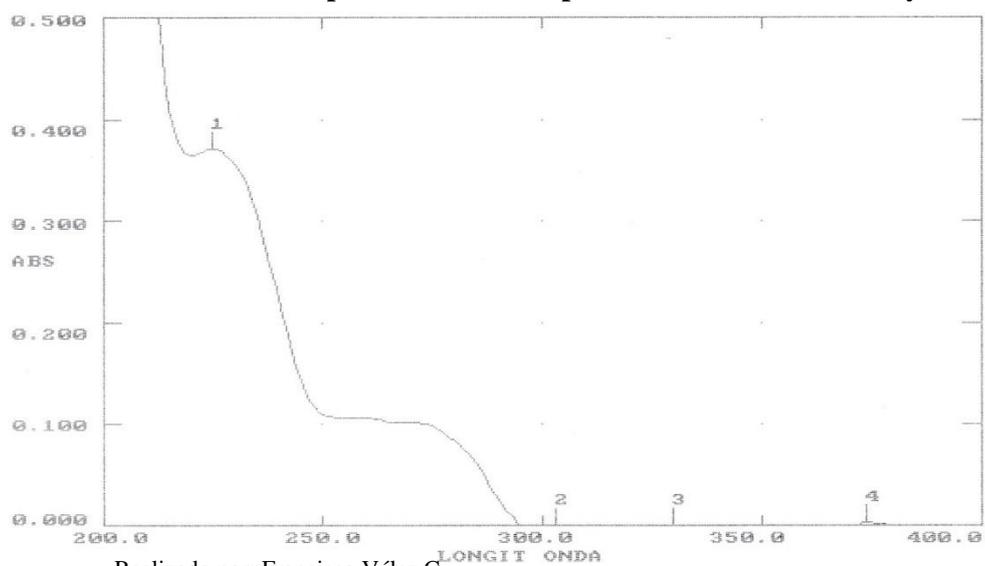
Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 16-3. Espectro UV del compuesto número 3 con NaOMe



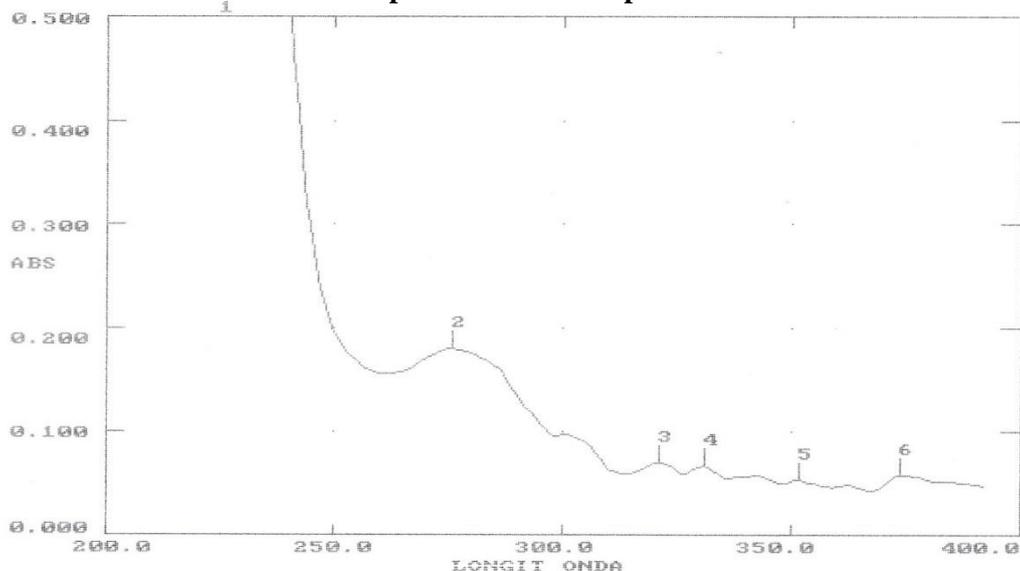
Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 17-3. Espectro UV del compuesto número 3 con AlCl₃ y HCl



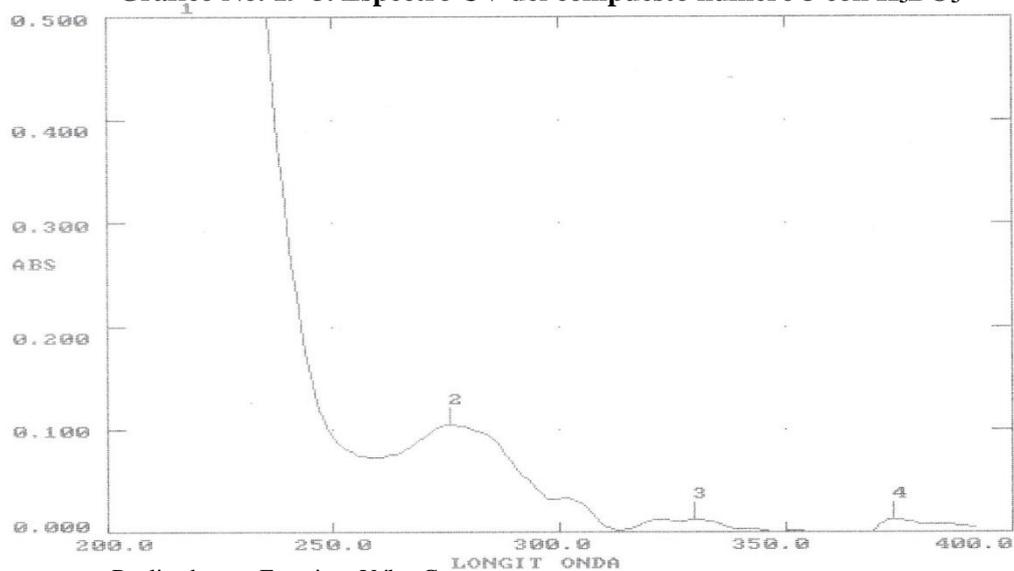
Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 18-3. Espectro UV del compuesto número 3 con NaOAc



Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 19-3. Espectro UV del compuesto número 3 con H₃BO₃



Realizado por: Francisco Vélez C.

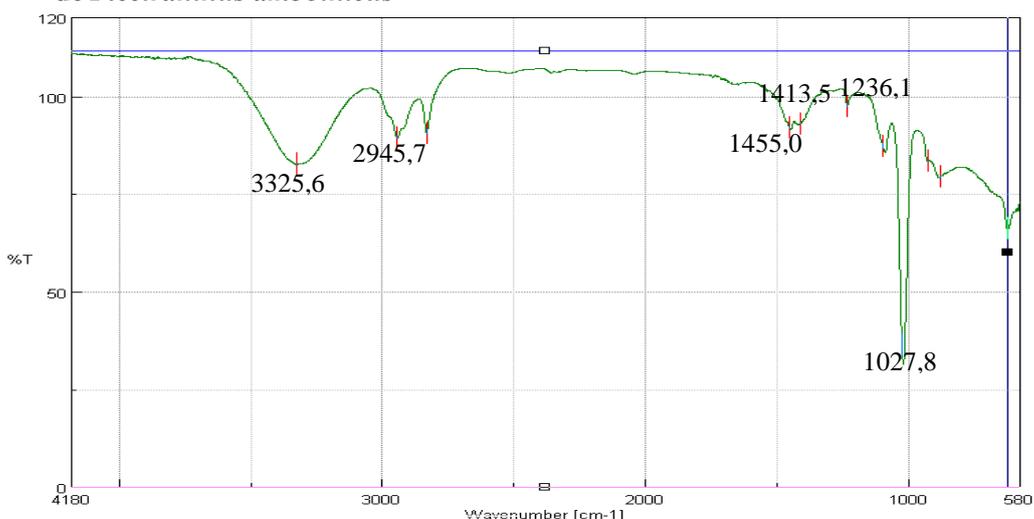
En los espectros presentados se puede observar la presencia de la absorción de la banda I (302 nm), y de la banda II (276 nm), rangos de absorción característicos de los flavonoides, en este caso pueden presentar estos rangos las flavonas y los flavonoles. Luego con la utilización de reactivos de desplazamiento se observan las siguientes variantes: con NaOMe no existen desplazamientos por lo cual no nos proporciona información correcta sobre la estructura del flavonoide, con H₃BO₃ hubo una variación batocrómica en la banda I por lo cual se puede demostrar que hay una dihidroxilación en posición orto en el anillo B de la estructura, y con AlCl₃/HCl se puede estimar una hidroxilación en el carbono 3. Debido a la falta de información

que nos proporcionan los reactivos de desplazamiento para este caso es difícil elucidar la estructura específica de este compuesto, sin embargo, se puede presumir la presencia de una flavona o un flavonol, con hidroxilaciones en el anillo B y en el carbono 3. (Martínez, A. 2005 p.8).

3.5.1.4. Compuesto 4

El compuesto 4 se obtuvo como una sustancia amorfa, color blanco, soluble en metanol, se analizó por espectroscopia IR, obteniéndose los siguientes picos: a $\approx 3325,64 \text{ cm}^{-1}$ correspondientes a una vibración por tensión del grupo O-H, $2945,73 \text{ cm}^{-1}$, vibración por tensión del grupo C-H₃ libre. Tenemos una vibración de tensión en $\approx 1455,03 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al grupo C=C, y un pico de $1413,57 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la vibración de tensión del anillo aromático; en la región de la huella dactilar encontramos una vibración de tensión del grupo C-O a los $1236,15 \text{ cm}^{-1}$ característica de los flavonoides, y una vibración de deformación del grupo C-H libre, a los $1027,87 \text{ cm}^{-1}$. (Hesse M, et al, 1997 p. 60)

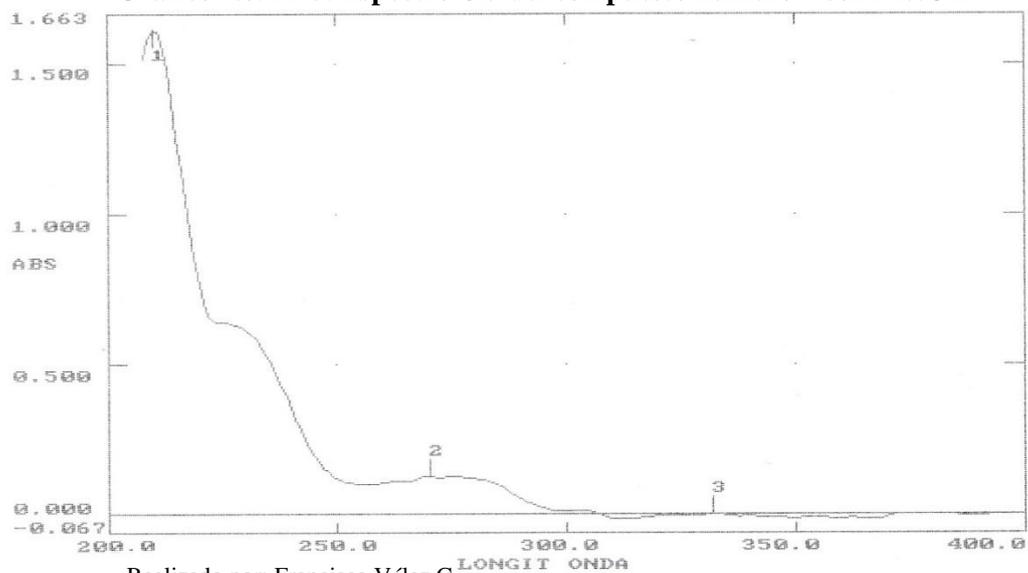
Gráfico No. 20-3. Espectro IR del compuesto número 4 obtenido del extracto de *Plectranthus amboinicus*



Realizado por: Francisco Vélez C.

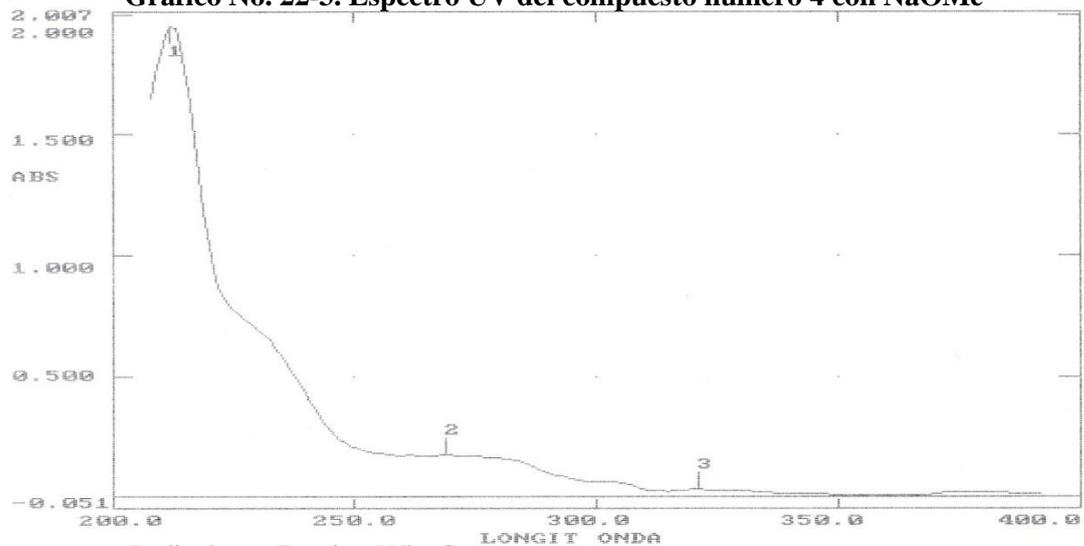
Para realizar el análisis UV, se utilizó el espectrofotómetro Heλios β, del laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, las muestras fueron leídas mediante barrido de 200 a 400 nm de longitud de onda. Además se utilizaron reactivos de desplazamiento para observar los movimientos del compuesto. Los espectros obtenidos fueron los siguientes:

Gráfico No. 21-3. Espectro UV del compuesto número 4 con MetOH



Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 22-3. Espectro UV del compuesto número 4 con NaOMe



Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 23-3. Espectro UV del compuesto número 4 con AlCl₃ y HCl

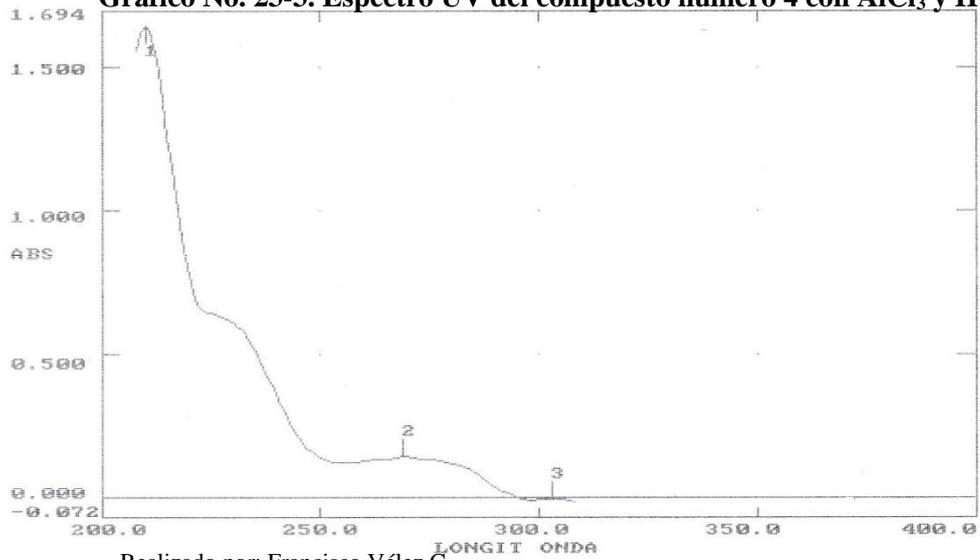


Gráfico No. 24-3. Espectro UV del compuesto número 4 con NaOAc

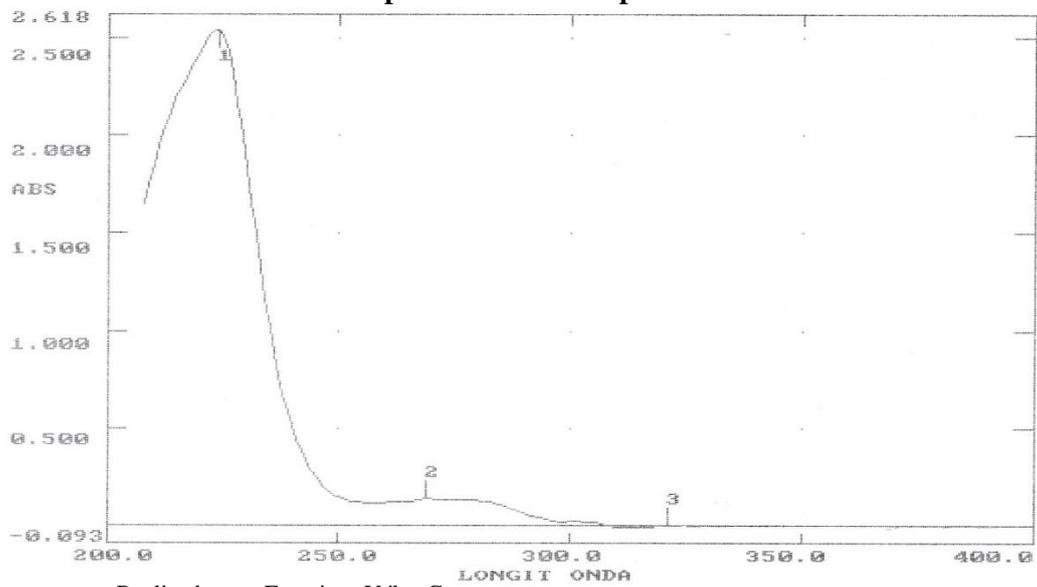
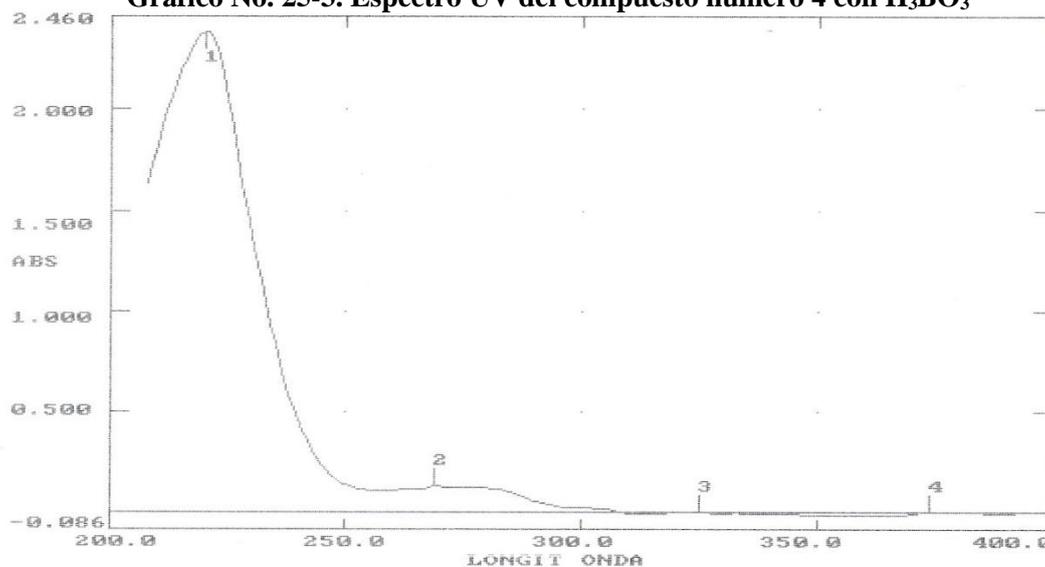


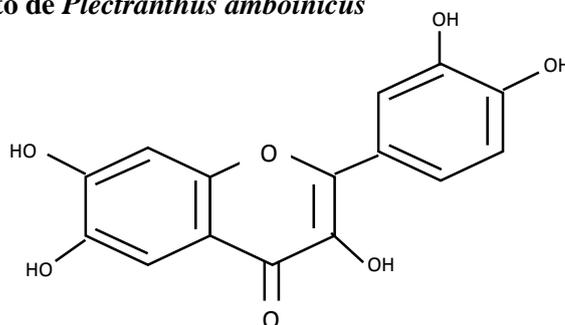
Gráfico No. 25-3. Espectro UV del compuesto número 4 con H₃BO₃



Realizado por: Francisco Vélez C.

En los espectros analizados se visualiza la presencia de las dos bandas características de los flavonoides, la banda I absorbió a una longitud de onda de 332 nm, mientras que la banda II fue en 270 nm, además estos rangos de absorción nos permiten manifestar la presencia de un flavonol con sustitución en el carbono 3. Al utilizar los reactivos de desplazamiento se obtienen las absorciones a las siguientes longitudes de onda: NaOMe (321 nm), con el AlCl₃ y HCl (303 nm), utilizando NaOAc (322 nm), y con H₃BO₃ (325 nm). Al observar la descomposición de espectro al agregar NaOMe se puede determinar que el flavonol posee dos hidroxilaciones en los carbonos 3 y 4, también con los demás reactivos se estiman hidroxilaciones en el carbono 7, y en posiciones orto en el anillo A. (Martínez, A. 2005 p.10). La posible estructura del compuesto es la presentada a continuación:

Figura No.3-3. Posible estructura del compuesto 4 extraído del extracto de *Plectranthus amboinicus*

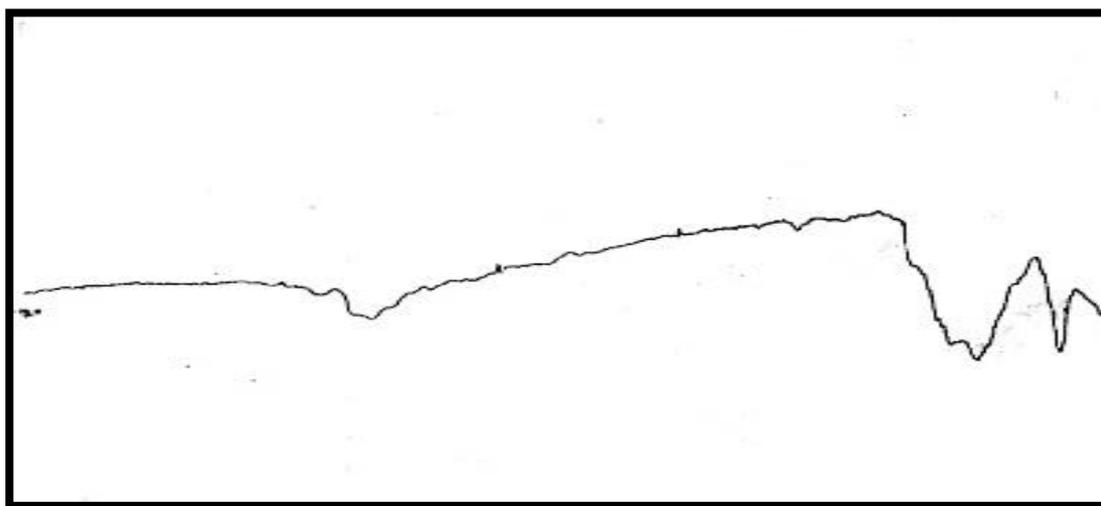
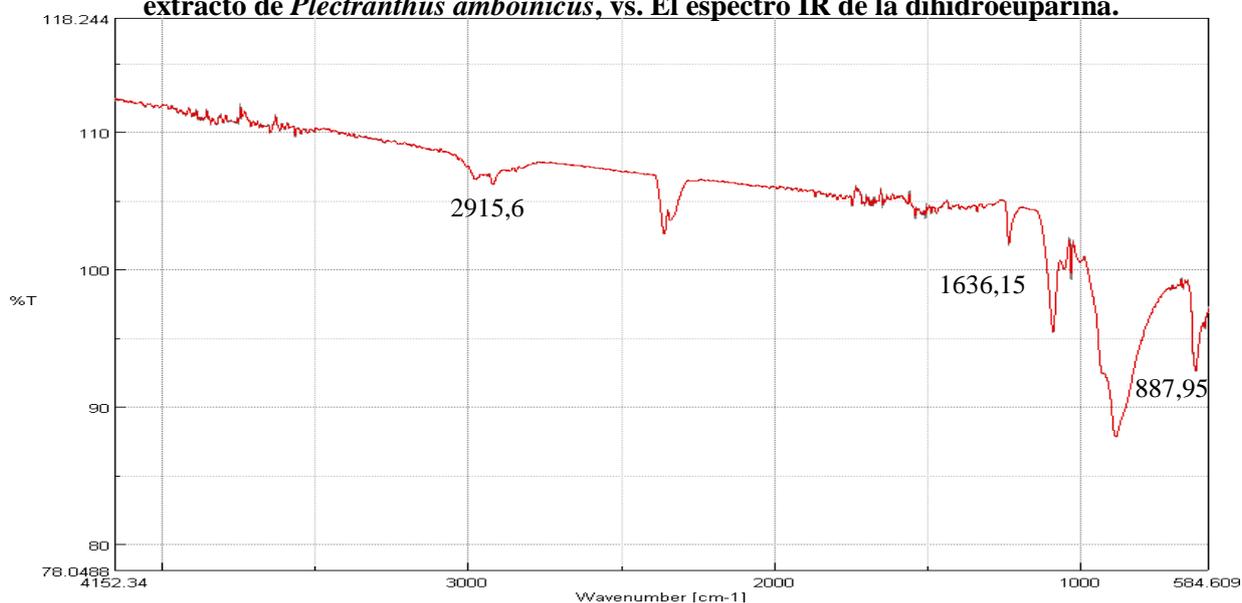


Realizado por: Francisco Vélez C.

3.5.1.5. Compuesto 5

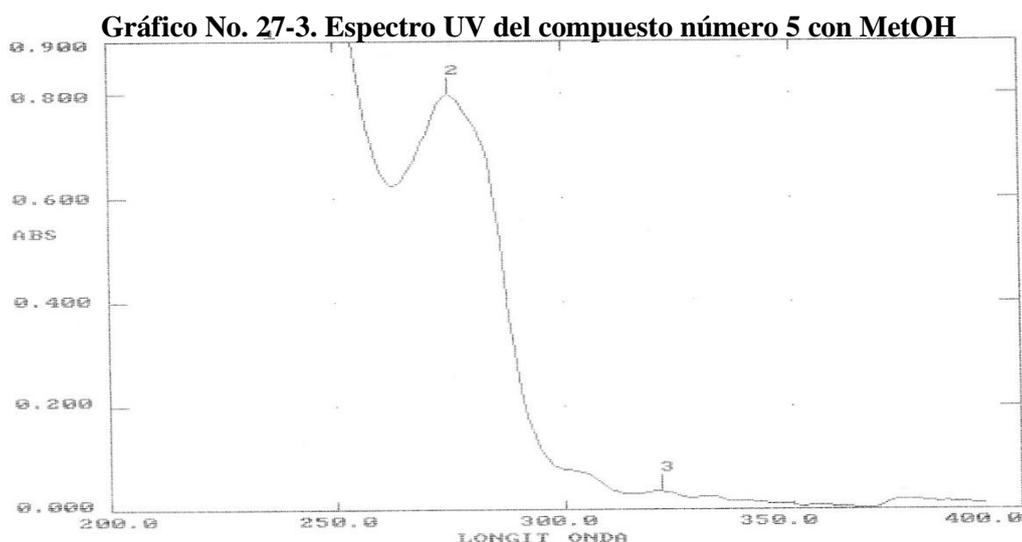
El compuesto 5 se obtuvo como una sustancia amorfa, color amarillo pálido, soluble en metanol, se analizó por espectroscopia IR, obteniéndose los siguientes picos: existe una vibración en $2915,6\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a vibración por tensión del grupo O-H, a $1636,15\text{ cm}^{-1}$ una vibración del grupo cetona, característico de los benzofuranos, y finalmente en la zona de la huella dactilar a los $887,95\text{ cm}^{-1}$ aproximadamente correspondiente al grupo C-H. Este espectro se sobrepone en ciertos picos con el espectro IR de la dihidroeparina obtenido de bibliografía. (Lock, O, 1994 p.176).

Gráfico No. 26-3. Comparación del espectro IR del compuesto número 5 obtenido del extracto de *Plectranthus amboinicus*, vs. El espectro IR de la dihidroeparina.



Realizado por: Francisco Vélez C.

El análisis de espectroscopia UV, se realizó utilizando el equipo Heλios β, mediante el cual se realizó un barrido entre las longitudes de onda de 200 a 400 nm, además se utilizó reactivos de desplazamiento. Las bandas de absorción, se presentaron en tres picos a 235, 275 y 321 nm respectivamente. Con la utilización de reactivos no existió desplazamiento alguno con lo cual se determinó que no el compuesto no era un flavonoide, sino otro tipo de compuesto fenólico. Es espectro que se obtuvo fue el siguiente:



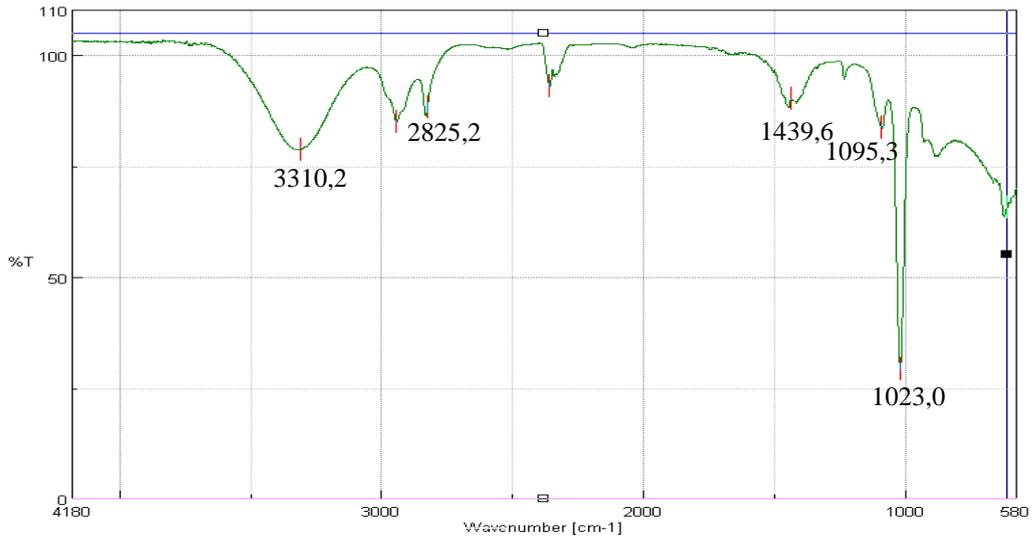
Realizado por: Francisco Vélez C.

3.5.2. Análisis espectroscópico de los compuestos separados de la (*Justicia chlorostachya*)

3.5.2.1. Compuesto 1

El compuesto 1 se obtuvo como cristales translúcidos, soluble en metanol, se analizó por espectroscopia IR, obteniéndose los siguientes picos: a $\approx 3310,21 \text{ cm}^{-1}$ correspondientes a una vibración por tensión del grupo O-H, $2825,2 \text{ cm}^{-1}$, vibración por tensión del grupo C-H₃ libre. Tenemos una vibración de tensión en $\approx 1439,6 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al grupo C=C, y un pico de $1095,37 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la vibración de tensión del grupo C-O característico de los flavonoides; en la región de la huella dactilar encontramos una vibración de deformación del grupo C-H libre, a los $1023,05 \text{ cm}^{-1}$. (Hesse M, et al, 1997 p. 60)

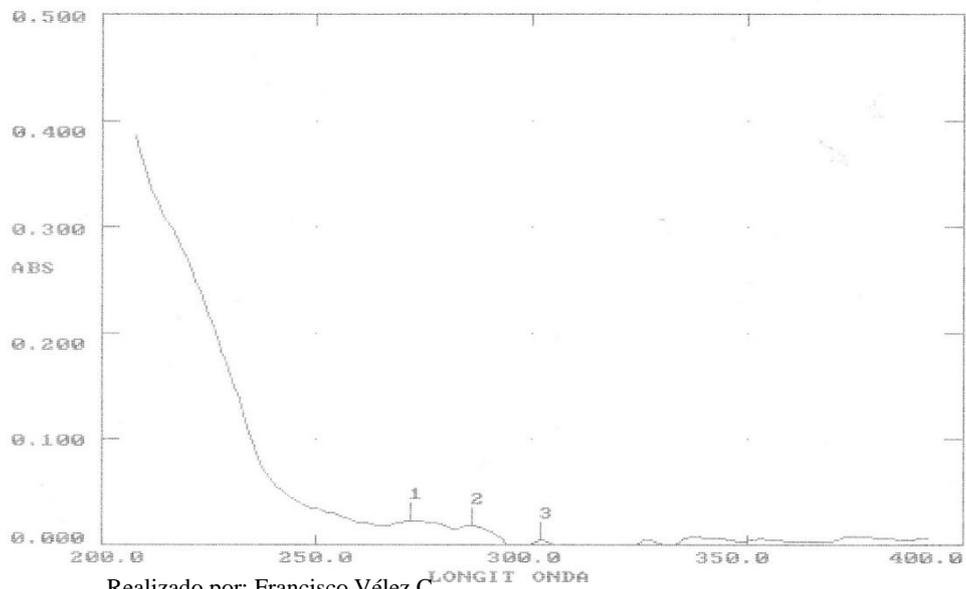
Gráfico No. 28-3. Espectro IR del compuesto número 1 obtenido del extracto de *Justicia chlorostachya*



Realizado por: Francisco Vélez C.

El análisis espectroscópico ultravioleta se realizó en el espectrofotómetro Helios β, en barrido a una longitud de onda de 200 a 400 nm. Utilizando reactivos de desplazamiento se obtuvieron siguientes espectros:

Gráfico No. 29-3. Espectro UV del compuesto número 1 con MetOH



Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 30-3. Espectro UV del compuesto número 1 con NaOMe

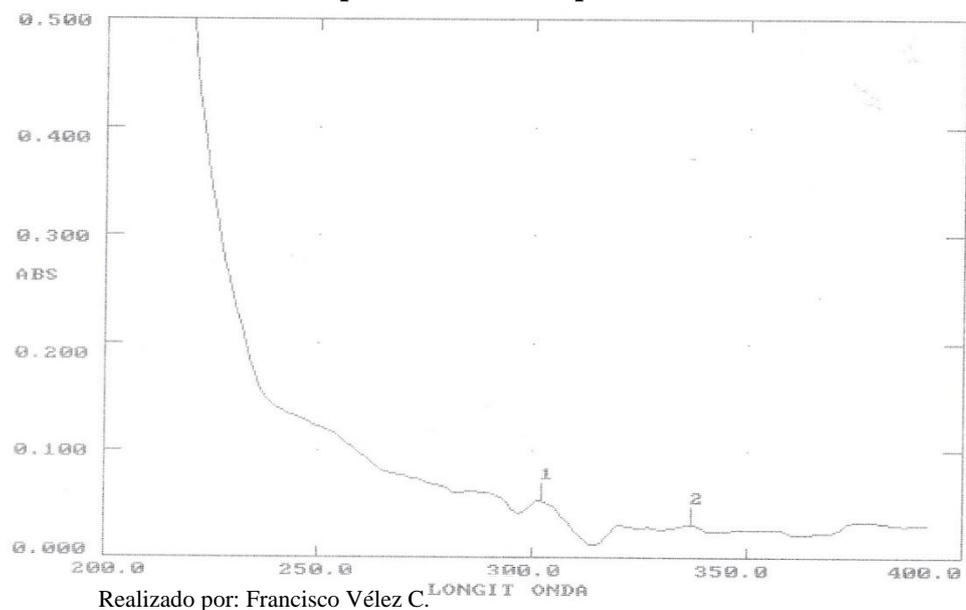


Gráfico No. 31-3. Espectro UV del compuesto número 1 con AlCl3 y HCl

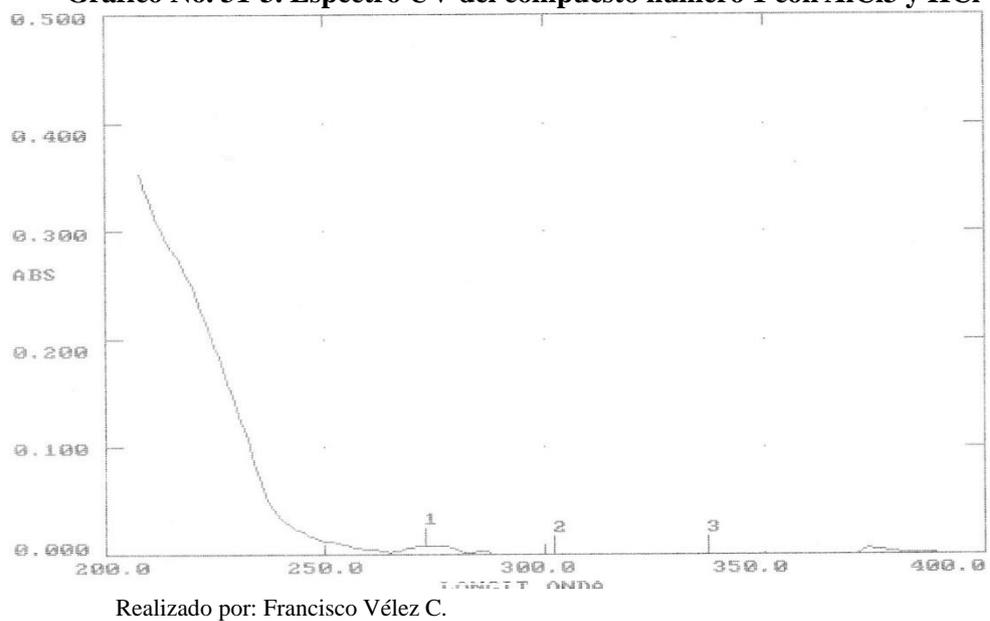
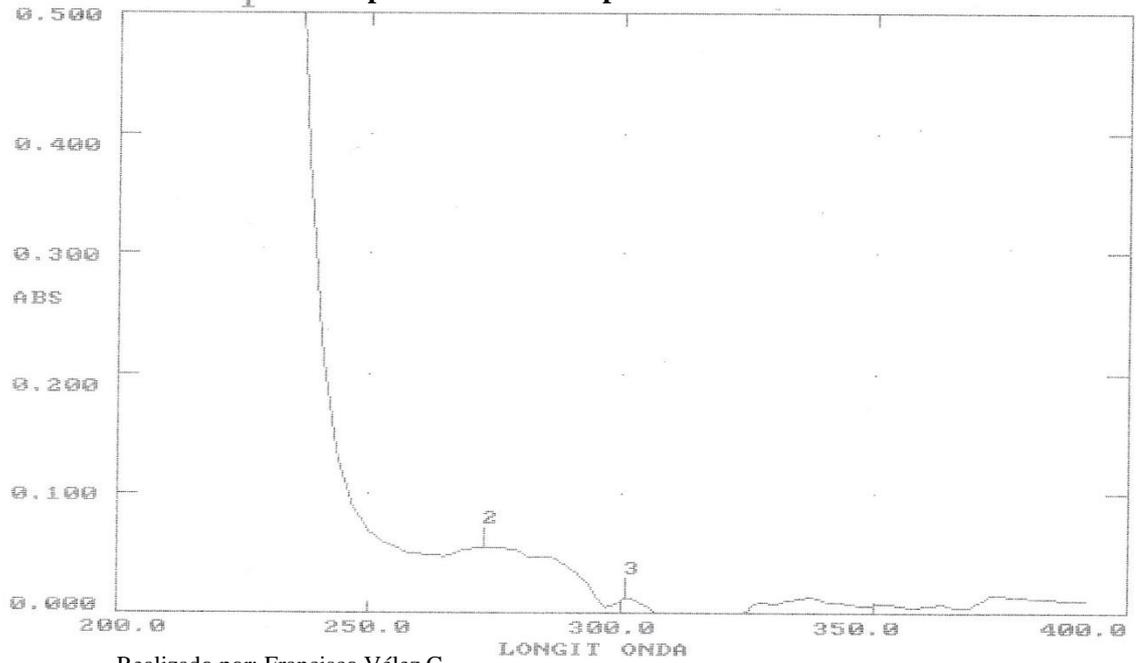
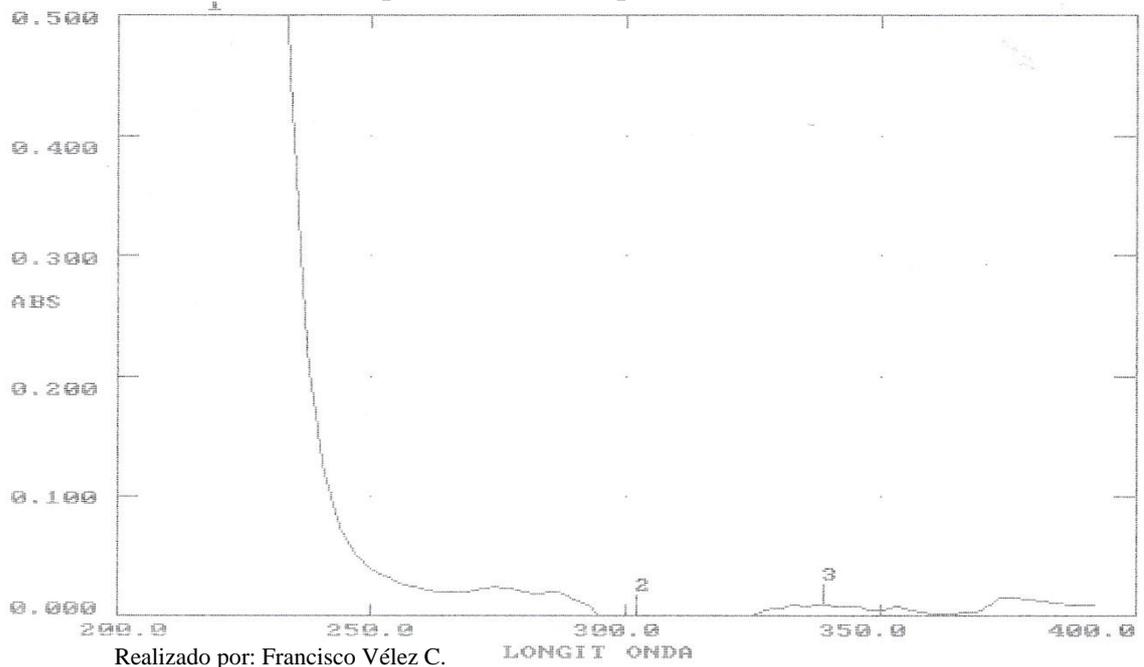


Gráfico No. 32-3. Espectro UV del compuesto número 1 con NaOAc



Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 33-3. Espectro UV del compuesto número 1 con H₃BO₃



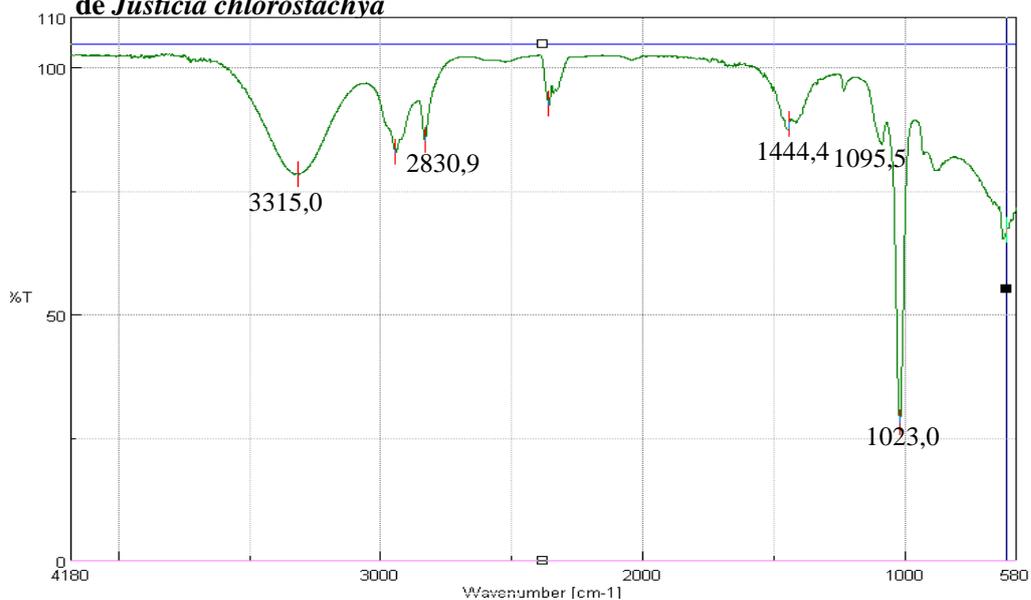
Realizado por: Francisco Vélez C.

En los espectros presentados se puede observar la presencia de la absorción de la banda I (302 nm), y de la banda II (266 nm), en este caso pueden presentar estos rangos las flavonas y los flavonoles. Luego con la utilización de reactivos de desplazamiento se observan las siguientes variantes: con NaOMe existe un desplazamiento de la banda I a los 339 nm lo cual nos indica que puede existir una flavona-4- hidroxilada, o un flavonol-3-sustituido, con H₃BO₃ hubo una variación batocrómica en la banda I por lo cual se puede demostrar que hay una dihidroxilación en posición orto en el anillo B de la estructura, y con AlCl₃/HCl se puede estimar una hidroxilación en el carbono 5. Debido a la falta de información que nos proporcionan los reactivos de desplazamiento para este caso es dificultoso elucidar la estructura específica de este compuesto, sin embargo, se puede presumir la presencia de una flavona o un flavonol, con hidroxilaciones en el anillo B y en el carbono 5 y 7. (Martínez, A. 2005 p.9).

3.5.2.2. *Compuesto 2*

El compuesto 2 se obtuvo como cristales amarillo con forma de aguja, poco solubles en metanol, se analizó por espectroscopia IR, obteniéndose los siguientes picos: a $\approx 3315,03 \text{ cm}^{-1}$ correspondientes a una vibración por tensión del grupo O-H, $2830,99 \text{ cm}^{-1}$, vibración por tensión del grupo C-H₃ libre. Tenemos una vibración de tensión en $\approx 1444,42 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al grupo C=C del anillo aromático, y un pico de $1095,57 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la vibración de tensión del grupo C-O característico de los flavonoides; en la región de la huella dactilar encontramos una vibración de deformación del grupo C-H libre, a los $1023,05 \text{ cm}^{-1}$. (Hesse M, et al, 1997 p. 60)

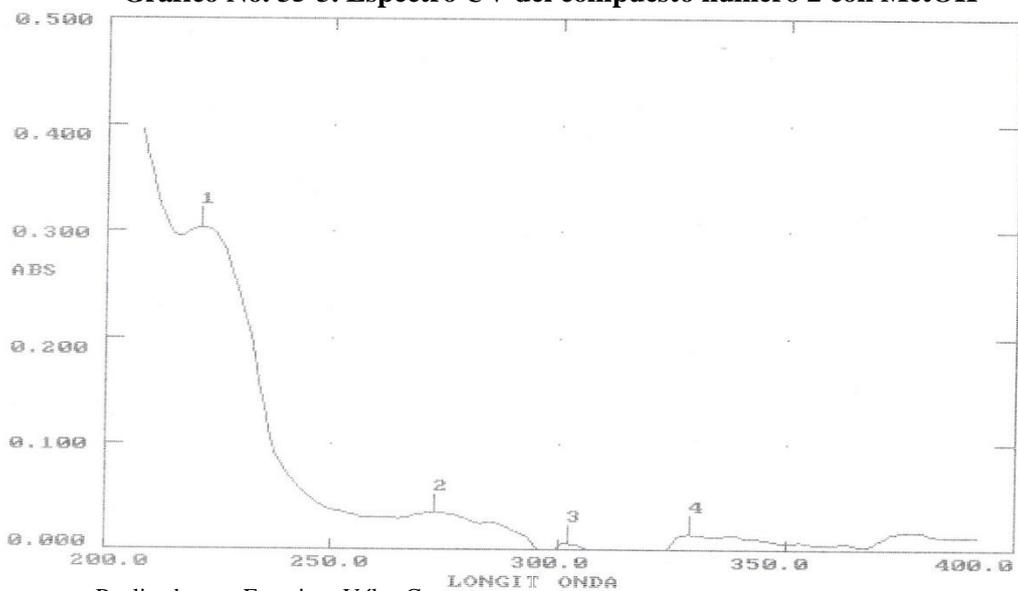
Gráfico No. 34-3. Espectro IR del compuesto número 2 obtenido del extracto de *Justicia chlorostachya*



Realizado por: Francisco Vélez C.

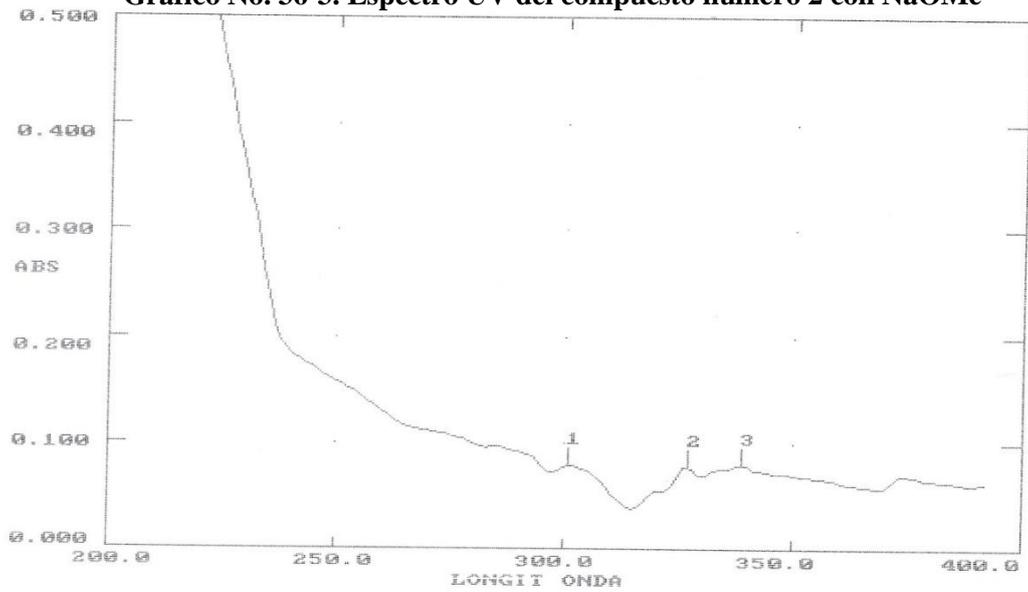
Posteriormente se procedió a realizar el análisis en el UV utilizando el espectrofotómetro Helios β , en barrido a una longitud de onda de 200 a 400 nm. Utilizando reactivos de desplazamiento se obtuvieron siguientes espectros:

Gráfico No. 35-3. Espectro UV del compuesto número 2 con MetOH



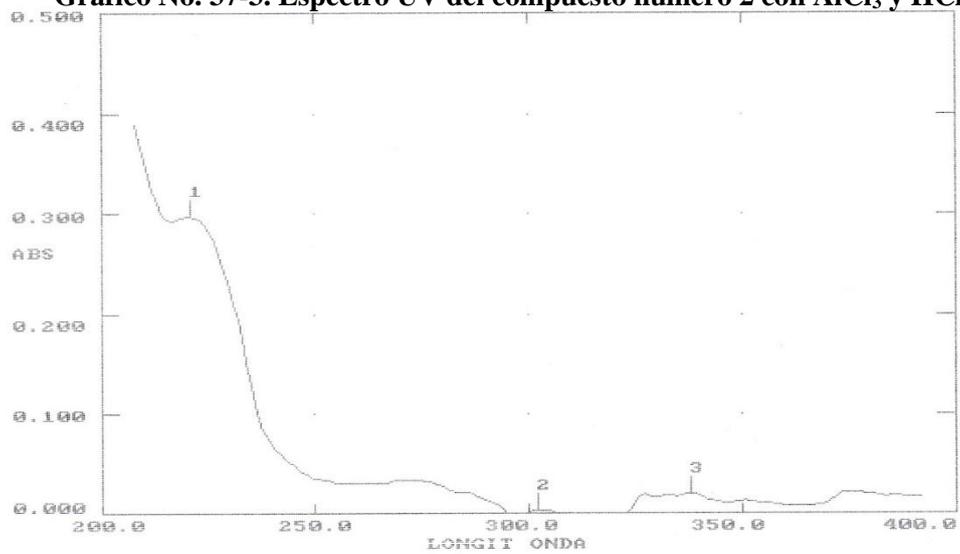
Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 36-3. Espectro UV del compuesto número 2 con NaOMe



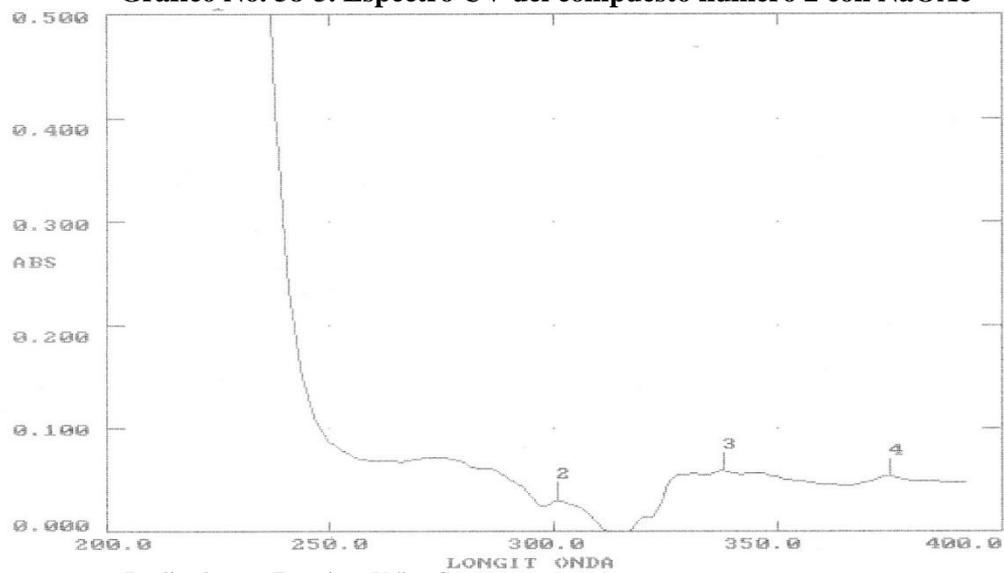
Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 37-3. Espectro UV del compuesto número 2 con AlCl₃ y HCl



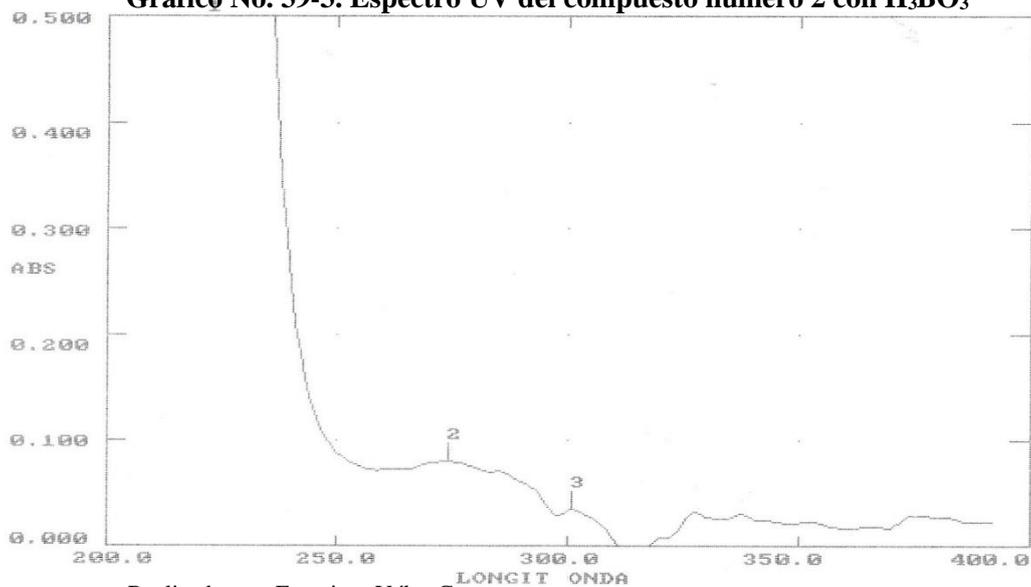
Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 38-3. Espectro UV del compuesto número 2 con NaOAc



Realizado por: Francisco Vélez C.

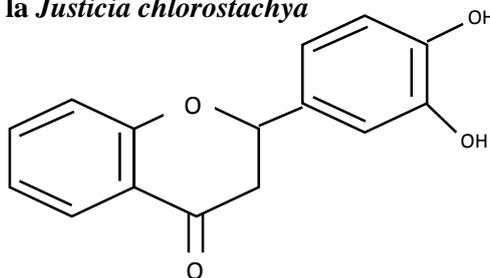
Gráfico No. 39-3. Espectro UV del compuesto número 2 con H₃BO₃



Realizado por: Francisco Vélez C.

En los espectros se puede observar las bandas de absorción, la banda I absorbió a los 302 nm, mientras que la banda II absorbió a los 273 nm, con estas absorciones se puede pensar en la presencia de un compuesto de tipo flavónico, especialmente un flavonol, o una flavona. Al agregar los diferentes reactivos de desplazamiento se observan los siguientes movimientos: con NaOMe, la banda I se desplaza a los 338 nm, con lo cual se puede sugerir que es un compuesto con sustitución en el carbono 3. Con NaOAc, se produce un desplazamiento a 327 nm, lo cual nos indica la presencia de una flavanona, con el H_3BO_3 se produce un desplazamiento a 338 nm característico de una flavanona orto hidroxilada en el anillo B de la estructura base. De modo que la posible estructura de este compuesto es la siguiente. (Martínez, A. 2005 p.9).

Figura No.4-3. Posible estructura del compuesto 2 extraído del extracto de la *Justicia chlorostachya*

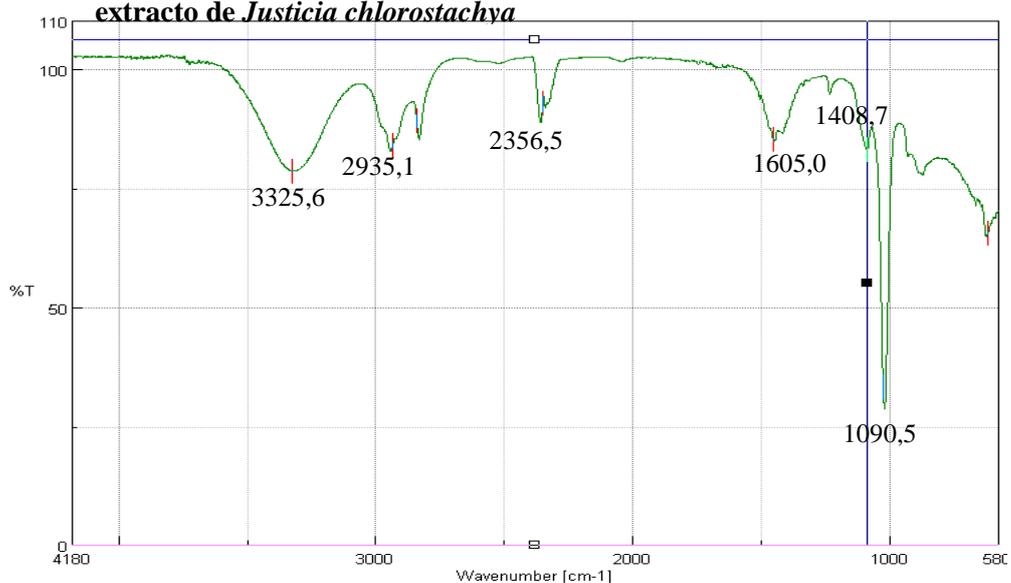


Realizado por: Francisco Vélez C.

3.5.2.3. Compuesto 3

El compuesto 3 se observó como cristales translúcidos en, soluble en metanol, se analizó por espectroscopia IR, obteniéndose los siguientes picos: a $\approx 3325,64\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a una vibración por tensión del grupo O-H; $2935,13\text{ cm}^{-1}$, vibración por tensión del grupo C-H₃ libre. Existe una vibración de tensión del C-H del anillo bencénico en los $2356,59\text{ cm}^{-1}$. Tenemos una vibración de tensión en $\approx 1605,03\text{ cm}^{-1}$ correspondiente al grupo C=C, y un pico de $1408,75\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la vibración de tensión del anillo aromático; en la región de la huella dactilar encontramos una vibración de tensión del grupo C-O a los $1090,55\text{ cm}^{-1}$ característica de los flavonoides. (Hesse M, et al, 1997 p. 60)

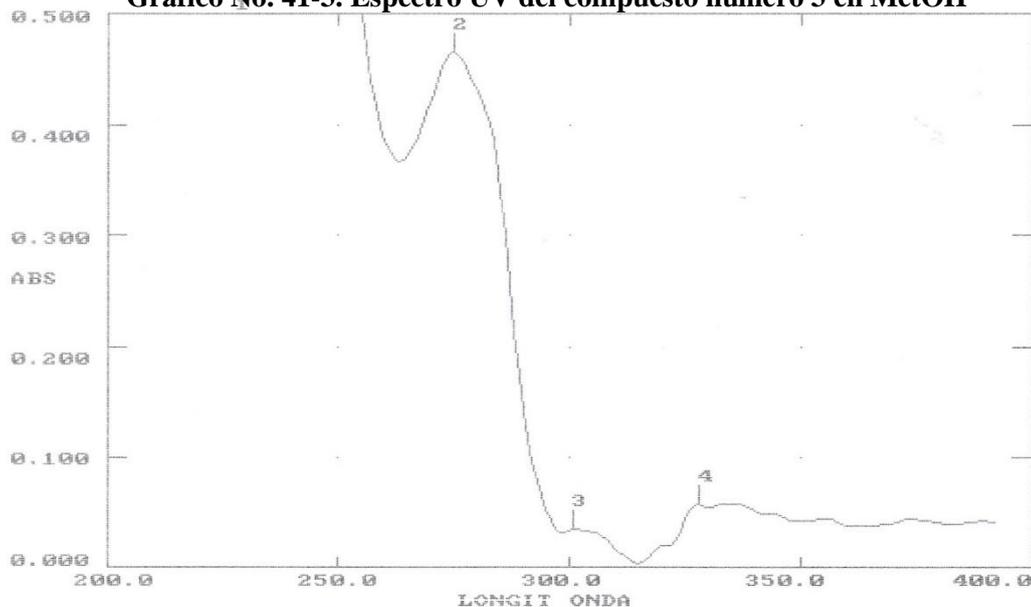
Gráfico No. 40-3. Espectro IR del compuesto número 3 obtenido del extracto de *Justicia chlorostachya*



Realizado por: Francisco Vélez C.

Posteriormente se procedió a analizar las muestras en el espectrofotómetro UV Helios β , utilizando el barrido inteligente a las longitudes de onda de 200 a 400 nm. Las bandas de absorción, se presentaron en tres picos 275, 301 y 327 nm respectivamente. Con la utilización de reactivos no existió desplazamiento alguno con lo cual se determinó que no el compuesto no era un flavonoide, sino otro tipo de compuesto fenólico. Es espectro que se obtuvo fue el siguiente:

Gráfico No. 41-3. Espectro UV del compuesto número 3 en MetOH

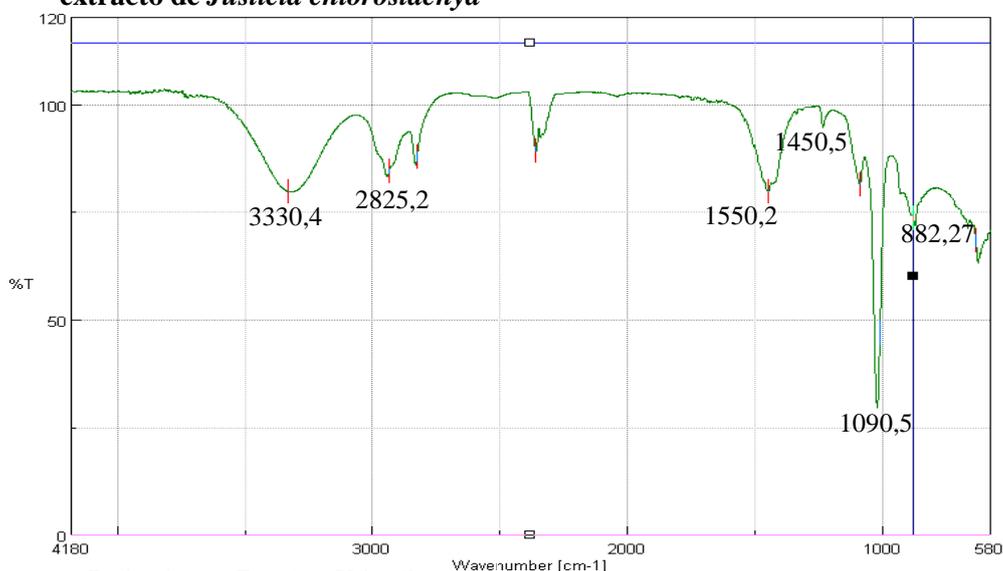


Realizado por: Francisco Vélez C.

3.5.2.4. Compuesto 4

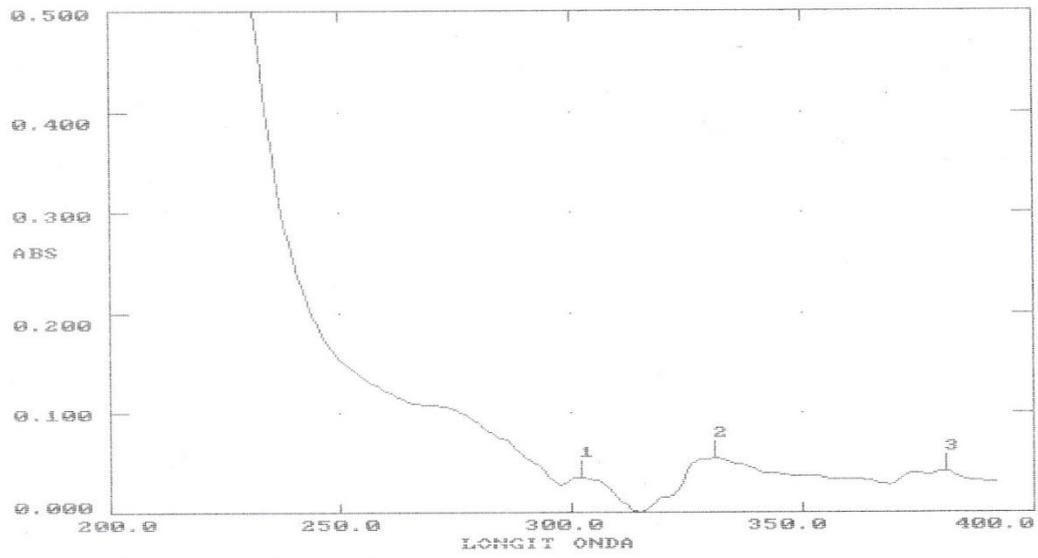
El compuesto 4 se obtuvo como un polvo blanco, soluble en metanol, se analizó por espectroscopia IR, obteniéndose los siguientes picos: a $\approx 3330,46 \text{ cm}^{-1}$ correspondientes a una vibración por tensión del grupo O-H; $2825,2 \text{ cm}^{-1}$, vibración por tensión del grupo C-H₃ libre. Tenemos una vibración de tensión en $\approx 1550,21 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al grupo C=C, y un pico de $1450,55 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la vibración de tensión del anillo aromático; en la región de la huella dactilar encontramos una vibración de tensión del grupo C-O a los $1090,55 \text{ cm}^{-1}$ característica de los flavonoides y una vibración a $882,27 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al C-H. (Hesse M, et al, 1997 p. 60).

Gráfico No. 42-3. Espectro IR del compuesto número 4 obtenido del extracto de *Justicia chlorostachya*



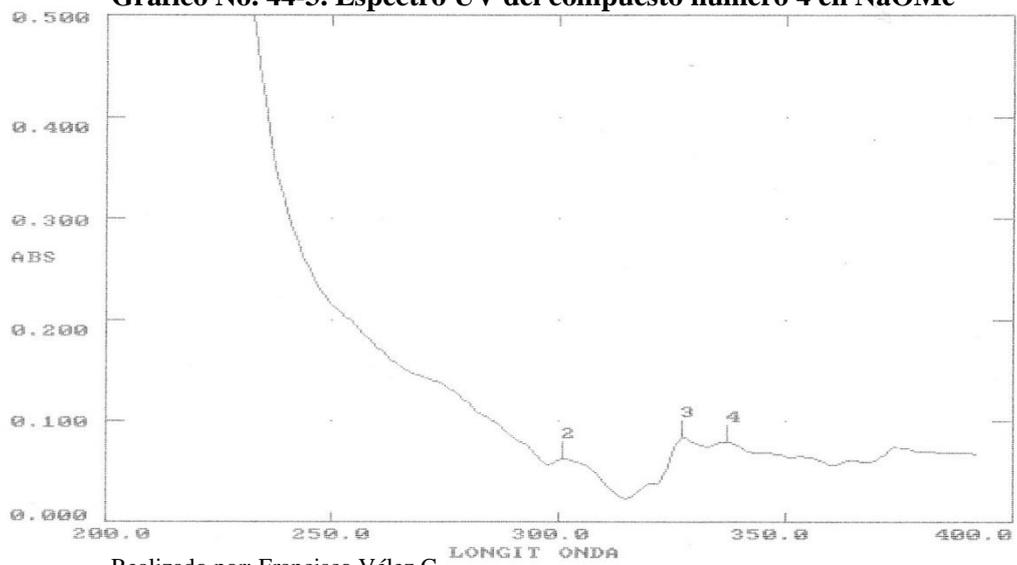
A continuación se procedió a analizar las muestras en el espectrofotómetro UV Helios β , utilizando el barrido inteligente a las longitudes de onda de 200 a 400 nm. Se utilizó reactivos de desplazamiento para analizar los movimientos causados por los grupos funcionales libres que puedan existir en la molécula, los espectros obtenidos se muestran a continuación:

Gráfico No. 43-3. Espectro UV del compuesto número 4 en MetOH



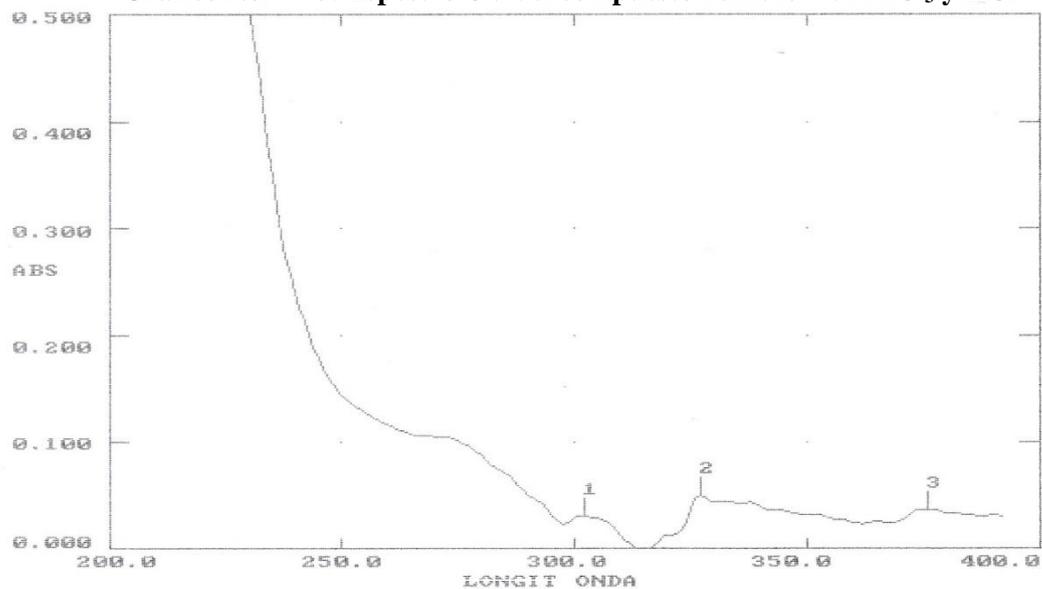
Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 44-3. Espectro UV del compuesto número 4 en NaOMe



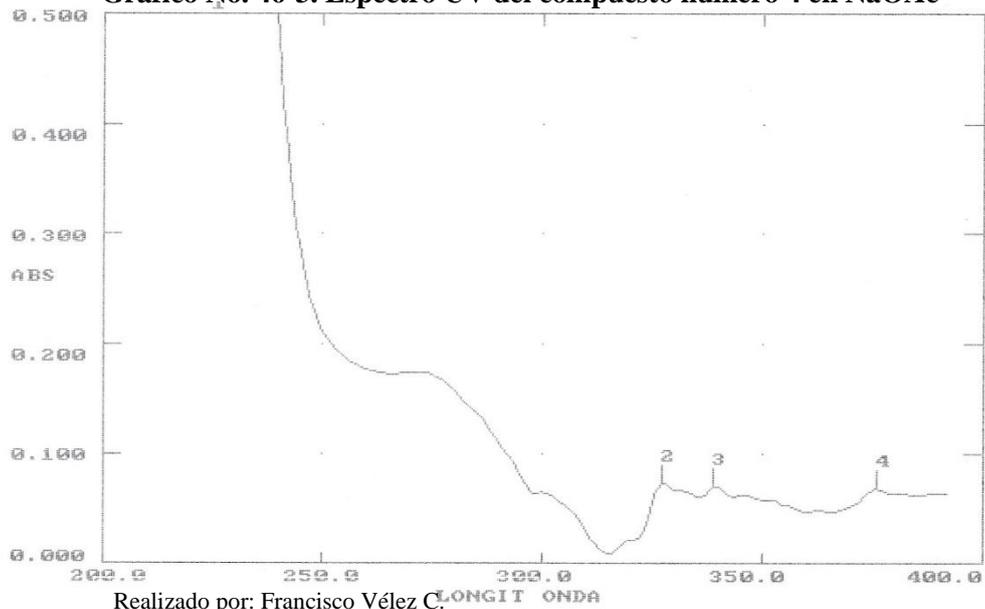
Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 45-3. Espectro UV del compuesto número 4 en AlCl_3 y HCl



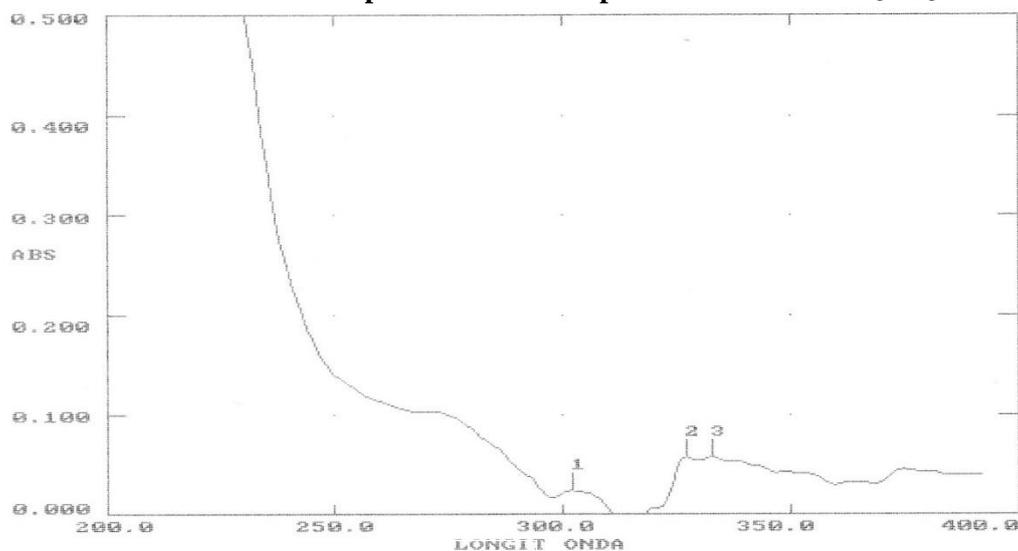
Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 46-3. Espectro UV del compuesto número 4 en NaOAc



Realizado por: Francisco Vélez C.

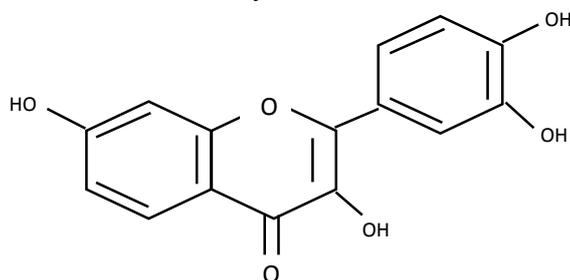
Gráfico No. 47-3. Espectro UV del compuesto número 4 en H₃BO₃



Realizado por: Francisco Vélez C.

En los espectros se puede observar las bandas de absorción, la banda I absorbió a los 381 nm, mientras que la banda II absorbió a los 331 nm, con estas absorciones se puede pensar en la presencia de un flavonol específicamente. Al agregar los diferentes reactivos de desplazamiento se observan los siguientes movimientos: con NaOMe, la banda I se desplaza a los 338 nm, con lo cual se puede sugerir que es un compuesto con sustitución en el carbono 3 y 4. Con NaOAc, se produce un desplazamiento a 376 nm, lo cual nos indica la presencia de un flavonol con una hidroxilación en el carbono 7, con el AlCl₃ se demuestra que el compuesto tiene un grupo hidroxilo en el carbono 5. De modo que la posible estructura de este compuesto es la siguiente. (Martínez, A. 2005 p.9).

Figura No 5-3. Posible estructura del compuesto 4 extraído del extracto de *Justicia chlorostachya*



Realizado por: Francisco Vélez C.

3.6. Lecturas de glicemias de los ratones

Se realizó la medición de la glucosa basal después de la inducción a diabetes de los animales, de este modo, se comprobó que todos los animales utilizados fueron diabéticos, se mantuvo un control al inicio, mitad y final del tratamiento para mantener los valores de glucosa elevados. Los valores normales de glucosa para los ratones van desde 60- 90 mg/dL, un valor mayor a 140 mg/dL se puede considerar como indicativo de que el animal es diabético. (Flores, C. 2006 p.10). A continuación, se observan los niveles de glucosa presentados por los animales.

CUADRO No. 5-3. Lectura de niveles de glucosa luego de la inducción a diabetes en los animales de experimentación. Bioterio. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba Marzo 2015.

GRUPOS	Niveles de glucosa (mg/dL)		
	Día 0 (mg/dL)	Día 7 (mg/dL)	Día 15 (mg/dL)
K1(No diabético+ vehículo gel)	65,0	75,0	62,0
	73,0	82,0	75,0
	64,0	67,0	69,0
K2(diabético+ vehículo gel)	155,0	159,0	150,0
	153,0	147,0	147,0
	151,0	158,0	169,0
K4(diabético+ Justicia 200 mg/mL)	158,0	149,0	150,0
	160,0	147,0	160,0
	159,0	142,0	147,0
K5(diabético+ Justicia 400 mg/mL)	148,0	151,0	155,0
	149,0	150,0	139,0
	139,0	147,0	148,0
K6(diabético+ Plectranthus 200 mg/mL)	155,0	174,0	146,0
	142,0	168,0	152,0
	159,0	170,0	153,0
K7(diabético+ Plectranthus 400 mg/mL)	147,0	150,0	163,0
	139,0	152,0	162,0

Realizado por: Francisco Vélez C.

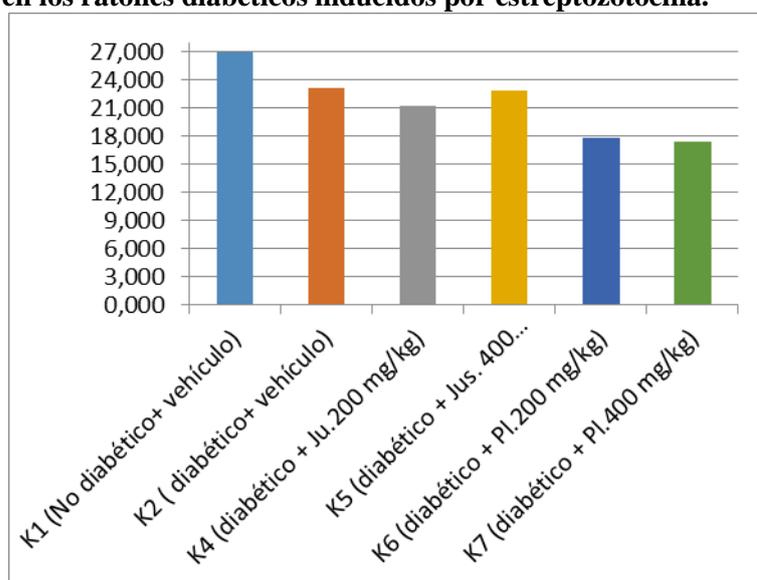
3.7. Análisis Del Protocolo De Cicatrización De Las Heridas

CUADRO No. 6-3. Área de contracción de la herida en los ratones diabéticos inducidos mediante estreptozotocina. Bioterio. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba Abril 2015.

GRUPO	Contracción de la herida (cm ²)		
	DIA 0	DIA 7	DIA 15
K1 (No diabético+ vehículo)	3,003±0,03	1,433±0,20	1,148±0,24
K2 (diabético+ vehículo)	3,003±1,41	1,180±0,14	0,953±0,05
K4(diabético + Justicia 200 mg/mL)	3,003±0,11	1,227±0,09	0,464±0,06
K5 (diabético + Justicia 400 mg/mL)	3,003±0,13	1,342±0,15	0,739±0,07
K6 (diabético + <i>Plectranthus</i> 200 mg/mL)	3,003±0,08	1,094±0,11	0,368±0,03
K7 (diabético + <i>Plectranthus</i> 400 mg/mL)	3,003±0,43	1,178±0,06	0,267±0,01

Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 47-3. Diagrama de barras de las áreas de las heridas al final de los tratamientos en los ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina.



Realizado por: Francisco Vélez C.

Como se puede observar en el gráfico anterior, los tratamientos en los que se aplicaron el extracto de *Plectranthus amboinicus* presentan los mejores resultados, dado que existe una mayor contracción de la herida, con lo cual la cicatrización es más rápida. Como se cabía esperar los tratamientos en que se aplicó el vehículo no tuvieron una cicatrización significativa en el lapso de tiempo de estudio, mientras que los tratamientos con el extracto de *Justicia chlorostachya* produjeron una cicatrización superior al tratamiento en el que se usó únicamente el vehículo, evidentemente no con la significancia como en el caso de *P. amboinicus*. Sin embargo, cabe recalcar que el proceso de cicatrización fue planteado en animales diabéticos, por lo cual es importante la presencia de la capacidad cicatrizante de ambas especies vegetales. Además, los tratamientos con extracto de *P. amboinicus* fueron los únicos en los que hubo caída total de la costra en ese lapso de tiempo determinado.

3.8. Análisis Estadístico

Con los resultados obtenidos en el ANOVA, se destaca el rechazo de la hipótesis H_0 , y la aceptación de la H_1 , ya que si existe diferencia entre la cicatrización de los diferentes tratamientos. Es evidente, que el tratamiento más eficaz fue aquel en que se aplicó el extracto de *P. amboinicus* a la dosis de 400 mg/kg de peso, puesto que produce un 99% de cicatrización en la herida infringida, sin despreciar los demás extractos y dosis que presentaron eficacia menor, además cabe recalcar que la dosis aplicada se encuentra en un 0,068% dentro de la formulación del gel aplicado.

Posteriormente se aplicó el test de TUKEY en el cual todos los grupos de experimentación fueron sometidos a comparación en la modalidad de “todos contra todos”, obteniéndose que el grupo K8 que era el que contenía el extracto de *P. amboinicus* a dosis de 400 mg/kg de peso fue el que tuvo mejor acción en el tiempo delimitado por el protocolo experimental.

Gracias a los resultados obtenidos se comprueba que el *P. amboinicus* tiene una gran actividad cicatrizante en heridas de diabéticos frente al extracto de *J. chlorostachya*. De este modo, cabe resaltar el aporte investigativo que brinda el presente trabajo, ya que nos proporcionará mayor accesibilidad a medicamentos de bajo costo y eficacia comprobada en el futuro después de pruebas clínicas, los cuales ayudarán al cambio de la matriz productiva en el ámbito de los encadenamientos productivos, utilización de plantas ancestrales y aumento de fuentes de trabajo en los diversos sectores.

Gráfico No. 48-3. Análisis de varianzas ANOVA de un factor

One Way Analysis of Variance

miércoles, marzo 04, 2015, 17:54:17

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,065)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,199)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
K1 (No diabético+ vehículo)	3	0	26,899	2,072	1,196
K2 (diabético+ vehículo)	3	0	23,108	0,310	0,179
K5 (diabético + Ju.200 mg/mL)	3	0	21,163	0,265	0,153
K6 (diabético + Jus. 400 mg/mL)	3	0	22,827	1,131	0,653
K7 (diabético + Pl.200 mg/mL)	3	0	17,816	1,931	1,115
K8 (diabético + Pl.400 mg/mL)	3	0	17,401	0,0860	0,0497

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	6	215,352	35,892	24,781	<0,001
Residual	14	20,277	1,448		
Total	20	235,630			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).

Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000

Realizado por: Francisco Vélez C.

Gráfico No. 49-3. Análisis mediante Test de TUKEY para comparación de los grupos experimentales

Miércoles, marzo 04, 2015, 17:54:17

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
K1 (No diabé vs. K8 (diabétic	9,498	7	13,670	<0,001	Yes
K1 (No diabé vs. K7 (diabétic	9,083	7	13,073	<0,001	Yes
K1 (No diabé vs. K5 (diabétic	5,736	7	8,256	<0,001	Yes
K1 (No diabé vs. K6 (diabétic	4,072	7	5,861	0,013	Yes
K1 (No diabé vs. K2 (diabéti	3,791	7	5,456	0,023	Yes
K2 (diabéti vs. K8 (diabétic	5,707	7	8,213	<0,001	Yes
K2 (diabéti vs. K7 (diabétic	5,292	7	7,616	0,002	Yes
K2 (diabéti vs. K5 (diabétic	1,945	7	2,799	0,467	No
K2 (diabéti vs. K6 (diabétic	0,281	7	0,404	1,000	Do Not Test
K6 (diabétic vs. K8 (diabétic	5,426	7	7,809	0,001	Yes
K6 (diabétic vs. K7 (diabétic	5,011	7	7,212	0,002	Yes
K6 (diabétic vs. K5 (diabétic	1,664	7	2,395	0,631	Do Not Test
K5 (diabétic vs. K8 (diabétic	3,762	7	5,414	0,024	Yes
K5 (diabétic vs. K7 (diabétic	3,347	7	4,817	0,051	No
K7 (diabétic vs. K8 (diabétic	0,415	7	0,597	0,999	No

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

Realizado por: Francisco Vélez C.

3.9. Análisis De Toxicidad Aguda

Se realizó el estudio de la toxicidad aguda del extracto del *P. amboinicus*, para lo cual se administró una dosis de 2000 mg/kg de peso para cada animal del grupo asignado para dicho estudio. Los parámetros tomados en cuenta fue el movimiento del animal, la prensibilidad, la dilatación de pupilas, y finalmente la mortalidad; no existió ningún cambio en el comportamiento de los animales luego de la administración del extracto.

Además se hicieron cortes histopatológicos de los riñones, hígado y estómago de cada individuo, en las placas analizadas se observó que no existió ninguna variación en la anatomía de cada órgano, los cuales se mantuvieron en las condiciones iniciales al tratamiento. Así, fue verificada la inocuidad que la planta presenta para el consumo.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron los extractos metanólicos de *Plectranthus amboinicus* y de *Justicia chlorostachya* mediante reflujo y se separó los compuestos fenólicos presentes en dicho extracto, los extractos presentaron color amarillo y rojo, lo cual nos demostraban la presencia de gran cantidad de compuesto fenólicos presentes.
2. Se procedió a realizar la caracterización fitoquímica de los extractos de ambas especies vegetales, lo más resaltante en ambos extractos es la presencia de gran cantidad de compuestos fenólicos, sobre todo flavonoides y antocianinas, sin descartar presencia de compuestos como catequinas, quinonas, etc.
3. Se indujeron los animales a diabetes con dosis bajas y seguidas de estreptozotocina durante varios días para producir la enfermedad de tipo II, se comprobó que los animales se convirtieron en diabéticos mediante lecturas de glicemias luego de la inducción , y se mantuvo un control en la alimentación para evitar problemas a causa de la patología.
4. Se comprobó el efecto cicatrizante de los geles elaborados con los extractos obtenidos de ambas plantas, y se determinó un tiempo límite para finalizar el tratamiento, al término del tiempo establecido se concluyó que el tratamiento más eficaz fue el gel elaborado con extracto de *P. amboinicus* a la dosis de 400 mg/kg de peso. Además el único tratamiento con el cual la costra cayó totalmente fue el antes mencionado.
5. Se realizó el análisis de toxicidad aguda del extracto de *P. amboinicus* a una dosis de 2000 mg/kg de peso durante catorce días durante los cuales se evaluaron diversos parámetros como la movilidad del animal, caída del pelo, prensibilidad, dilatación de pupilas, etc. Además se realizaron cortes histopatológicos de los órganos farmacocinéticos y se evidenció que no hubo ninguna alteración a nivel anatómico, por lo cual se puede concluir que la planta es inocua a dosis elevadas.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar estudios más exhaustivos de las especies vegetales utilizadas en este estudio, para de este modo determinar las moléculas presentes en éstas y que son causantes de la actividad biológica.
2. Gracias al estudio pudimos concluir que existe una cicatrización en pacientes diabéticos, por lo cual sería óptimo elaborar una formulación que permite su fácil aplicación en los pacientes.
3. Es aconsejable, ampliar el presente trabajo para elucidar el correcto mecanismo de acción de los componentes de *P. amboinicus* y *J. chlorostachya* en la cicatrización, es decir estudiar los productos naturales del país desde el enfoque mecanístico.

BIBLIOGRAFÍA

- ✓ **ARAGADVAY, S.P.** Elaboración y control de calidad de tintura y gel cicatrizante y antiinflamatorio a base de chilca (*Baccharis latifolia*) y hierbamora (*Solanum nigrum*). (Tesis) (BQF). ESPOCH. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba. 2012, Pág. 20.

- ✓ **BENAVIDES, J.** Reparación de heridas cutáneas. Revista Asociación Colombiana de Dermatología, Vol.1., No. 5. 2008, Colombia, Págs. 29-35.

- ✓ **BRUNETON, J.** Farmacognosia. Fitoquímica Plantas medicinales. 2ª Ed, Zaragoza. Acribia, 2001, págs. 59-60.

- ✓ **CARRASCO-FORMIGUERA, R.** The mechanism of alloxan hypoglycemia. Barcelona. Pro. Am. Diabetes Assoc. 1947. 277-287.

- ✓ **CUELLAR, A., MIRANDA, M.** Farmacognosia y productos naturales. 2ª. ed. La Habana-Cuba. Editorial Félix Varela. 2001. Págs. 107- 13.

- ✓ **FLORES, M, LOPEZ, O.** Caracterización de diabetes mellitus experimental inducida por estreptozotocina en ratones nmri. Gaceta de Ciencias Veterinarias. Vol. 12. No. 1. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Págs. 10-12

- ✓ **GILMAN, GOODMAN AND.** Las bases farmacológicas de la terapéutica. 2da Ed. Madrid. McGraw-Hill-Interamericana, 1940.

- ✓ **GUILLAMET, A. Y HERNÁNDEZ, J.M.** Enfermería quirúrgica, planes de cuidado. 1ra Ed. Barcelona- España. Springer. 1999., Pág. 126-127.

- ✓ **GONZALEZ, F.** Caracterización de los compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de chía (*Salvia hispánica L.*) mediante electroforesis capilar. (Tesis) (Maestría en Ciencias). Instituto Politécnico Nacional. Sección de Estudios de post grados e Investigación. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México D.F. 2010. págs.50-60.

- ✓ **HARD, G, C.** Identification of a high-frequency model for renal carcinoma by induction of renal tumors in the mouse with a single, dose of streptozotocin. *Cancer Research*, Vol. 2, No. 3, 1985. Págs. 703-708.

- ✓ **HERNANDEZ M.** Guía de anestesia y analgesia del ratón. Guía de anestesiología. Servicio de experimentación animal. 2011. Págs.2.

- ✓ **HESSE M, MEIER H, ZEEH B.** Métodos espectroscópicos en química orgánica. Quinta edición. Editorial Síntesis. Madrid, España. 1988. Págs.30- 66.

- ✓ **HIDALGO, O.** Determinación del efecto cicatrizante acuetaenólico de la planta *Bacopa procumbens* en la línea celular 3T3 de fibroblastos de ratón. (Tesis) (Magister en Ciencias en Biomedicina Molecular). Instituto Politécnico Nacional. Escuela de Medicina y Homeopatía. Sección de Estudios de Post grados e Investigación. México D.F. 2010. Págs. 17-25.

- ✓ **INEC.** La diabetes es la segunda causa de muerte general en el país. Quito – Ecuador. 2011. Págs. 1-2

- ✓ **INSTITUTO NACIONAL DE SALUD.** Guía de manejo y cuidado de animales de Laboratorio. Ratón. Ministerio de Salud. Lima, Perú. 2008. Págs.15-18

- ✓ **LOCK, O.** Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Segunda Edición. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. 1994. Págs. 114-140.

- ✓ **MARTINEZ, A.** Flavonoides. (Tesis) (Químico Farmacéutico) Universidad de Antioquía. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín, Colombia. 1995. Págs. 8-12.

- ✓ **MENENDEZ R, PAVÓN, V.** *Plectranthus amboinicus (Lour). Spreng.* *Revista Cubana*. Vol. 3 No. 3. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Cuba. 1999. Págs. 110- 115.

- ✓ **MIRANDA, Martha.** Farmacognosia y productos naturales. (Normas Ramales. De drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP, Cuba. 1992, págs. 32-62

- ✓ **MUÑOZ, F.** Plantas Medicinales y aromáticas, Estudio, cultivo y procesado. 1ra Ed. Madrid- España. 1992. Pág. 22.

- ✓ **MSP.** Boletín del Día Mundial de la diabetes. Ministerio de Salud Pública. Ecuador. 2012.

- ✓ **PAZMIÑO, C.O.** Determinación de la actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de *Justicia chlorostachya Leonard* (insulina), en ratones con hiperglucemia inducida. (Tesis) (bioquímico farmacéutico). ESPOCH. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba- Ecuador. 2011. Págs. 25-26

- ✓ **QUEZADA, Alberto.** Introducción al manejo de animales de laboratorio: roedores y pequeñas especies. (Tesis). (Quím. Farm). Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Ciencias. Yucatán-México. 1997, pp. 115-118

- ✓ **REDROBÁN, K.F.** Comprobación del efecto cicatrizante de los extractos hidroalcohólicos del berro (*Nartustium officinalis*) y llantén (*Plantago major*) en ratones (*Mus musculus*). (Tesis) (BQF). ESPOCH. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba- Ecuador. 2012. Págs. 30-32

- ✓ **SALAMANCA, M.A Y SÁNCHEZ, M.Y.** Extracción y caracterización de la oleorresina del orégano. (Tesis) (BQF). Universidad Tecnológica de Pereira. Escuela de Farmacia. Pereira- Colombia. 2009. Pág. 7.

- ✓ **SALAZAR, J.** Contribución al estudio químico y farmacológico de *Gentianella umbellata* (*G. Don*) Fabris. (Tesis) (Magister en Química). Pontificia Universidad Católica del Perú. Sección de Post grados e Investigaciones. Lima, Perú. 2003. Págs. 25-105

- ✓ **SEHAM, S, RABIE, H, et al.** Polyphenolics content and biological activity of *Plectranthus amboinicus* (*Lour.*) *spreng* growing in Egypt (*Lamiaceae*). Departament of Pharmacognosy, Cairo University. Egypt. 2012. Págs. 2- 15.

- ✓ **SINGH, A, ET AL.** Wound healing activity of standardized extract of *Curculigo orchioides* in streptozotocin-induced diabetic mice. Universidad Hindú Varanas, Departamento de bioquímica, India. 2014. Págs. 2- 10.

- ✓ **TAMAYO, M.** Influencia de un tratamiento integral de pie diabético en la disminución del índice de amputaciones de los pacientes atendidos en la unidad de pie diabético del hospital provincial general docente riobamba, durante el período enero – septiembre de 2013”. (Tesis) (médico). Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Salud. Escuela de Medicina Ambato, Ecuador. 2014. Págs. 25-73

- ✓ **VELANDIA, D.A.** Evaluación de la actividad cicatrizante y caracterización fitoquímica de *Dracotium croatti*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá 2010. Pág. 36.

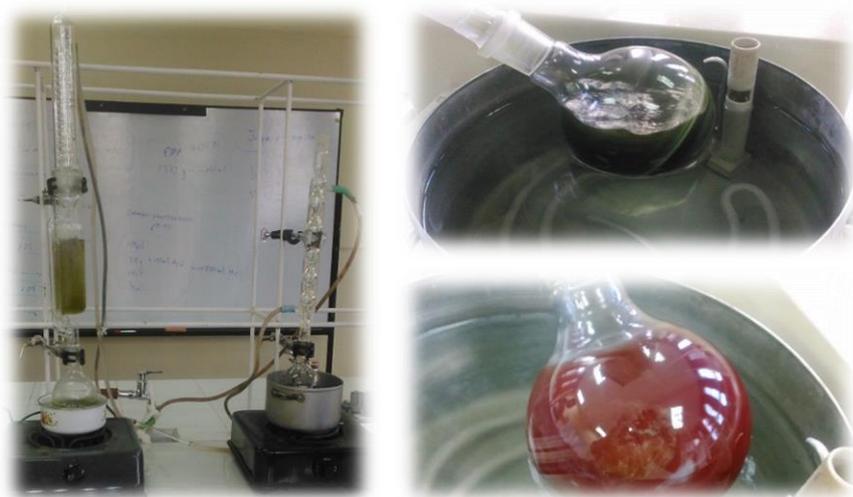
- ✓ **WAGNER H, BLADT S.** Plant drug analysis. A thin Layer Chromatography Atlas. Segunda Edición. Springer, Universidad de Munich, Alemania. 1996 Pág 196-210.

ANEXOS

Anexo A. Determinación de humedad



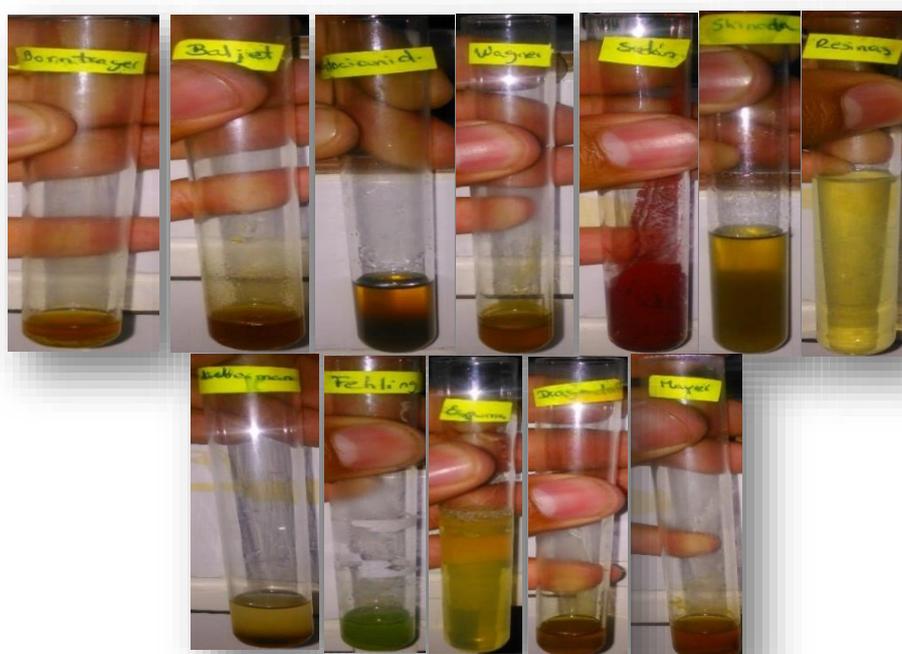
Anexo B. Preparación de los extractos de *Justicia chlorostachya* (rojo) y *Plectranthus amboinicus* (verde)



Anexo C. Tamizaje Fitoquímico de *Justicia chlorostachya*



Anexo D. Tamizaje Fitoquímico de *Plectranthus amboinicus*



Anexo E. Preparación de los geles para actividad cicatrizante



Anexo F. Inducción de diabetes a los ratones



Anexo G. Lecturas de glicemias a los animales por punción submaxilar

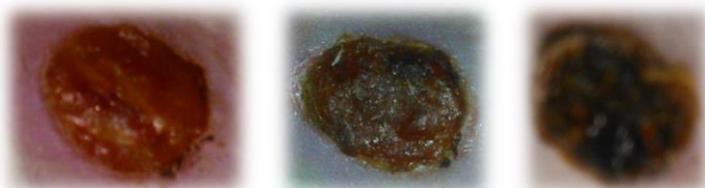


Anexo H. Inducción de las heridas a los ratones diabéticos



Anexo I. Diferentes estadios de la cicatrización de los ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina

**GRUPO
1**



**GRUPO
2**



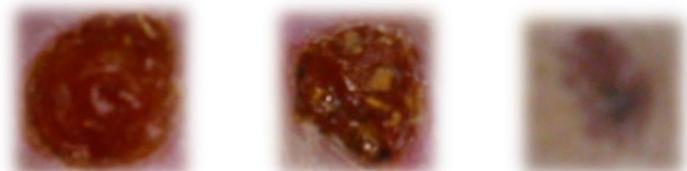
**GRUPO
4**



**GRUPO
5**



**GRUPO
6**



**GRUPO
7**

