

**UNIVERSIDAD NACIONAL
"SAN LUIS GONZAGA" DE ICA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**CONTROL DE CALIDAD Y EFICACIA TÓPICA DE LOS
UNGÜENTOS OBTENIDOS DE LAS FRACCIONES DE
Munnozia hostifolia EN LA CURACIÓN DE QUEMADURAS
DE TERCER GRADO EN RATAS HOLTZMAN.**

**TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR:
BACH. ELIZABETH PONGO ALCALÁ
BACH. ROSALIA KAREN HERRERA FLORES**

**PRESENTADO POR:
Dra. CHÁVEZ ORELLANA, HAYDEE
Mg. TORRES VELIZ, ERNESTO
Mg. BENDEZÚ ACEVEDO, ROCÍO**

ICA - PERÚ

2015

DEDICATORIA

A Dios por la vida, fortaleza y sabiduría otorgada,

A nuestros padres por el amor y apoyo incondicional,

A nuestros profesores por guiarnos y compartir sus conocimientos.

AGRADECIMIENTO

A los profesores Q.F. Felipe Surco, Q.F. Carmen Huayanca y Q.F. Roberto Garayar por sus consejos, dedicación, orientación Y sobre todo por brindarnos su amistad.

A nuestros asesores de tesis por guiarnos y apoyarnos durante nuestra formación profesional.

ÍNDICE	Página
I. ABSTRACT	7
II. RESÚMEN	9
III. INTRODUCCIÓN	11
IV. VARIABLES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	
4.1.Variables e Hipótesis	
4.1.1. Variables	13
4.1.1.1.Variable dependiente	13
4.1.1.2.Variable independiente	13
4.1.1.3.Variable interviniente	13
4.2.Hipótesis	13
4.3.Objetivos	
4.3.1. Objetivo General	13
4.3.2. Objetivos específicos	14
V. ANTECEDENTES Y DEFINICIONES	
5.1.Antecedentes	15
5.2.Definiciones	
5.2.1. Piel	17
5.2.2. Quemaduras	18
5.2.2.1.Tratamiento de las lesiones	20
VI. GENERALIDADES	
6.1.Taxonomía	22

6.2.Descripción morfológica de la especie	22
6.3.Origen, Hábitat y Ubicación geográfica de la especie	23
6.4.Uso en la medicina popular	23
VII. PARTE EXPERIMENTAL	
7.1.Estudio Fitoquímico	
7.1.1. Materiales, equipos y Reactivos	24
7.1.2. Métodos	
7.1.2.1.Recolección y tratamiento de la muestra vegetal	24
7.1.2.2.Obtención del extracto etanólico total	25
7.1.2.3.Obtención de los extractos por diferente polaridad	25
7.1.2.4.Screening fitoquímico	25
7.2. Estudio Farmacotécnico	
7.2.1. Materiales, equipos y excipientes	26
7.2.2. Diseño para la formulación del ungüento	27
7.2.2.1.Pre formulación del ungüento	27
7.2.2.2.Formulación del ungüento	28
7.3.Análisis de control de calidad	
7.3.1. Análisis Físicoquímicos	29
7.3.1.1.Materiales y equipos	29
7.3.1.2.Características organolépticas	29
7.3.1.3. Punto de fusión	30
7.3.1.4.pH	30
7.3.1.5.Extensibilidad	31

7.3.1.6. Viscosidad	32
7.3.2. Ensayos Biológicos	
7.3.2.1. Materiales, equipos y reactivos	33
7.3.2.2. Recuento de microorganismos aerobios totales	33
7.4. Estudio Farmacológico: Quemaduras de tercer grado	
7.4.1. Materiales, equipos y reactivos	34
7.4.2. Grupos de experimentación	34
7.4.3. Protocolo experimental	35
7.4.4. Medición macroscópica	36
7.4.5. Estudios histológicos	36
VIII. RESULTADOS	37
IX. DISCUSION	48
X. CONCLUSIONES	51
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	52
XII. ANEXOS	57

I. ABSTRACT

The objective of this study was to compare the efficacy topical ointments fractions obtained of *Munnozia hastifolia* (Poepp) H. Rob & Brettell, with the effect of silver sulfadiazine in the treatment of third degree burns in Holtzman rats . The *Munnozia hastifolia* ethanol extract was obtained by the technique of " reflux " , then phytochemical screening was performed by determining the presence of : steroids and / or triterpenoids , alkaloids , flavonoids and catechins , subsequently underwent a fractionation using solvents of increasing polarity obtaining fractions ethereal diclorometánica , acetate and water , to which was performed metabolite identification , determining the presence of triterpene and / or steroids and alkaloids in the diclorometanica and ethereal fractions ; flavonoids and catechins in the aqueous fraction and all metabolites mentioned in the acetate fraction . For better implementation of the fractions, ointments formulated to 1 % and 5% in petrolatum and lanolin base. Quality controls the recently developed ointments were performed; resulting those suitable for topical administration. Burn was produced by thermal contact on the back area of the animals. The treatment was performed every 12 hours with the ointments formulated and controls. On the seventh day , the animals were treated with the ointment of acetate fraction at 1% and 5 % reported a significant decrease in the diameter of the burned area being 100.47mm^2 $101.79\text{mm}^2 \pm 0.93$ and ± 1.09 respectively vs . Silver sulfadiazine was $100.37\text{mm}^2 \pm 1.02$. Histological studies showed that all groups treated with ointments fractions found in the proliferative phase. On day 14 shows the complete epithelialization, demonstrating efficacy topical the fractions ointments Ethereal Diclorometánica and 1% aqueous fraction is more efficient acetate 1% and 5%, finding a

decrease in diameter 38.73mm² burned area and 40.22 ± 2.77 mm² ± 3.17.respectivamente. Furthermore collagen bands appreciated thick dermis level completely. We conclude that the fraction obtained ointments acetate 1% and 5% topical efficacy present in healing third degree burns in Holtzman rats compared with silver sulfadiazine. This efficiency could be due to the presence of triterpene and / or steroids, flavonoids and catechins.

Keywords: *Munnozia hastifolia* (Poepp) H. Rob & Brettell, third degree burns and ointments.

II. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue comparar la eficacia tópica de los ungüentos obtenidos de las fracciones de *Munnozia hastifolia* (Poepp) H. Rob & Brettell, con el efecto de la Sulfadiazina de plata en el tratamiento de quemaduras de tercer grado en ratas Holtzman. El extracto etanólico de *Munnozia hastifolia* se obtuvo por la técnica de “reflujo”, luego se realizó un tamizaje fitoquímico determinando la presencia de: esteroides y/o triterpenos, alcaloides, flavonoides y catequinas, posteriormente se sometió a un fraccionamiento utilizando solventes de polaridad creciente obteniendo las fracciones etérea, diclorometánica, acetato y acuosa, a las cuales se les realizó la identificación de metabolitos, determinando la presencia de triterpenos y/o esteroides y alcaloides en las fracciones etérea y diclorometánica; flavonoides y catequinas en la fracción acuosa y todos los metabolitos mencionados en la fracción de acetato. Para una mejor aplicación de las fracciones, se formularon ungüentos al 1% y 5% en base a vaselina y lanolina. Se realizaron los controles de calidad a los ungüentos recientemente elaborados, siendo estos aptos para su administración vía tópica. Consecutivamente, se produjo la quemadura por contacto térmico en la zona dorsal de los animales. Se realizó el tratamiento cada 12 horas con los ungüentos formulados y el control. Al séptimo día, los animales que fueron tratados con el ungüento de la fracción acetato al 1% y 5% manifestaron una disminución significativa del diámetro del área quemada siendo $100.47\text{mm}^2 \pm 0.93$ y $101.79\text{mm}^2 \pm 1.09$ respectivamente vs. Sulfadiazina de plata que fue de $100.37\text{mm}^2 \pm 1.02$. Los estudios histológicos demuestran que todos los grupos tratados con los ungüentos de las fracciones se encuentran en la fase proliferativa. En el día 14 se aprecia la epitelización completa, demostrando eficacia tópica los ungüentos de las fracciones Etérea, Diclorometánica y acuosa al 1% siendo más eficaz la fracción acetato de etilo al 1% y 5% encontrándose una disminución del diámetro del área quemada de $38.73\text{mm}^2 \pm 2.77$ y $40.22\text{mm}^2 \pm 3.17$. respectivamente. Además se aprecian bandas de colágeno gruesas, a nivel de la dermis de forma completa. Se concluye que los ungüentos

obtenidos de la fracción acetato al 1% y 5%, presentan eficacia tópica en la curación de quemaduras de tercer grado en ratas Holtzman en comparación con la Sulfadiazina de plata. Esta eficacia podría deberse a la presencia de triterpenos y/o esteroides, flavonoides y catequinas.

Palabras claves: *Munnozia hastifolia* (Poepp) H. Rob & Brettell, quemaduras de tercer grado y ungüentos.

III. INTRODUCCION

La quemadura se define como la descomposición de un tejido orgánico, ocasionada por un agente térmico, eléctrico, químico o radiactivo¹, que produce una llaga, ampolla o impresión. Estudios epidemiológicos señalan que las lesiones por quemaduras se han convertido en un creciente problema de salud pública por sus implicancias físicas, psicológicas y socioeconómicas, sobre todo en países subdesarrollados.

Según Michael D. Peck y col. la incidencia de quemaduras suficientemente graves como para requerir atención médica en el 2012, fue de casi 11 millones de personas y ocupa el cuarto lugar en todas las lesiones, más alta que la incidencia combinada de tuberculosis y las infecciones por VIH. Afortunadamente, a pesar de que las quemaduras e incendios representan más de 300.000 muertes cada año en todo el mundo, la gran mayoría de las quemaduras no son fatales².

De acuerdo a la Asociación Americana de Quemaduras que lleva el registro de 70 centros de quemados de Estados Unidos de Norteamérica en su base de datos en el 2011, entre el 2000 y 2010 hubo 148.000 egresos hospitalarios por quemaduras, 5.540 muertes³.

A nivel nacional, los datos obtenidos según MINSA en el 2010, reportan que los principales grupos de causas de morbilidad en hospitalización por Quemaduras son los niños⁴. Según la Asociación de Ayuda al Niño Quemado (ANIQUEM) menciona que de los niños que se accidentan, aproximadamente: 70% corresponden a quemaduras por líquidos calientes, 28% quemaduras por fuego directo, 2% quemaduras por electricidad y otros. De los niños quemados: 70% son menores de 5 años. De los niños que se

hospitalizan, 1 de cada 3 sufre quemaduras de 20% a más del 20% de superficie corporal⁵, es decir, un tercio son grandes quemados.

Un estudio sobre las complicaciones en pacientes quemados hospitalizados en el Instituto Nacional de Salud del Niño, durante el periodo de Enero a Julio del año 2010, se menciona que el agente causal más común de las quemaduras, fueron líquidos seguido de fuego⁶.

Según la OMS, las quemaduras graves pueden ocasionar un trauma emocional causado por una desfiguración permanente, además de soportar costos adicionales a la atención sanitaria y rehabilitación⁷. El costo de tratamiento, es variable dependiendo de la severidad de cada caso, pero en promedio en el centro de tratamiento de ANIQUEM es de aproximadamente 1,000 dólares por año, costo que no puede ser asumido por pacientes de bajos recursos económicos⁵.

En general las quemaduras constituyen un verdadero problema de salud no solo por el número de pacientes afectados, sino por las secuelas y muertes que estas han causado. Siendo esta la motivación para realizar el siguiente trabajo estudiamos la especie de *Munnozia hastifolia* (Poepp) H. Rob. & Brettell de nombre vulgar “alas de murciélago”; utilizada por la población como analgésica, antiinflamatoria, cicatrizante, en afecciones urinarias y gástricas; para lo cual nos planteamos los siguientes problemas ¿Presenta eficacia tópica los ungüentos obtenidos de *Munnozia hastifolia* en la curación de quemaduras de tercer grado en ratas Holtzman? ¿Cumplen los ungüentos obtenidos de *Munnozia hastifolia* con los controles de calidad establecidos por The United States Pharmacopoeia (USP)?

IV. VARIABLES, HIPOTESIS Y OBJETIVOS

4.1. VARIABLES

4.1.1. VARIABLE DEPENDIENTE:

Control de calidad de los ungüentos

Eficacia tópica en la curación de quemaduras

4.1.2. VARIABLE INDEPENDIENTE:

Ungüento de las fracciones obtenidas de *Munnozia hastifolia* (Poepp) H. Rob & Brettell

4.1.3. VARIABLE INTERVINIENTE:

Quemaduras de tercer grado

4.2. HIPOTESIS:

- 1) Los ungüentos de las fracciones de *Munnozia hastifolia* presentan eficacia tópica en la curación de quemaduras de tercer grado en ratas Holtzman.
- 2) Los ungüentos de las fracciones de *Munnozia hastifolia* cumplen con los controles de calidad establecidos por THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA (USP 36 NF 31).

4.3. OBJETIVOS

4.3.1. OBJETIVO GENERAL:

Realizar los controles de calidad y determinar la eficacia tópica de los ungüentos obtenidos de las fracciones de *Munnozia hastifolia* en la curación de quemaduras de tercer grado en ratas Holtzman.

4.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en las fracciones obtenidas de las hojas de *Munnozia hastifolia* (Poepp) H. Rob & Brettell.
- Formular y elaborar ungüentos a partir de las fracciones obtenidas de las hojas de *Munnozia hastifolia*.
- Aplicar los controles fisicoquímicos y microbiológicos a los ungüentos obtenidos.
- Evaluar la reparación de la piel mediante análisis macroscópico e histológico.

V. ANTECEDENTES Y DEFINICIONES

5.1. ANTECEDENTES

El género *Munnozia* destaca por sus importantes estudios de actividad biológica y/o farmacológica, como lo demuestra un estudio realizado en 1993, sobre plantas medicinales, de distintas regiones de Bolivia, donde una de las especies, *Munnozia maronii* demostró actividad in vitro frente a tres especies de *Leishmania*, a concentraciones de 25 µg/ml del extracto etéreo. Mediante eluciones Cromatográficas se obtuvo una lactona sesquiterpénica, denominado Dehidrozaluzanin C, demostrando ser ésta la responsable de la actividad leishmanicida siendo el resultado más significativo frente a la forma promastigote⁸.

En un estudio fitoquímico y espectroscópico preliminar de cinco plantas medicinales de Carmen pampa (Coroico) en Bolivia se pudo determinar que la especie vegetal *Munnozia hastifolia* presenta compuestos fenólicos, taninos y triterpenos /esteroides. Además para la determinación de un posible potencial efecto fotoprotector correspondiente a las radiaciones UVB y UVA (280-400 nm) se obtuvo que entre los extractos estudiados el que presenta mayor absorbancia, en la región UV de interés, es el de *Munnozia hastifolium*, el cual tiene un área integrada de absorbancia de 71,68 entre 280 y 400 nm a 100ppm, por lo que resulta de cierta importancia desde el punto de vista fotoprotector⁹.

En base a todos los datos obtenidos se decidió estudiar la especie *Munnozia hastifolia* por tener una amplia distribución en la región, un uso tradicional para el tratamiento de heridas que correlaciona con estudios farmacológicos previos (actividad leishmanicida) y no tener todavía compuestos aislados identificados, sin embargo el

estudio fitoquímico preliminar revela una presencia de compuestos fenólicos que pueden ser los responsables de su interesante absorbancia en la región UVB/UV.

En el 2011 se realizó el estudio fitoquímico y efecto antiulceroso de las fracciones obtenidas del extracto etanólico a partir de las hojas de *Munnozia hastifolia*, donde se determina la presencia de flavonoides, esteroides, triterpenos, alcaloides y catequinas. Además se obtuvo una disminución significativa del número y severidad de las lesiones con el uso de las fracciones etérea, diclorometánica, acetato y acuosa, presentando éstas, dosis de 125mg/kg y 75mg/kg con excepción de la fracción acuosa a 325mg/kg y 275mg/kg, de las cuales la más eficaz resultó ser la fracción etérea a las concentraciones ya mencionadas con 100 % de inhibición de úlceras¹⁰.

En el 2012 se determinó la actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *Munnozia hastifolia*, presentando actividad antimicrobiana a concentraciones de 5mg/ml, 10mg/ml y 20mg/ml, obteniendo una mayor actividad a una concentración de 10mg/ml frente a *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae* y la ausencia de actividad frente a *Pseudomona aureginosa*. Además se demostró que la disolución de 1.875mg/ml del extracto, posee actividad antioxidante equivalente a 0.236mM de Trolox¹¹.

5.2. DEFINICIONES

5.2.1. PIEL

La piel es el mayor órgano del cuerpo humano o animal. En el ser humano ocupa aproximadamente 2m^2 .

La piel está compuesta de varias capas, la más superficial, llamada epidermis, es la más fina constituida por un epitelio estratificado plano queratinizado. La capa más interna, denominada dermis, contiene fibras de colágeno, fibroblastos, vasos sanguíneos, y apéndices epidérmicos como glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas y folículos pilosos. La unión entre ambas capas se denomina unión dermoepidérmica. Profunda a la dermis se encuentra una capa subcutánea laxa, rica en tejido adiposo que puede ser denominada hipodermis o tejido celular subcutáneo; ésta capa tiene como función principal proporcionar soporte¹². La integridad de la piel es vital para que el órgano cutáneo desarrolle las funciones de protección y de relación con el medio ambiente. La pérdida de estas funciones a causa de las lesiones por quemaduras, expone al organismo a severo estrés¹¹.

La piel tolera el contacto por un periodo breve a una temperatura de hasta 40° centígrados, pero de allí en adelante el aumento de la temperatura sin duda la lesiona y por cada grado centígrado que aumente, asciende drásticamente la injuria. Cuando una persona se expone a temperaturas mayores a 70° centígrados se produce una destrucción inmediata por necrosis de la epidermis. La severidad de una lesión por quemaduras se relaciona con la transferencia de calor. El índice del traspaso térmico depende de la capacidad de calor del agente, de la temperatura del agente, de la duración del contacto, del coeficiente de transferencia de calor y de conductividad específicos a los tejidos.^{13,14}

Las laceraciones por enfermedades y las heridas por quemaduras resultan difíciles de sanar porque implican pérdida de piel, exponiendo a los órganos internos a la pérdida de humedad y contaminación aeróbica que conducen a infecciones y sepsis.

5.2.2. QUEMADURAS

La quemadura se define como la descomposición de un tejido orgánico, ocasionada por un agente térmico, eléctrico, químico o radiactivo^{15, 16}. Se clasifican de acuerdo a su profundidad y extensión; es necesaria una identificación adecuada para poder realizar un tratamiento óptimo. La profundidad tiene una relación directa con el tiempo de curación y el desarrollo de algún tipo de secuela, sea física o psicológica.

- Quemaduras de primer grado o superficiales: afectan a la epidermis.
- Quemaduras de segundo grado: subdivididas en grosor parcial superficial que afectan la capa externa de la epidermis y grosor parcial profundo afectando la epidermis, pudiendo llegar hasta la dermis.
- Quemaduras de tercer grado o de grosor total: en donde la destrucción de la epidermis y la dermis es total, llegando a afectar las terminaciones nerviosas, músculos y huesos¹⁷.

Las alteraciones locales causadas por la quemadura afectan primariamente a los plexos dérmicos y que, de acuerdo a su magnitud, pueden corresponder a vasodilatación que se traduce en eritema; aumento de la permeabilidad vascular que lleva a la formación de flictenas, exudación y coagulación intravascular causando necrosis¹⁶.

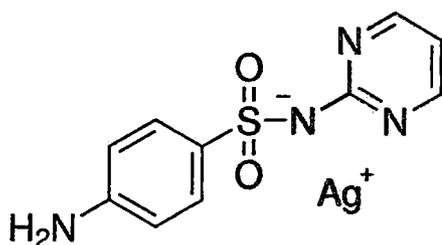
En quemaduras de mayor gravedad se produce una respuesta sistémica, debido a la liberación de numerosas sustancias vasoactivas que entran a la circulación (catecolaminas, glucocorticoides, vasopresina, angiotensina, interleuquinas, etc.). Estas alteraciones tienen su máxima expresión en el denominado gran quemado, término que se aplica cuando existe una extensa superficie quemada, en general sobre 20%, produciéndose una desestabilización grave del medio interno que requiere medidas de tratamiento intensivo.

Según Benaim, los períodos evolutivos que caracterizan a las quemaduras de mayor gravedad pueden dividirse en período de reacción inmediata, caracterizado por una gran descarga de adrenalina. Período de alteraciones texturales y humorales que se refiere a los cambios que se producen en el espacio extracelular denominados alteraciones humorales y en los diferentes órganos llamados a su vez alteraciones texturales y que duran alrededor de 1 semana. Período intermedio se inicia a partir de la segunda semana, caracterizándose por un estado hipercatobólico y que termina cuando se ha cubierto toda la superficie cruenta. Finalmente el período de recuperación que comienza cuando no quedan superficies cruentas, siendo importante la rehabilitación funcional, estética y psicológica, completándose con la reincorporación del individuo a la sociedad¹⁸.

5.2.2.1. TRATAMIENTO DE LAS LESIONES

El tratamiento se inicia con una limpieza profunda de la quemadura para poder realizar el desbridamiento del tejido necrótico y ampollas. Para evitar la proliferación de bacterias y hongos se continúa con la quimioprofilaxis, que consiste en la aplicación de fármacos por vía tópica. Entre los fármacos más utilizados se encuentra la sulfadiazina de plata, nitrofurazona y plata nanocristalina.

SULFADIAZINA DE PLATA: Es una sulfonamida producida al reaccionar sulfadiazina con nitrato de plata. Este fármaco es utilizado generalmente en el tratamiento de quemaduras por su fácil aplicación, amplio espectro de acción y bajo costo¹⁹.



Sinónimo	Sulfadiazina de plata, Sulfadiazina argéntica
Fórmula Molecular	C ₁₀ H ₉ AgN ₄ O ₂ S
Peso Molecular	357,14 g/mol
Propiedades	Sólido blanco, insoluble en agua helada

Indicaciones: Sulfadiazina de plata está indicado en el tratamiento y prevención de infecciones en quemaduras de segundo y tercer grado, así como en úlceras varicosas y de decúbito²⁰.

Reacciones adversas: Se observan en aproximadamente el 2% de los pacientes y son, por lo general, leves y transitorios. En ensayos clínicos se notificaron las siguientes reacciones adversas ordenadas según su frecuencia y sistema orgánico, utilizando la siguiente clasificación: muy frecuentes ($\geq 1/10$); frecuentes ($\geq 1/100$, $< 1/10$); poco frecuentes ($\geq 1/1.000$, $< 1/100$); raras ($\geq 1/10.000$, $< 1/1.000$); muy raras ($< 1/10.000$).

Trastornos de la sangre y del sistema linfático. Muy frecuentes: Leucopenia. Además de las reacciones adversas descritas en los ensayos clínicos, en la experiencia post comercialización se han recogido las siguientes reacciones adversas:

Trastornos de la piel y del tejido subcutáneo. Muy raras: Eczema, dermatitis alérgica, decoloración cutánea por fotosensibilización. Ya que la absorción cutánea es posible, y sobre todo en las heridas abiertas, no puede excluirse el riesgo de efectos sistémicos o complicaciones generales de las sulfamidas: hematológicas, renales, intestinales y cutáneas, de mayor riesgo de aparición en enfermos renales y hepáticos.

Algunos informes sugieren un aumento de osmolalidad del suero producido por la absorción de propilenglicol, cuando se aplica una gran cantidad de Sulfadiazina de plata a heridas de superficie muy extensa²¹.

VI. GENERALIDADES:

6.1. TAXONOMIA:

La muestra vegetal fue clasificada y estudiada en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el Mg. Hamilton Beltrán S. según el sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION	: MAGNOLIOPHYTA
CLASE	: MAGNOLIOPSIDA
ORDEN	: ASTERALES
FAMILIA	: ASTERACEAE
GENERO	: Munnozia
ESPECIE	: <i>Munnozia hastifolia</i> (Poepp) H. Rob & Brettell
NOMBRE VULGAR	: “alas de murciélago”

6.2. DESCRIPCION MORFOLOGICA DE LA ESPECIE

Munnozia hastifolia es un arbusto de hasta 2 metros de alto. Tallos y hojas con látex lechoso. Hojas hastiformes simples opuestas con respecto a su disposición al tallo, penninervia, de borde irregular, envés pubescente, ápice y flancos en punta. Inflorescencia compuesta por racimo. Capítulos amarillos. Frutos en samara.²²

6.3. ORIGEN, HABITAT Y UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LA ESPECIE:

El género *Munnozia* fue descrito por Ruiz & Pav. y publicado en *Florae Peruviana, et Chilensis Prodrum*, en 1794.⁷ Se distribuye en Costa Rica, Panamá, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Argentina. Comprende aproximadamente 25 especies.²³

La especie *Munnozia hastitolia* se encuentra adaptada a territorios húmedos, habitualmente crece en abundancia en la provincia de Chanchamayo, Departamento de Junín, a 525 msnm., como maleza en los caminos y en medios de cultivos.

6.4. USOS EN LA MEDICINA POPULAR

De las informaciones recogidas de la medicina tradicional, se le atribuye diversas propiedades curativas, siendo de gran utilidad principalmente como cicatrizante, analgésico, antirreumático, en cistitis, infecciones del tracto urinario y gastrointestinal, antiinflamatorio, además de coadyuvante en el tratamiento del cáncer.

VII. PARTE EXPERIMENTAL

7.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO:

7.1.1. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

➤ **Materiales y Equipos:**

- Matraz
- Soporte Universal
- Baguetas
- Pinzas
- Probeta
- Placa escavada de porcelana
- Pipetas
- Propipetas
- Tubos de ensayo
- Beacker
- Gradilla
- Plancha Calefactora
- Rotavapor

➤ **Reactivos:**

- Diclorometano
- Éter de petróleo
- Acetato de etilo
- Etanol 96°

7.1.2. MÉTODOS:

7.1.2.1. RECOLECCION Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA VEGETAL

La especie *Munnozia hastifolia* (Poepp.) H. Rob. & Brettell fue recolectada durante el mes de abril del 2013, en la época de floración. Esta operación fue desarrollada por las investigadoras en horas de la mañana de forma manual, luego la planta fue colocada en bolsas de papel y finalmente se trasladó a la ciudad de Ica.

Se realizó una desecación natural bajo sombra libre de humedad, sol directo y polvo, luego se procedió a triturar de forma manual y se almacenó en un ambiente fresco y seco.^{24, 25.}

7.1.2.2. OBTENCION DEL EXTRACTO ETANOLICO TOTAL

Se realizó una extracción continua o progresiva mediante la técnica del reflujo por 4 horas. Luego se llevó a concentrar a sequedad en un rotavapor a presión reducida y a una temperatura de 40° C.

7.1.2.3. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS POR DIFERENTE POLARIDAD

El extracto etanólico de *Munnozia hastifolia* (Poepp.) H. Rob. & Brettell obtenido por reflujo se trata con solventes de polaridad creciente (éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y agua), para separar los metabolitos de acuerdo a su polaridad²⁶.

7.1.2.4. SCREENING FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico o “Screening” fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en un planta. Consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración.²⁷

Para la determinación cualitativa de los principales grupos de constituyentes químicos presentes en el extracto, se realizó una marcha fitoquímica con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración, obteniéndose 6 fracciones denominadas A, B, C, D, E y F.²⁸

7.2. ESTUDIO FARMACOTÉCNICO:

7.2.1. MATERIALES, EQUIPOS Y EXCIPIENTES:

➤ Materiales y Equipos:

- | | |
|-------------------|---------------------|
| - Espátula | - Bagueta |
| - Luna de reloj | - Beacker |
| - Pipeta | - Gradilla |
| - Gotero | - Balanza analítica |
| - Propipeta | - pHmetro |
| - Tubos de ensayo | - Viscosímetro |

➤ Excipientes:

- | | |
|------------------|-------------------|
| - Glicerina | - Vaselina blanca |
| - Propilenglicol | - Lanolina |

7.2.2. DISEÑO PARA LA FORMULACION DEL UNGÜENTO

Los ungüentos son preparaciones semisólidas destinadas para la aplicación externa sobre la piel o las membranas mucosas. A menudo contienen menos del 20 % de agua y sustancias volátiles y más de 50% de Hidrocarburos, ceras o polioles como vehículos²⁹. Se caracterizan por estar constituidos de una mezcla hecha con una base de grasas o aceites. No se diluyen con las secreciones de la piel, sino que forman una capa protectora sobre esta. El objetivo es dispensar uniformemente a través de un vehículo una o más drogas finamente subdivididas o disuelta.

7.2.2.1. PRE FORMULACIÓN DEL UNGÜENTO

Ensayo de solubilidad de los extractos: Según la USP 36 NF 31 las bases de ungüentos funcionan como vehículos para la aplicación tópica de sustancias medicinales y como emolientes y agentes protectores para la piel.

Propiedades Físicas: Las bases de ungüentos se clasifican como (a) bases de ungüentos -oleosas anhidras, que no absorben fácilmente el agua, son insolubles en agua y no se pueden eliminar con agua (p.ej, petrolato); (b) bases de ungüentos para absorción que son anhidras y absorben algo de agua pero son insolubles en agua y no se pueden eliminar con agua (p.ej., lanolina); (c) bases de ungüentos para emulsión que son emulsiones agua en aceite o aceite en agua y son hidratadas, absorben agua y son insolubles en agua (p.ej., cremas de agua, aceites, ceras y/o parafinas); y (d) bases de

ungüentos hidrosolubles que son anhidras y absorben agua y son solubles en agua y se pueden eliminar con agua (p.ej., polietilenglicol).

Propiedades Químicas: Las bases de ungüentos se seleccionan para que sean inertes y químicamente estables³⁰.

En una primera etapa se realizó un ensayo de solubilidad de las fracciones en diferentes excipientes tales como: vaselina, propilenglicol, lanolina y glicerina.

7.2.2.2. FORMULACIÓN DEL UNGÜENTO:

Luego de los ensayos de solubilidad se seleccionó el excipiente con mayor solubilidad para las fracciones obtenidas. Se procedió a elaborar el ungüento, obteniendo la siguiente formulación:

UNGÜENTO AL 1%

- Fracción..... 1g
- Lanolina..... 10g
- Vaselina c.s.p..... 100g

UNGÜENTO AL 5%

- Fracción..... 5g
- Lanolina..... 10g
- Vaselina c.s.p..... 100g

Preparación del ungüento: Se realizó mediante la incorporación directa en una base para ungüento previamente preparada.

Se calculó la cantidad necesaria de cada uno de los ingredientes de la fórmula según la cantidad final a preparar. Se pesó cada uno de los componentes a utilizar, en una luna de reloj. Luego se procedió a mezclar el extracto con la lanolina, mediante

incorporación directa³¹. Finalmente se añadió la vaselina a la mezcla anterior, y se continuó mezclando hasta que el producto fue homogéneo (sin grumos). Se colocó las fórmulas en potes debidamente etiquetados. Luego se procedió a realizar los controles de calidad respectivos.

7.3. ANÁLISIS DE CONTROL DE CALIDAD:

7.3.1. ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS:

7.3.1.1. MATERIALES Y EQUIPOS

➤ MATERIALES:

Beacker	Lamina porta objeto
Bagueta	Luna de reloj

➤ EQUIPOS:

pHmetro

7.3.1.2. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS:

Su determinación u observación proporciona una primera impresión de la calidad del producto. Deben presentar aspecto homogéneo, color y olor agradable o por lo menos aceptable y textura suave luego de la aplicación vía tópica.

Una vez elaboradas las muestras se observó a diferentes intervalos de tiempo (24 horas, 7, 15, 30 días) con la finalidad de examinar: homogeneidad, textura, consistencia, color y olor.³²

7.3.1.3. PUNTO DE FUSION

Se conoce como punto de fusión a la temperatura en la cual una materia que se halla en estado sólido pasa a estar en estado líquido. Para que se produzca el cambio de estado, dicha temperatura debe ser constante. Según USP 36 NF 31, para este ensayo los ungüentos pertenecen a la Clase II.

Procedimiento: Se fundió cuidadosamente el material a la menor temperatura posible y se colocó en un tubo capilar con ambos extremos abiertos, a una profundidad de aproximadamente 10mm. Luego se enfrió el tubo cargado a 10° o menos durante 24 horas, luego se unió el tubo capilar al termómetro, todo se ajustó a un baño de agua y se calentó. Registramos la temperatura (T° de fusión) en la cual el material comienza a subir en el tubo capilar³³.

7.3.1.4. pH:

En la práctica, la medición de pH se lleva a cabo por medio de la lectura de pH en la escala de un instrumento medidor de pH, ya sea digital o analógico. Esta lectura está en función de la diferencia de potencial establecida entre un electrodo indicador y un

electrodo de referencia usando como solución de ajuste de la escala del medidor de pH, una solución reguladora del mismo.

Procedimiento: Se utilizó el método de Fiedler³⁴, se tomó 10g de ungüento, luego fue colocado en un vaso de precipitado a baño maría. Una vez obtenido el ungüento fundido se le agregó 30ml de agua bidestilada. Se mezcló bien hasta que se observó separación de las dos fases. Se filtró la fase acuosa y a este filtrado se le determinó el pH. Previamente se ajustó el equipo con la solución reguladora de pH³⁵.

7.3.1.5. EXTENSIBILIDAD

Es la capacidad que tiene el ungüento para ser aplicado y distribuido uniformemente sobre la piel.

Procedimiento: La extensibilidad se midió utilizando dos placas de cristal o porta objeto (20 x 20 cm), se ubicó la placa inferior sobre una hoja de papel milimétrico a la que se le trazaron diagonales y se colocó una muestra de 2g de ungüento sobre el punto de intersección. Se pesó y situó la placa superior, al cabo de 1 minuto y se tomaron los valores de los 3 radios formados. Se repitió esta operación con sucesivas pesas de 4g y 5g, con intervalos de 1 minuto, colocados en el centro de la placa superior^{36, 37}. El área de extensibilidad (AE) se calculó según la siguiente expresión:

$$AE = \pi * r^2$$

Dónde: r = radio promedio de las 3 mediciones (mm)

7.3.1.6. VISCOSIDAD

La viscosidad es una medida de la resistencia de la formulación al flujo, además de una evaluación de las propiedades reológicas de la forma farmacéutica (p.ej., ungüento). Según USP 36 NF 31, para este ensayo los ungüentos fueron medidos mediante el principio de la viscosimetría rotacional, utilizando el viscosímetro Brookfield.

Procedimiento: Se colocó 12g de la muestra en el viscosímetro a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, empleando un gradiente de velocidad entre $0 - 100 \text{ s}^{-1}$, con una duración de 2 minutos. Finalmente se tomó el tiempo desde el punto de partida hasta la señal indicada en el viscosímetro ^{35, 38}.

7.3.2. ENSAYO BIOLÓGICO:

Estas pruebas se basan en la capacidad de determinar la presencia de microorganismos a través del uso de medios de cultivo: nutritivos, de enriquecimiento, selectivos y/o diferenciales, capaces de permitir su recuperación a partir de materias primas o productos no estériles y/o de evidenciar ciertas características bioquímicas, producto del metabolismo de los diferentes microorganismos a investigar³⁹.

7.3.2.1. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

➤ MATERIALES

Placas estériles	Cintas indicadoras de pH
Pipetas estériles de 1 mL y de 10 mL	Tubos de ensayo
Propipetas	

➤ EQUIPOS:

Baño María a 45-50°C	Incubadora a 32,5 ± 2,5° C
Autoclave	Contador de colonias
Cámara de flujo laminar	

➤ REACTIVOS

Buffer fosfato pH 7,2	Agar Soya Caseína
-----------------------	-------------------

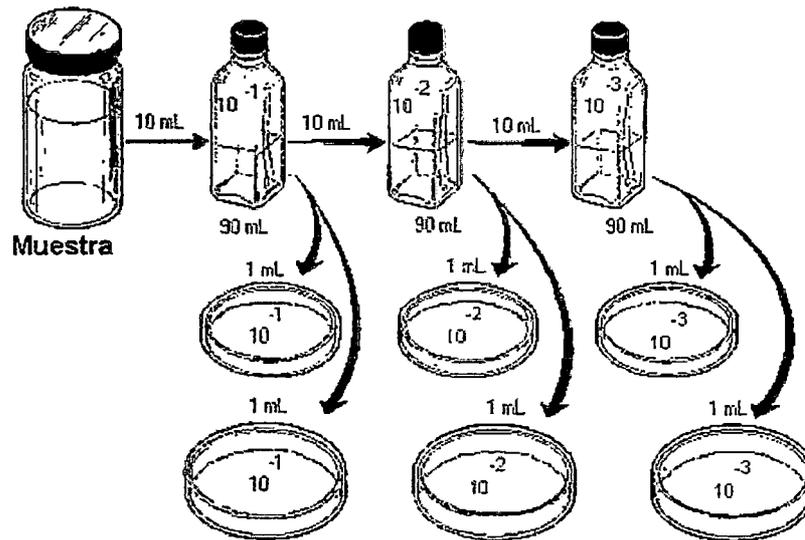
7.3.2.2. RECUENTO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS TOTALES.

Según USP 36 NF 31, para el ensayo de recuento en placa utilizamos el método del vaciado en placa o siembra en profundidad⁴⁰.

PROCEDIMIENTO

- Transferir 10 g o 10 mL de la muestra y añadirlos a un frasco de dilución que contiene 90 mL de buffer fosfato pH 7,2 estéril. Agitar el frasco vigorosamente (25 veces) o hasta homogenizar. Rotular 10-1.

- b) Con una pipeta Pasteur y con el uso de las tiras indicadoras de pH determinar el pH de la dilución anterior. El mismo debe estar entre 6 y 8.
- c) Transferir con una pipeta estéril, 10 mL de la dilución 10-1 a un frasco de dilución con 90 mL de buffer fosfato pH 7,2 estéril. Agitar. Rotular 10--2.
- d) Transferir con una pipeta estéril, 10 mL de la dilución 10-2 a un frasco de dilución con 90 mL de buffer fosfato pH 7,2 estéril. Agitar. Rotular 10--3.
- e) Con una pipeta estéril, transferir porciones de 1 mL de la dilución 10-1 a cada una de 2 placas de Petri estériles.
- f) Con una pipeta estéril, transferir porciones de 1 mL de la dilución 10-2 a cada una de 2 placas de Petri estériles.
- g) Con una pipeta estéril, transferir porciones de 1 mL de la dilución 10-3 a cada una de 2 placas de Petri estériles.
- h) Verter en cada una de las placas, 15 mL de Agar Soya Caseína, fundido y enfriado a 45°C, mezclando cuidadosamente las muestras con el agar. Dejar solidificar e incubar en posición invertida a $32,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$ por 3 a 5 días.



Esquema para el Recuento de Microorganismos Aerobios Totales.

7.4. ESTUDIO FARMACOLÓGICO: QUEMADURAS DE TERCER GRADO

7.4.1. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

➤ MATERIALES

- Beacker
- Termómetro
- Plancha calefactora
- Hoja de bisturí
- Pinza

➤ REACTIVOS:

- Pentobarbital
- Metamizol Sódico
- Yodopovidona
- Crema depiladora Depile®
- Formol

7.4.2. GRUPOS DE EXPERIMENTACION:

Se utilizó 21 ratas adultas jóvenes de la cepa Holtzman obtenidas del Instituto Nacional de Salud (INS), de peso 200 ± 5 g.

Cada 3 ratas formó parte de los grupos siguientes:

- Grupo 1: Fracción Etérea
- Grupo 2: Fracción Diclorometánica
- Grupo 3: Fracción Acetato
- Grupo 4: Fracción Acuosa
- Grupo 5: Extracto total
- Grupo 6: Control Positivo (Sulfadiazina de plata)
- Grupo 7: Control Negativo (Vehículo del ungüento)

Cada rata permaneció en una jaula individual, sujeta a un ciclo de luz oscuridad de 12/12 horas.

Aspectos éticos: Los procedimientos se realizaron siguiendo los principios éticos de la experimentación animal del International Council for Laboratory Animal Science.

7.4.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL:

Se procedió a cortar el pelo del dorso y se les aplicó una crema depiladora (Depile®) en la región dorsal. Previo al proceso de quemado fueron anestesiados con Pentobarbital 6.5% (dosis de 1ml/Kg) vía intraperitoneal. Con el animal adecuadamente anestesiado se procedió a desinfectar el área depilada con Yodopovidona al 1%, y consecutivamente con la ayuda de una barra de aluminio sólido de 1.8 cm de diámetro,

previamente calentado en agua hirviendo, alcanzando los 100°C (medido con un termómetro), se mantuvo en contacto con la piel del animal en la región proximal dorsal durante 15 segundos. La presión ejercida sobre la piel del animal correspondió a 50 g de aluminio. Inmediatamente después del procedimiento, se trató con metamizol sódico (40mg/Kg) por vía intramuscular. Se mantuvo, durante tres días consecutivos con metamizol sódico a 200 mg/Kg administrado por vía oral en el agua potable que se suministró a los animales⁴¹.

La quemadura inducida en los grupos 1, 2, 3, 4 y 5 del cuadrante izquierdo se trató con el ungüento al 1% y la del cuadrante derecho fue tratada con el ungüento al 5%. El tratamiento comenzó a las 24 horas después de la lesión de quemadura⁴².

7.4.4. MEDICIÓN MACROSCÓPICA:

Las heridas fueron tratadas dos veces al día. Para cuantificar la tasa de curación de la herida, se determinó el tamaño de las lesiones en 1, 7 y 14 días, midiendo los bordes de la herida en dirección craneocaudal y lateromedial con una regla milimetrada⁴¹.

Análisis estadístico: Se realizará un análisis descriptivo de la distribución de las variables en los grupos; la prueba de la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Dumm. Las diferencias consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

7.4.5. ESTUDIO HISTOLOGICO:

En los tiempos preestablecidos para biopsia (7 y 14 días después de la inducción de la quemadura), se seleccionó al azar una rata de cada grupo y se les realizó la eutanasia por vía intraperitoneal con Pentobarbital sódico 6.5% (100mg/Kg).

Las muestras de tejido se fijaron inmediatamente por inmersión en formaldehído al 1% (v/v). El análisis histológico fue realizado por un patólogo independiente y el resultado se sometió a la siguiente evaluación. (1) respuesta inflamatoria, caracterizada por la presencia de leucocitos polimorfonucleares (PNM), (2) tejido granular, caracterizado por el presencia de fibroblastos, miofibroblastos, y neovascularización, (3) la fibrosis, que se caracteriza por la densidad de las fibras de colágeno identificados por la intensidad del color azul. La puntuación se realizó para todos los parámetros evaluados de la siguiente manera: - = ausente, + = presencia leve, ++ = moderada presencia y +++ = fuerte presencia⁴³

VIII. RESULTADOS

CUADRO N°1: Metabolitos secundarios presentes en el Extracto Etanólico de las hojas de *Munnozia hastifolia* (Poepp.) H. Rob. & Brettell.

FRACCIONES	METABOLITOS	RESULTADO
FRACCION A	Taninos	-
	Aminoácidos	+
	Catequinas	+
	Flavonoides	+
FRACCION B	Esteroides y/o triterpenos	+
	Antraquinonas	-
FRACCION C	Esteroides y/o triterpenos	+
	Alcaloides	+
FRACCION D	Flavonoides	+
	Catequinas	+
	Esteroides y/o triterpenos	+
	Alcaloides	-
FRACCION E	Flavonoides	+
	Catequinas	+
FRACCION F	Saponina	-

Fuentes: Datos del Autor

CUADRO N°2: Metabolitos secundarios presentes en las fracciones obtenidas de las hojas de *Munnozia hastifolia* (Poepp) H. Rob & Brettell

FRACCIONES	METABOLITOS
ETEREA	Triterpenos y/o esteroides, alcaloides.
DICLOROMETANICA	Triterpenos y/o esteroides, alcaloides.
ACETATO	Triterpenos y/o esteroides, alcaloides, flavonoides y catequinas.
ACUOSA	Flavonoides y catequinas.

Fuentes: Datos del Autor

CUADRO N° 3: Ensayo de solubilidad de las fracciones y extracto total.

MUESTRAS	GLICERINA	PROPILENGLICOL	VASELINA	LANOLINA
Fracción etérea	+	+	+++	+++
Fracción Diclorometánica	++	-	++	+++
Fracción de acetato	+++	+++	+	++
Fracción acuosa	+++	+++	+	+
Extracto total	+	++	++	+++

Fuentes: Datos del Autor

Puntuación: - ausencia; + poco soluble; ++ soluble; +++ muy soluble.

CUADRO N°4: Cualidades organolépticas que presentan los ungüentos al 1% y 5%

UNGÜENTOS	TEXTURA	OLOR	COLOR	ASPECTO
Fracción Etérea	Untuoso tacto	al	Característico	Verde oscuro Homogéneo
Fracción diclorometánica	Untuoso tacto	al	Característico	Verde oscuro Homogéneo
Fracción acetato	Untuoso tacto	al	Característico	Amarillo oscuro Homogéneo
Fracción acuosa	Untuoso tacto	al	Característico	Marrón Homogéneo
Extracto total	Untuoso tacto.	al	Característico	Verde oscuro Homogéneo

Fuentes: Datos del Autor

CUADRO N° 5: Control de pH a los ungüentos obtenidos de las fracciones de las hojas de *Munnozia hastifolia* (Poepp) H. Rob & Brettell

UNGUENTOS	CC	pH*	Punto de fusión**
FRACCION ETEREA	1%	5.5 ± 0.01	45°
	5%	5.0 ± 0.03	46°
FRACCION DICLOROMETANICA	1%	5.8 ± 0.01	46°
	5%	5.1 ± 0.02	46°
FRACCION DE ACETATO	1%	6.0 ± 0.01	45°
	5%	5.4 ± 0.04	45°
FRACCION ACUOSA	1%	6.1 ± 0.00	45°
	5%	6.5 ± 0.01	45°
EXTRACTO TOTAL	1%	6.2 ± 0.01	45°
	5%	5.0 ± 0.04	45°

Fuentes: Datos del Autor

* Nota = Promedio ± Desviación estándar.

** No se evidenció oscurecimiento del material, carbonización, burbujeo u otro incidente.

Los resultados expresados en el cuadro N°5 indican que el pH de las formulaciones son ligeramente ácidos y algunos tienden hacia la neutralidad, siendo compatibles con el pH de la piel (5 – 5.5), impidiendo el desarrollo de microorganismos patógenos.

CUADRO N° 6: Control de Extensibilidad a los ungüentos obtenidos de las fracciones de las hojas de *Munnozia hastifolia* (Poepp) H. Rob & Brettell*

EXTENSIBILIDAD (mm ²)					
		Cc (%)	1° minuto	2° minuto	3° minuto
Peso agregado			4.94 g ± 0.33	4g	5g
Ungüento	Fracción	1%	273.33mm ²	403.08mm ²	557.90mm ²
etérea		5%	314.00mm ²	452.16mm ²	615.44mm ²
Ungüento	Fracción	1%	254.34mm ²	427.41mm ²	586.48mm ²
Extracto total		5%	254.34mm ²	403.08mm ²	557.94mm ²
Ungüento	Fracción	1%	273.33mm ²	427.41mm ²	557.94mm ²
acuosa		5%	217.88mm ²	403.08mm ²	557.94mm ²
Ungüento	Fracción	1%	273.33mm ²	426.90mm ²	557.94mm ²
acetato		5%	200.96mm ²	403.08mm ²	503.82mm ²
Ungüento	Fracción	1%	293.46mm ²	426.90mm ²	585.91mm ²
diclorometano		5%	235.87mm ²	403.08mm ²	503.82mm ²

Fuentes: Datos del Autor

Aunque el área de extensibilidad no se describe como ensayo oficial, constituye un ensayo muy valioso para estimar la consistencia en semisólidos. La extensibilidad en los ungüentos aumentó ligera y gradualmente conforme se le agregaban los pesos correspondientes, lo cual garantiza una óptima extensibilidad sobre la piel.

CUADRO N° 7: Viscosidad de los ungüentos de la fracción acetato de etilo al 1 y 5%.

MUESTRAS	RESULTADO (cP)	N° de Spin	Velocidad de RPM
Ungüento Acetato 1% y 5%	67 990	4	10

Fuentes: Datos del Autor

CUADRO N° 8: Recuento de microorganismos aerobios totales en los ungüentos obtenidos de las fracciones de las hojas de *Munnozia hastifolia* (Poepp) H. Rob & Brettell.

Ungüentos	Cc (%)	Dilución	Colonias por cuadrante homogéneo	Promedio de colonias por muestra ufc/g	
Ungüento Fracción Etérea	1	10 ⁻¹	56	224	
		10 ⁻²	41	164	
		10 ⁻³	29	116	
	5	10 ⁻¹	79	316	
		10 ⁻²	42	168	
		10 ⁻³	34	136	
	Ungüento Fracción Diclorometánica	1	10 ⁻¹	51	204
			10 ⁻²	40	160
			10 ⁻³	31	124
5		10 ⁻¹	47	188	
		10 ⁻²	35	140	
		10 ⁻³	29	116	
Ungüento Fracción de Acetato		1	10 ⁻¹	24	96
			10 ⁻²	15	60
			10 ⁻³	1	4

		5	10^{-1}	28	112
			10^{-2}	16	64
			10^{-3}	2	8
Ungüento	Fracción	1	10^{-1}	31	124
Acuosa			10^{-2}	14	56
			10^{-3}	2	8
		5	10^{-1}	34	136
			10^{-2}	17	68
			10^{-3}	3	12
Ungüento	Fracción	1	10^{-1}	21	84
extracto total			10^{-2}	15	56
			10^{-3}	10	40
		5	10^{-1}	18	72
			10^{-2}	15	60
			10^{-3}	13	52

Fuentes: Datos del Autor

Nota: El criterio de aceptación para bacterias según USP es $<10^2$ ufc/g equivalente a 200, según

USP 36 NF 31³⁹.

Según los criterios de aceptación para preparaciones farmacéuticas cutáneas los ungüentos cumplen con el criterio de aceptación para bacterias según USP 36, sin embargo algunos ungüentos como el de la fracción etérea al 1% y 5% en la dilución 10^{-1} , y el ungüento de la fracción diclorometánica al 1% en la dilución 10^{-1} no cumplen con los criterios de aceptación establecidos por la farmacopea para formas farmacéuticas de aplicación cutánea.

CUADRO N°9: Promedios de disminución del área de la herida en ratas sometidas a quemaduras de tercer grado al séptimo día de tratamiento.

GRUPOS	cc (%)	N	Día 1 de tratamiento (mm ²)	Día 7 de tratamiento Promedios (mm ²)
Fración Etérea	1	2	254.47	122.03 ± 3.01
	5	2	254.47	127.24 ± 3.61
Fración	1	2	254.47	128.47 ± 4.32
Diclorometánica	5	2	254.47	134.65 ± 8.99
Fración Acetato de Etilo	1	2	254.47	100.47 ± 0.93
	5	2	254.47	101.79 ± 1.09
Fración acuosa	1	2	254.47	112.65 ± 3.47
	5	2	254.47	124.00 ± 4.64
Extracto Total	1	2	254.47	133.80 ± 2.48
	5	2	254.47	137.15 ± 2.20
Control +		2	254.47	100.37 ± 1.02
Control -		2	254.47	143.68 ± 1.67

Fuentes: Datos del Autor

Según la prueba de Kruskal- Wallis y test de Dumm

Control +: Sulfadiazina de Plata

Control -: Vaselina + lanolina

Área del objeto metálico: 254.47 mm²

Según el estudio macroscópico las ratas presentaron los tres primeros días supuración ligera, inflamación en la región afectada. Se manifestó un apetito

disminuido y un estado general deprimido. Estas manifestaciones disminuyeron gradualmente en el transcurso de la semana con tratamiento de los ungüentos.

Al séptimo día, los animales que fueron tratados con el ungüento de la fracción acetato al 1% y 5% manifestaron una disminución significativa del diámetro del área quemada siendo de $100.47 \pm 0.93\text{mm}^2$ y $101.79 \pm 1.09\text{mm}^2$ respectivamente vs. Sulfadiazina de plata que fue de $100.37 \pm 1.02\text{mm}^2$.

CUADRO N°10: Resultados histológicos de la biopsia de la piel realizada a los 7 días de tratamiento con los ungüentos.

	TRATAMIENTO POR 7 DÍAS											
	Fracción Etérea		Fracción Diclorometano		Fracción Acetato		Fracción Acuosa		Extracto Total		Sulfadiazina de plata	Vehículo
	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	-
Epitelización	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Infiltrado inflamatorio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
Macrófagos	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
Linfocitos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
Proliferación vascular	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
Fibroblastos	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
Fase	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	I

Puntuación: - = ausente, + = presencia leve, ++ = moderada presencia y +++ = fuerte presencia.

Fase proliferativa: P

Fase Inflamatoria: I

Fuentes: Datos del Autor

Al séptimo día de tratamiento observamos disminución del grado de inflamación, formación de costra; además, los animales recobraron el apetito y el estado general mejoró notablemente. Los estudios histológicos demuestran que todos los grupos

tratados con los ungüentos de las fracciones se encuentran en la fase proliferativa, presentando macrófagos, linfocitos, fibroblastos e infiltrado inflamatorio.

CUADRO N°11: Promedios de disminución del área de la herida en ratas sometidas a quemaduras de tercer grado al día 14 de tratamiento.

GRUPOS	cc	N	Día 1 de tratamiento	Día 7 de tratamiento	Día 14 de tratamiento
	(%)		(mm ²)	Promedios (mm ²)	Promedios (mm ²)
Fracción Etérea	1	2	254.47	122.03 ± 3.01	50.28 ± 2.96
	5	2	254.47	127.24 ± 3.61	55.76 ± 6.66
Fracción	1	2	254.47	128.47 ± 4.32	45.98 ± 7.26
Diclorometánica	5	2	254.47	134.65 ± 8.99	51.95 ± 4.08
Fracción	1	2	254.47	100.47 ± 0.93	38.73 ± 2.77
Acetato de Etilo	5	2	254.47	101.79 ± 1.09	40.22 ± 3.17
Fracción acuosa	1	2	254.47	112.65 ± 3.47	44.53 ± 0.99
	5	2	254.47	124.00 ± 4.64	55.14 ± 2.36
Extracto Total	1	2	254.47	133.80 ± 2.48	50.71 ± 2.95
	5	2	254.47	137.15 ± 2.20	53.69 ± 1.81
Control +		2	254.47	100.37 ± 1.02	36.40 ± 2.58
Control -		2	254.47	143.68 ± 1.67	65.98 ± 4.25

Fuentes: Datos del Autor

Según la prueba de Kruskal- Wallis y test de Dumm

Control +: Sulfadiazina de Plata

Control -: Vaselina + lanolina

Área del objeto metálico: 254.47 mm²

Al día 14 de tratamiento, macroscópicamente se demostró la epitelización completa de la piel, con el uso de los ungüentos obtenidos de las fracciones etérea, diclorometánica y acetato de etilo al 1%, siendo más eficaz el ungüento de la fracción de acetato en sus ambas concentraciones al 1% y 5% los cuales manifestaron una disminución significativa del diámetro del área quemada siendo de $38.73 \pm 2.77 \text{ mm}^2$ y $40.22 \pm 3.17 \text{ mm}^2$ respectivamente.

CUADRO N°12: Resultados histológicos de la biopsia de la piel realizada a los 14 días de tratamiento con los ungüentos.

Observaciones	TRATAMIENTO POR UNGUENTOS											
	Fracción Etérea		Fracción Diclorometánica		Fracción Acetato		Fracción Acuosa		Extracto Total		Sulfadiazina de plata	Vehículo
	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%		
Epitelización	Completa	Parcial	Completa	Parcial	Completa	Completa	Completa	Parcial	parcial	Parcial	Completa	-
Infiltrado inflamatorio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macrófagos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bandas de colágeno	Completa	Parcial	Completa	Parcial	Completa	Completa	Completa	Parcial	parcial	Parcial	Completa	Parcial
Linfocitos	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Proliferación vascular	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Fibroblastos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fase	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	P

Puntuación: - = ausente, + = presencia leve, ++ = moderada presencia y +++ = fuerte presencia.

Fase de Epitelización: E

Fase de Proliferación: P

Fuentes: Datos del Autor

Al día 14 de tratamiento, se apreciaron bandas de colágeno gruesas, a nivel de la dermis de forma completa. En los demás ungüentos al 5% se encontró la presencia de fibroblastos, linfocitos, tejido celular subcutáneo sin alteraciones y ausencia de macrófagos e infiltrado inflamatorio.

IX. DISCUSION

Los controles de calidad, demostraron que los ungüentos de la fracción acuosa al 1% y 5% y los demás ungüentos al 1% poseen un pH que se encuentran dentro del rango permitido para formulaciones tópicas que es de 5.5 – 7^{44,35}, excepto los ungüentos de la fracción etérea, diclorometánica, acetato de etilo y extracto total al 5%. Esto puede deberse a la naturaleza de los metabolitos afines a estas fracciones^{45,46}.

El punto de fusión de los ungüentos se encuentra entre 45° – 46° C, según la USP 36 "... una transición de fusión puede ser instantánea para un material altamente puro, pero por lo general se observa un intervalo desde el comienzo hasta el final del proceso..."³³, Por lo tanto los ungüentos en estudio demuestran alta pureza, eficaz difusión de calor y alta velocidad de calentamiento.

La viscosidad alcanzada de los ungüentos de la fracción acetato fue de 67 990. Según un estudio realizado a la viscosidad de los vehículos en ungüentos con un agente terapéutico modelo, se demuestra que la vaselina blanca y amarilla alcanzan una viscosidad de 64,7199 y 24 187 respectivamente, demostrando que la viscosidad en los vehículos puede ser variante según el fabricante, siendo en este estudio la vaselina blanca la que le dio mayor coeficiente de difusión al agente terapéutico modelo⁴⁷.

La cicatrización es un proceso dinámico, interactivo en el cual participan mediadores extracelulares, células sanguíneas, células de la matriz tisular, y del parénquima. El proceso de reparación de heridas se ha dividido en fases, las cuales ocurren de manera secuencial: "hemostasia", "inflamatoria", "proliferativa o de granulación", de "epitelización" y de "remodelación"⁴⁸.

Según los datos histológicos, al 7^{mo} día de tratamiento no se observa diferencias significativas entre los grupos tratados con las fracciones, encontrándose en la fase proliferativa o de granulación. La hipoxia en el centro de la herida, favorece la liberación de factores de crecimiento estimulantes de la proliferación de fibroblastos.

Al día 14 de tratamiento, histológicamente se demuestra que todas las fracciones se encuentran en la fase de epitelización siendo la fracción de acetato al 1% y 5% la que presenta regeneración de la epidermis completa en ambas proporciones, a diferencia del resto de las fracciones que solo presentaron este resultado al 1%. Este resultado puede deberse a la presencia de flavonoides y catequinas, como se demostró en la identificación de metabolitos secundarios realizada a esta fracción. Estos compuestos son conocidos por actuar aumentando la resistencia de vasos sanguíneos y disminuyendo su permeabilidad, lo que favorece la irrigación sanguínea de zonas lesionadas. Permitiendo oxigenación adecuada y acelerando la reparación cutánea⁴⁹. La facilidad de difusión de estos compuestos puede deberse a su capacidad de formar enlaces de hidrógenos, según Roberts y col., en un estudio sobre la presencia de grupos capaces de formar enlaces de hidrógenos y su importancia en la penetración de estas moléculas a través del estrato córneo concluyen que la lipofilia es muy importante en el reparto en el estrato córneo de la sustancia, pero la capacidad del soluto para formar enlaces de hidrógeno es el principal determinante de su difusión a través del estrato córneo^{50, 51}.

La eficacia del ungüento obtenido de la fracción de acetato de etilo podría deberse, además de los flavonoides y catequinas, a la presencia de triterpenos y/o esteroides.

Según Osorio, los triterpenos facilitan la síntesis de nuevo tejido conjuntivo (colágeno/elastina). Cada uno de ellos, han demostrado (in vitro) estimular la activación

fibroblástica y la producción de colágeno I y III, clave en la curación de heridas, por su consecuente efecto reepitelizante. El mecanismo de acción parece ser doble. Por un lado, aumentan la síntesis de colágeno y de ácidos mucopolisacáridicos y, por otro, inhiben la fase inflamatoria de cicatrices hipertróficas y queloides⁵³.

Un factor coadyuvante para lograr la eficacia de los ungüentos pudieron ser los vehículos utilizados (vaselina blanca y lanolina). Según Wiechers, menciona que también el vehículo puede interaccionar con los componentes de la membrana modificando su viscosidad y la ordenación de sus constituyentes, desarrollando un efecto oclusivo que incrementará el grado de hidratación del estrato córneo⁵².

Se observa que los demás ungüentos de las fracciones de éter, diclorometano y acuoso promovieron una epitelización completa al 1% y parcial al 5%. Se podría considerar como dosis de elección al ungüento al 1%. El extracto total presentó epitelización parcial en ambas concentraciones.

X. CONCLUSIONES

1. Las fracciones etérea y diclorometánica obtenidas de las hojas de *Munnozia hastifolia* (Poepp) H. Rob & Brettell presentan triterpenos y/o esteroides, alcaloides, flavonoides y catequinas; la fracción acuosa presenta flavonoides y catequinas y la fracción de acetato de etilo presenta todos los metabolitos mencionados.
2. Se elaboraron ungüentos a partir de las fracciones de éter, diclorometano, acetato de etilo y acuoso al 1% y 5%,
3. Los ungüentos al 1% y 5% elaborados a partir de las fracciones de *Munnozia hastifolia* cumplen con los controles de calidad establecidos por THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA (USP 36 NF 31).
4. Los ungüentos elaborados a partir de la fracción de acetato de etilo al 1% y 5% presentan mayor eficacia tópica, siendo de este ungüento la concentración al 1% la más efectiva en la curación de quemaduras de tercer grado en ratas Holtzman.

XI. REFERENCIAS

- 1.- Abad P, Acosta V, Martínez J, Lloret B, Patiño L, Gubern J, et al. Quemaduras en la infancia: Tendencia social a las puertas del 2000. *CirPediatr (Barc)*.2000; (13): 97-101.
- 2.- Informe Mundial sobre la Prevención de las lesiones en los niños. Organización Mundial de la Salud. EUA: OMS; 2008. Serie de informe Técnico; 87-93.
- 3.-American Burn Association. National Burn Repository 2011 Report.Recuperado del sitio: <http://www.ameriburn.org/2011NBRAnnualReport.pdf>.
- 4.-Villegas C. Jorge. Avances en el tratamiento del Gran quemado. Servicio de Cirugía Plástica y Quemados del Hospital Nacional Arzobispo Loayza. Internet).2013 [citado 13 Feb 2013];78(1):1-5. Disponible en: <http://www.medynet.com/usuarios/jraguilar/Manual%20de%20urgencias%20y%20Emergencias/quemadur.pdf>
- 5.- Asociación de Ayuda al Niño Quemado (ANIQUEM). Quemados, Hospitalizados a Nivel Nacional. Recuperado del sitio: <http://www.aniquem.org/quemados-hospitalizados.html>.
- 6.- Kumar V., Abbas A., Fausto N. Patología estructural y funcional.7a ed. España. El Sevier. 2005. p. 56-59.
7. - Frulle F.; Saenz V; “The side effects of silver sulfadiazine”. *Journal of Burn Care& Research*: 2001(30); 464-470.
- 8.- Alain F, Victoria M, Francois R, Jean C, André C, Reynald H. Antiprotozoal Activity of Dehydrozaluzanin C, a Sesquiterpene Lactone Isolated from *Munnoziamaronii*

(Asteraceae). *Phytotherapy Research* [Internet]. 2006 [1 Feb 2006]; Vol. 7. 111-115.

Disponible en:<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.2650070203/abstract>

9.- Villanueva E., Tito A., Flores D., Gómez R., Almanza G. Estudio Fitoquímico y Espectroscópico preliminar de cinco plantas medicinales de Carmen pampa (Coroico) Bolivia. *Bol.* 2009; 29(2): 7-12.

10.- Gutiérrez S.; Hernández P.; Huamaní L.; Mirano M.; Pongo E. Estudio fitoquímico y efecto antiulceroso de las fracciones obtenidas del extracto etanólico a partir de las hojas de *Munnozia hastifolia* (Poepp) H. Rob. & Bretell “alas de murciélago”. Ponencia presentada en el congreso de farmacia y bioquímica (Cajamarca). Perú: Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica, Facultad de farmacia y bioquímica; 2012.

11.- Pongo, E; Hernández, P; Herrera, K.; Huamaní, L.; Mirano, M. Actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *Munnozia hastifolia* (Poepp) H. Rob & Bretell. Ponencia presentada en el congreso de farmacia y bioquímica (Cusco.) Perú: Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica, Facultad de farmacia y bioquímica; 2013.

12.- Carlos E., Felipe L., Ramírez N., Vélez K. Fisiopatología del paciente quemado. 2010(42): 57-58.

13.- Gonzales; R. Modelos experimentales para la evaluación de la acción cicatrizante de medicamentos. *Rev. Cubana de Farmacia.* 2002; 36(3):189-96.

14.- Ramírez, G. Fisiología de la cicatrización cutánea. *Revista facultad de salud – RFS – Universidad Sur colombiana – Neiva – Huila* 2010; 2 (2): 69 – 78.

- 15.- P. Abad, D. Acosta, V. Martínez Ibáñez, J. Lloret, B. Patiño, Ll. Gubern, J. Carol, J. Boix Ochoa. Quemaduras en la infancia. Tendencia social a las puertas del 2000. *CirPediatr* 2000; 13: 97-101.
- 16.- Frulle F.; Saenz V; “The side effects of silver sulfadiazine”. *Journal of Burn Care& Research*: 2001(30); 464-470.
- 17.- Fernández J.; Diego G.; Sandoval G.; “Quemaduras en la infancia. Valoración y tratamiento”. *Boletín de la sociedad de pediatría de Asturias, Cantabria, Castilla y León*. 20010 (3) ; 99-105.
- 18.- Benaim F: Enfoque global del tratamiento de las quemaduras. En: Coiffman F (ed), *Cirugía Plástica Reconstructiva y Estética*. Barcelona, Masson– Salvat, 1994: 443-96
- 19.- Jayo J., Cisneros J. Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio *National Research Council* [Internet]. 1996 [30 Jul 2000]; 3(1): 63-72.
- Disponible en:
http://www.fcb.unl.edu.ar/media/Investigacion/Guia_cuidado_uso_animales_laboratorio.pdf
20. Ores, A; Anicama, K; Argumedo, L; Atanacio, M & Astocondo, M. Complicaciones en pacientes quemados hospitalizados en el Instituto Nacional de Salud del Niño, 53. Lima: 2010 (1); 26-28.
- 23.- Michael O. Dillon New records in the Asteraceae flora of Peru. *Botany Department. The Field Museum. Chicago. Araldoa* : 20061 (2); 314 – 317
- 24.- Kuklinski C. *Farmacognosia –Estudio de las drogas medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Omega S.A, 2003. p. 36-40.

- 25.- Baltodano L., Yaipen J. Obtención, caracterización y diseño de una forma farmacéutica semisólida (ungüento) a base de quitosano con efecto cicatrizante (tesis). Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos;2006.
- 26.- Illegas, J. Quemaduras. Trauma. Manejo Avanzado. Chile: 1995 (2);163-169.
- 27.- - Sharapin N, Machado L, Souza E, de Albuquerque E, Valverde E, López JM. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos.2000; 86(8): 198-200.
- 28.- Molina Y. Estudio etnobotánico y etnofarmacológico de plantas medicinales de Tambopata. Madre de Dios, Perú: 2012 (2); 45-46.
- 29.-. United States Pharmacopeia. Test of formulation 36a ed. NF 31. Forma Farmaceutica . Rockville: USP; 2013 <1151>; 958.
30. United States Pharmacopeia. Test of formulation 36a ed. NF 31. Información General/ Desempeño de Excipientes . Rockville: USP; 2013 <1059>; 731.
- 31.- United States Pharmacopeia. Test of formulation 36a ed. NF 31. Información General / Formas Farmacéuticas . Rockville: USP; 2013 <1052>; 959.
- 32.- Remington, F. Medica Panamericana, Madrid.2013; 1(20) 1203 – 1207.
- 33.- United States Pharmacopeia. Test of formulation 36a ed. NF 31. Pruebas físicas/Preparación Magistral-preparaciones No estériles. Rockville: USP; 2013 <791>; 384.
- 34.- Guevara, A. Características Epidemiológicas y Microbiológicas de los niños con quemaduras ingresados a la sala de quemados en el HEODRA. León. Universidad Nacional Autónoma, Nicaragua: 2066 (4); 76-78.
- 35.- United States Pharmacopeia. Test of formulation 36a ed. NF 31. Pruebas físicas/Viscosidad. Rockville: USP; 2013 <911>; 473.

- 37.- United States Pharmacopeia. Test of formulation 36a ed. NF 31. Rockville: USP; 2013.
- 38.- United States Pharmacopeia. Microbiological test Microbiological examination of nonsterile Products. 36 ed. NF 31. Rockville: USP; 2013.
- 39.- Tavares D, Lima M, Pontes N, Carneiro A, Dos Santos M. Development of Animal Model for Studying Deep Second-Degree Thermal Burns. Brazil: Journal of Biomedicine and Biotechnology; 2012.
40. Khorasani G., Hosseinimehr S., Zamani P., Ghasemi M., Ahmadi A. El efecto de azafrán (*Crocus sativus*) para la curación de quemaduras de segundo grado en ratas. *Keio J Med* 2009; 57(4):190-195.
- 41.- Pacci K., Nureña L., Vásquez J., Araujo G., Gálvez M. Eficacia tópica de *Myrciaria dubia* en la curación de quemaduras de segundo grado en ratas *Holtzman*. 2009; 1(14):17
42. Bonifaz F, Bautista M. Preparación y caracterización de extractos de Chocho: Evaluación in vivo de la actividad antibacteriana, 2007. p. 63-65.
- 43.- Arteaga, José M. Bretón, José Luis Fraga, Braulio M. González A.G. Real Sociedad Española de Física y Química *Anales de Química* 66(2): pp. 181-184
- 44.- Hurtado F.; Guzmán V; "Regeneración y cicatrización". *Journal of Burn Care & Research*: 2006(12); 125-126.
- 45.- Pérez L., Noruega L., Vasto J., Andre G., Gálvez M. Cicatrización: Proceso de reparación tisular. *Aproximaciones terapéuticas*, 2004 .p.56-58.
- 46.- Ramírez, G. Fisiología de la cicatrización cutánea. *Revista facultad de salud – RFS* julio – diciembre 2010 – Universidad Sur colombiana – Neiva – Huila. 2010; 2 (2) 69.

47. Muñoz, C., Jurgens, K. & Pard, J. Investigación de extractos de plantas medicinales usadas por sus propiedades cicatrizantes. *Revista Ciencia Joven*. 2012; (1) 59-62 .
- 48- Schmidt, C; Fronza, M; Goettert, M; Geller, F; Luik, S; Flores, EMM; Bittencourt,CF; Zanetti, GD; Heinzmann, BM; Laufer, S y Merfort, I. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *J. Ethnopharmacol*. 2009; 122: 523 –532.
- 49.-Sánchez, S. R. Flavonoides con actividad antitumoral: Identificación y estudio del mecanismo de acción. Universidad de las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, 2009.
50. Zippel, J; Deters, A y Hensel, A. Arabinogalactans from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) poiret bark as active principles for wound-healing properties: Specific enhancement of dermal fibroblast activity and minor influence on HaCaT keratinocytes. *J. Etnopharmacol*. 2009; 124: 391 – 396.
51. Albert, Roberts y col. *Molecular Biology of the cell*. 3era Ed. Garland Publishing, 1994. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>.
52. Suñé JM, Cerezo A. Reología en pomadas. Revisión de métodos para su estudio. *Arch Pharm* 1967;(2) :283-92.
- 53.- Osorio J,.Tratado de fitofármacos y Nutraceuticos: Centella asiática. *Revista Fitoterapia* 28(5): 100-101.

ANEXOS

GRAFICO N°1: Esquema del tamizaje fitoquímico realizado a las hojas de *Munnozia hastifolia* (Poepp) H. Rob & Brettell

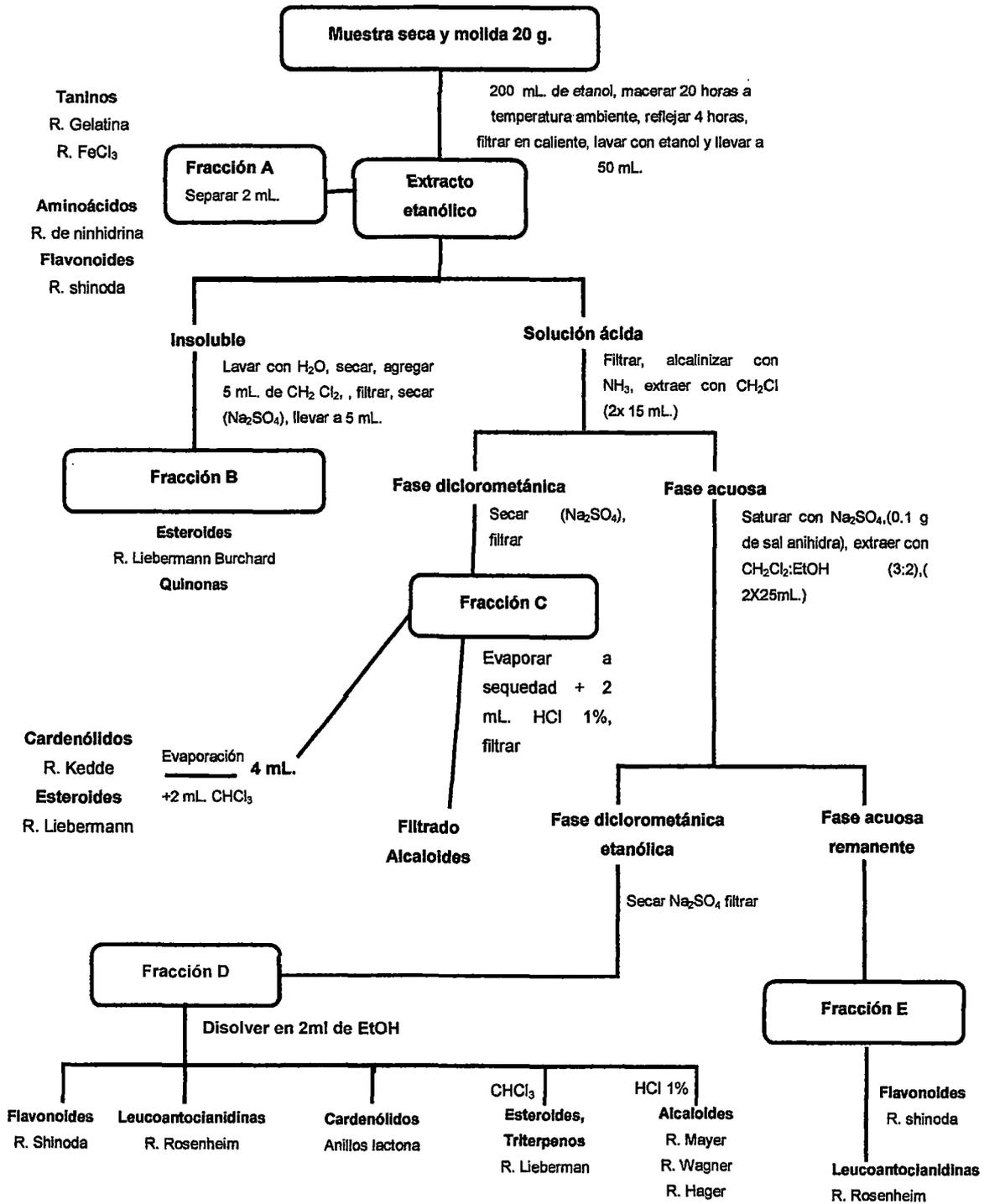


GRAFICO N°2: Fraccionamiento con solventes de diferente polaridad a partir del extracto total de las hojas de *Munnozia hastifolia* (Poepp) H. Rob & Brettell

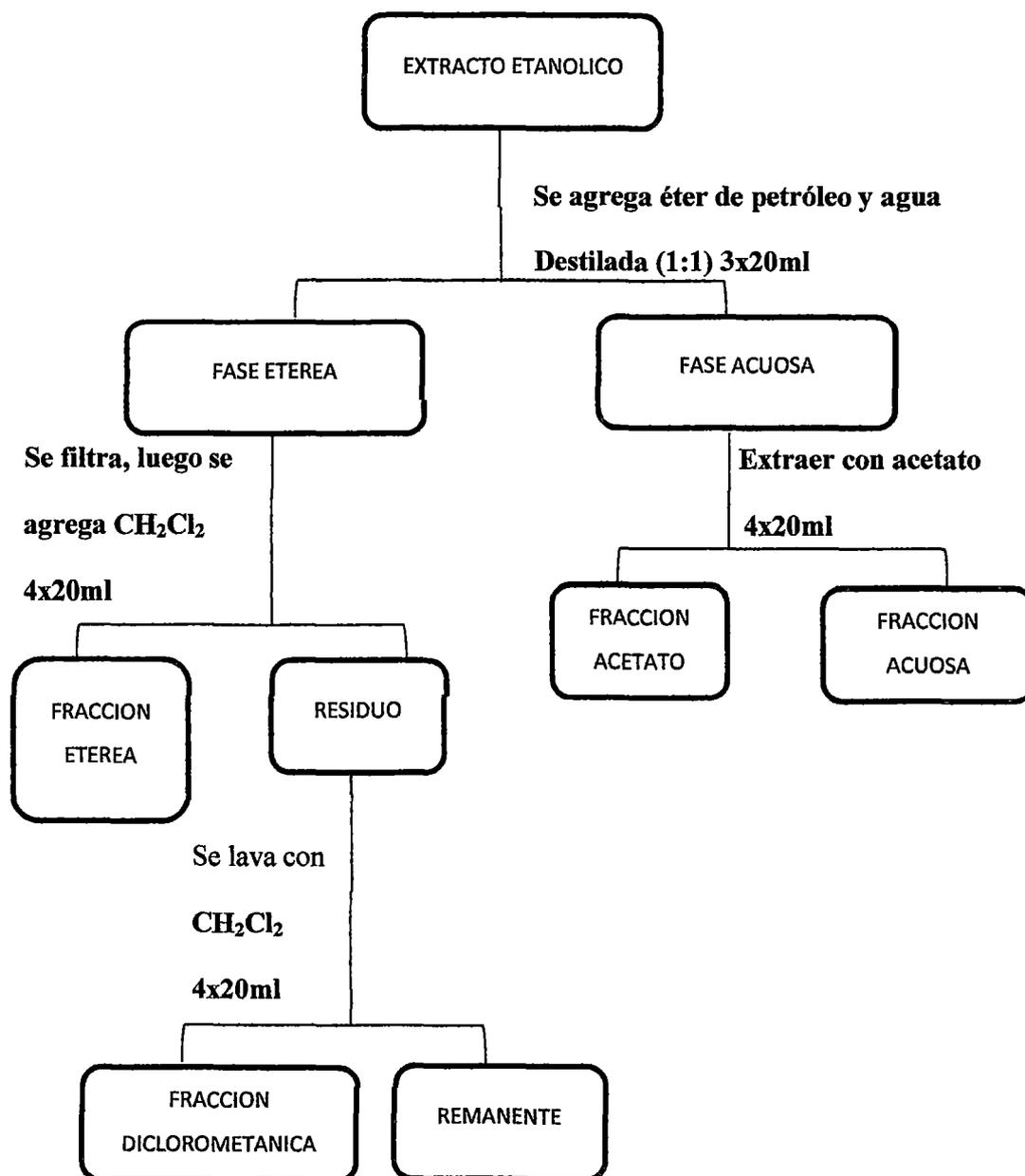


GRAFICO N° 3: Ungüentos elaborados a partir de las hojas de *Munnozia hastifolia*

(Poepp) H. Rob & Brettell (Poepp) H. Rob & Brettell

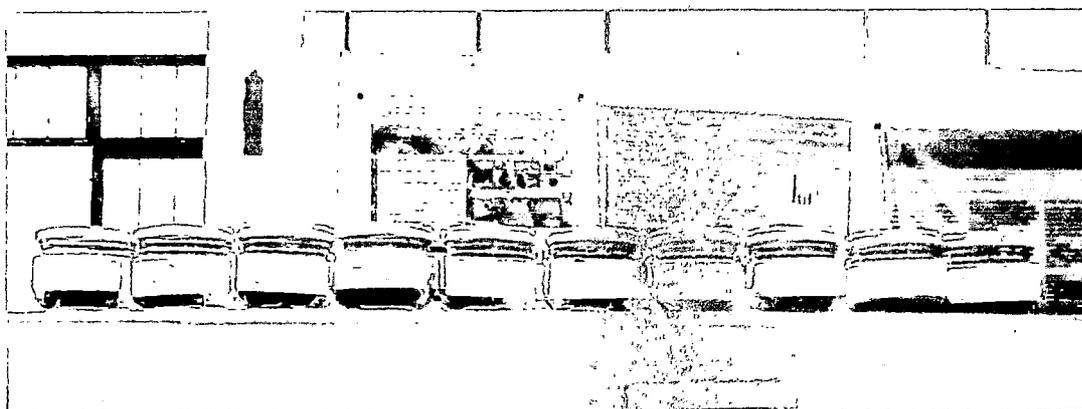


GRAFICO N° 4: Resultado macroscópico del tratamiento con los ungüentos obtenidos de las hojas de *Munnozia hastifolia*, en quemaduras de tercer grado, al día 7 y 14 de tratamiento.

UNGÜENTOS	Día 7 de tratamiento		Día 14 de tratamiento	
	1	5	1	5
FRACCIÓN ACETATO				

UNGÜENTOS	Día 7 de tratamiento		Día 14 de tratamiento	
	1	5	1	5
FRACCIÓN ETEREA				
FRACCIÓN DICLOROMETANICA				
FRACCIÓN ACUOSA				
UNGÜENTO EXTRACTO TOTAL				

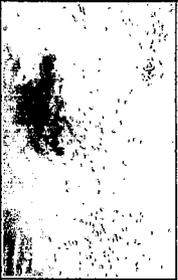
UNGÜENTOS	Día 7 de tratamiento	Día 14 de tratamiento
SULFADIAZINA DE PLATA		
CONTROL -		

GRAFICO N° 4: Resultado microscópico del tratamiento a los 7 y 14 días de tratamiento con los ungüentos obtenidos de la fracción etérea al 1% y 5%.

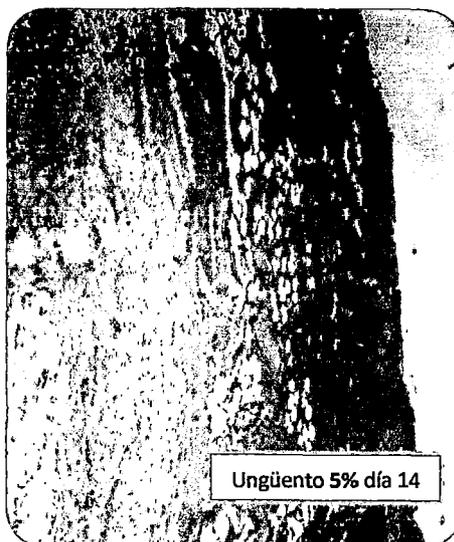
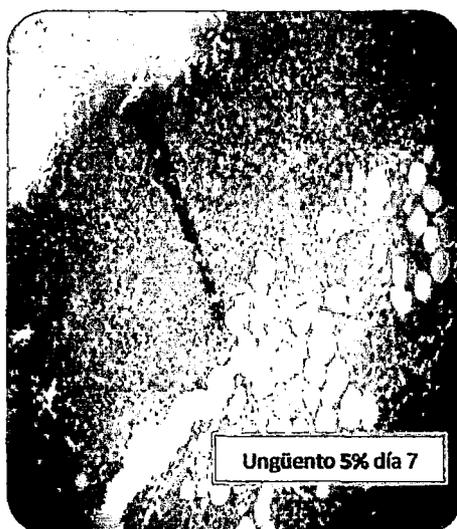
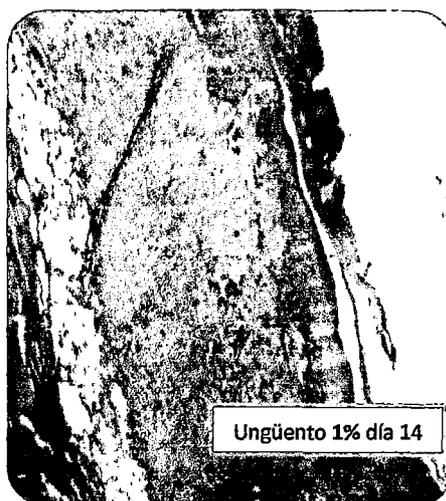
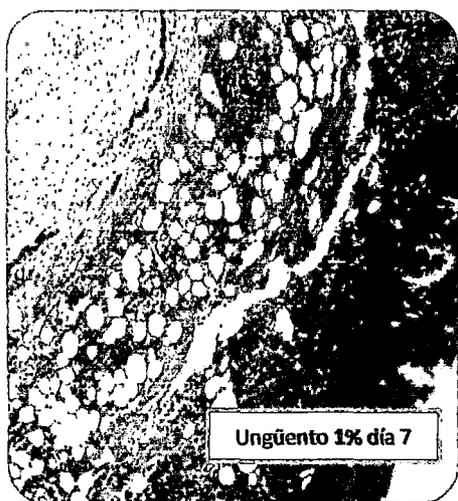


GRAFICO N° 5: Resultado microscópico del tratamiento a los 7 y 14 días de tratamiento con los ungüentos obtenidos de la fracción diclorometánica al 1% y 5%.

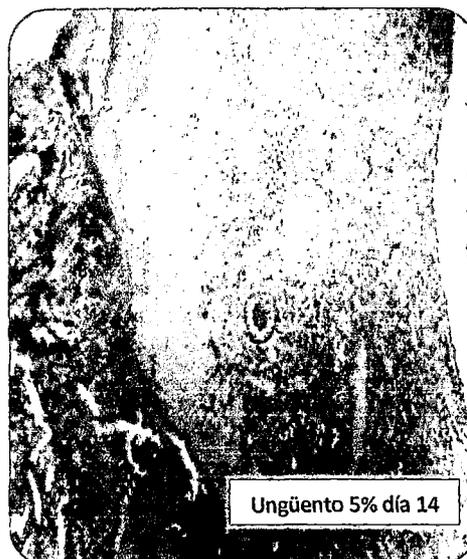
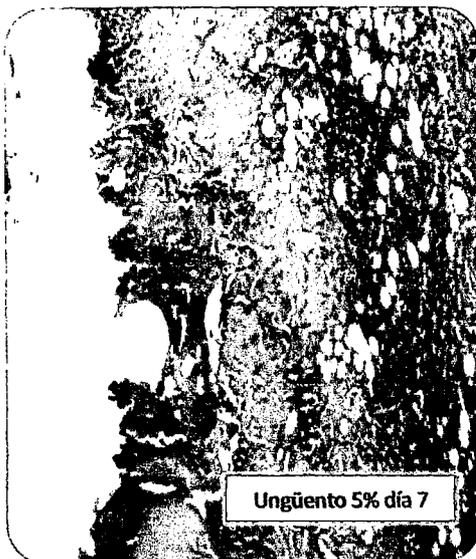
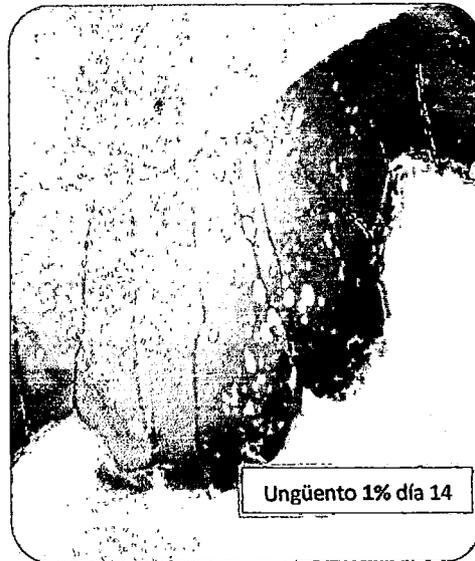
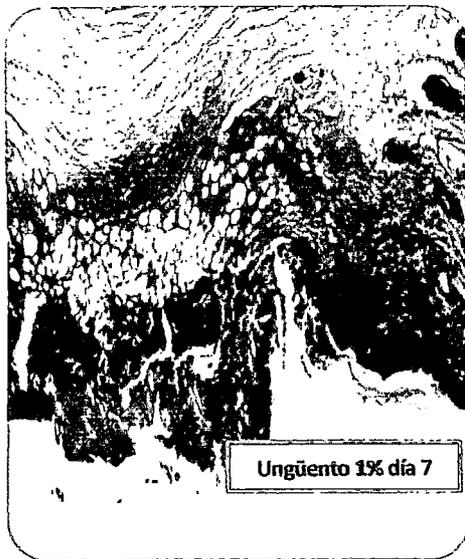


GRAFICO N° 6: Resultado microscópico del tratamiento a los 7 y 14 días de tratamiento con los ungüentos obtenidos de la fracción acetato de etilo al 1% y 5%.

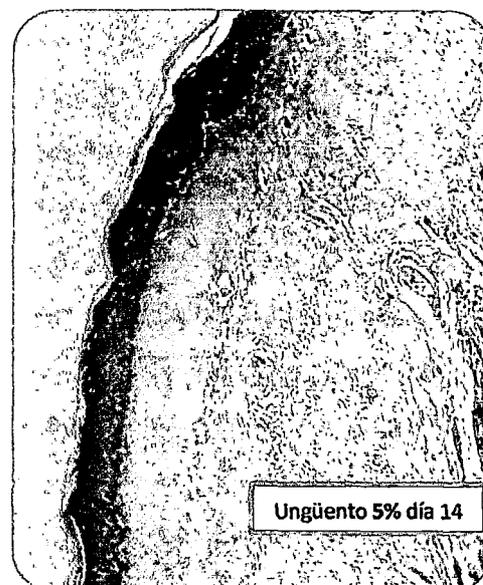
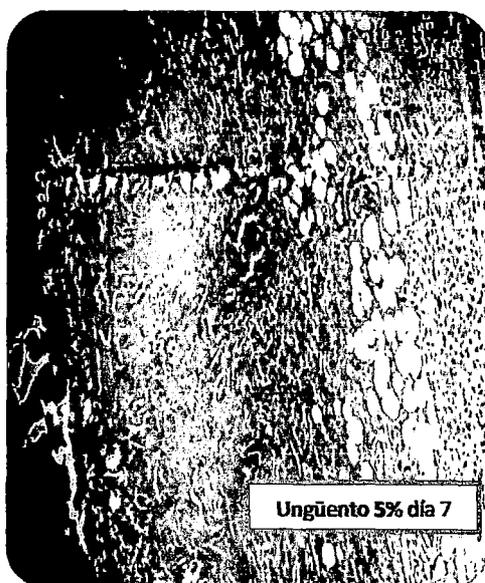
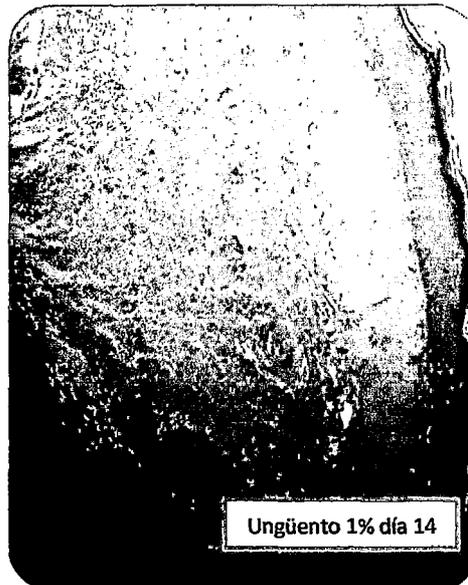
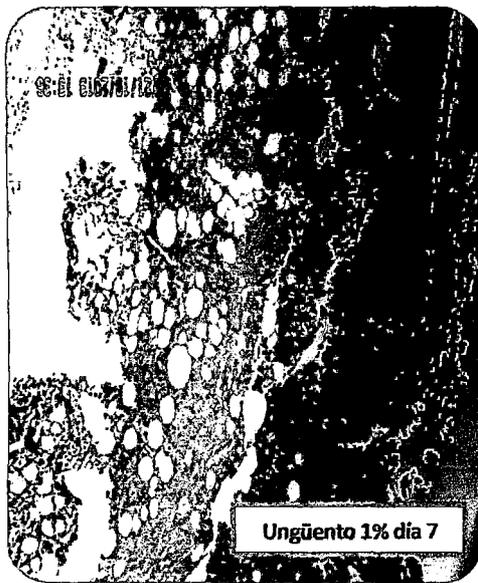


GRAFICO N° 7: Resultado microscópico del tratamiento a los 7 y 14 días de tratamiento con los ungüentos obtenidos de la fracción acuosa al 1% y 5%.

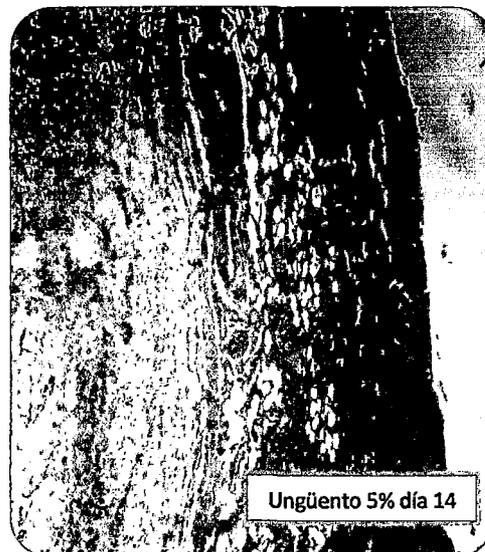
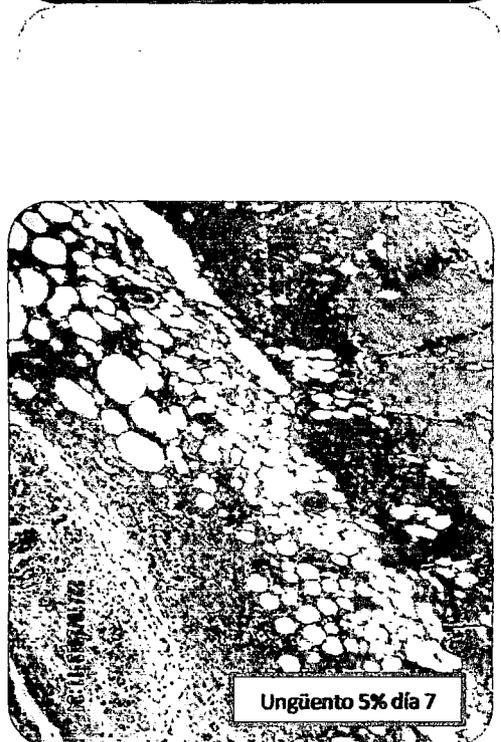
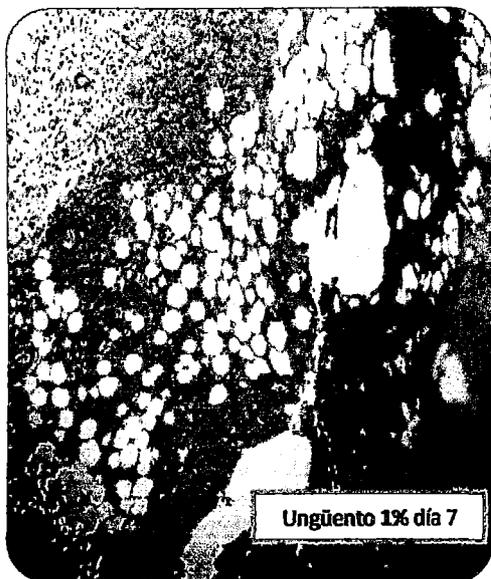


GRAFICO N° 8: Resultado microscópico del tratamiento a los 7 y 14 días de tratamiento con los ungüentos obtenidos del extracto total al 1% y 5%.

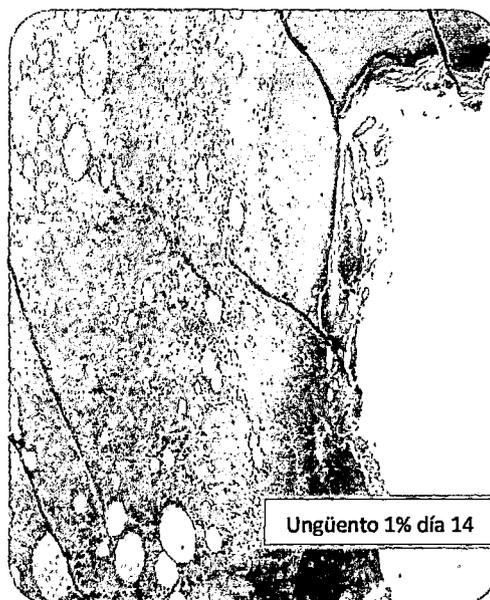
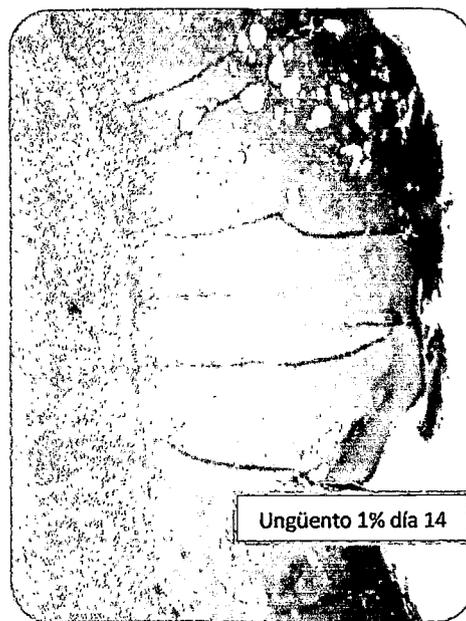
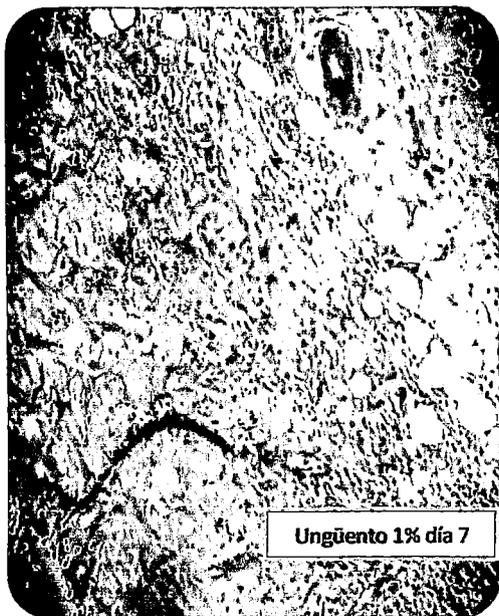


GRAFICO N° 9: Resultado microscópico del tratamiento a los 7 y 14 días de tratamiento con Sulfadiazina de plata.

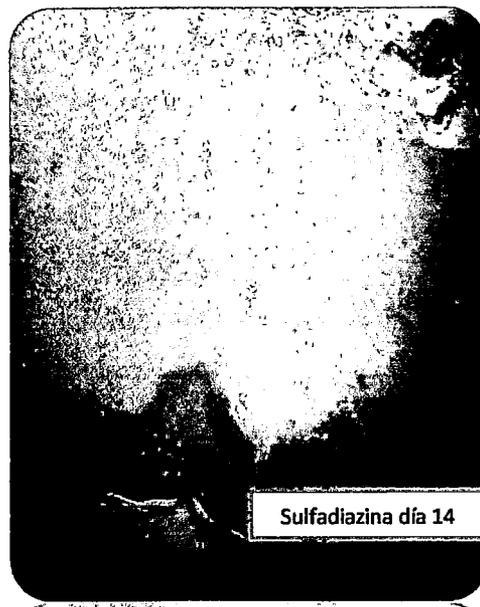
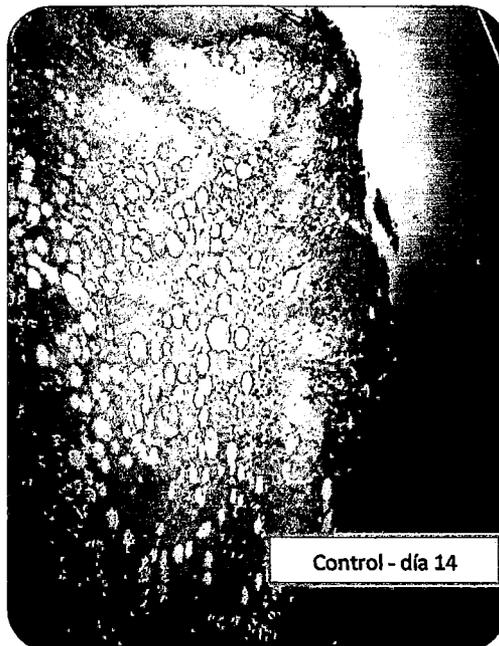
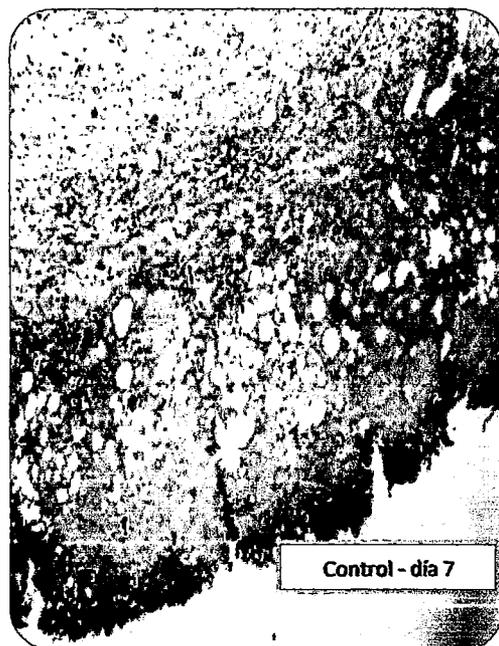


GRAFICO N° 10: Resultado microscópico del tratamiento a los 7 y 14 días de tratamiento con Vehículo (control -).



CONSTANCIA

Mediante la presente hago constar como asesora la culminación de la investigación titulada “Control de calidad y eficacia tópica de los ungüentos obtenidos de las fracciones de *Munnozia hastifolia* en la curación de quemaduras de tercer grado en ratas Holtzman”, presentado por las Bachilleres Herrera Flores, Rosalía Karen y Pongo Alcalá, Elizabeth, por lo que se expide la presente constancia a solicitud de la interesada, para los fines que estime conveniente.

Ica, 25 de Febrero del 2015

Dra. Chávez Orellana, Haydee
Asesora de tesis

CONSTANCIA

Mediante la presente hago constar como asesora la culminación de la investigación titulada “Control de calidad y eficacia tópica de los ungüentos obtenidos de las fracciones de *Munnozia hastifolia* en la curación de quemaduras de tercer grado en ratas Holtzman”, presentado por las Bachilleres Herrera Flores, Rosalía Karen y Pongo Alcalá, Elizabeth, por lo que se expide la presente constancia a solicitud de la interesada, para los fines que estime conveniente.

Ica, 25 de Febrero del 2015

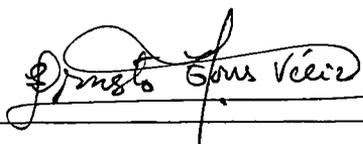
Mg. Bendezú Acevedo, Rocío

Asesora de tesis

CONSTANCIA

Mediante la presente hago constar como asesora la culminación de la investigación titulada “Control de calidad y eficacia tópica de los ungüentos obtenidos de las fracciones de *Munnozia hastifolia* en la curación de quemaduras de tercer grado en ratas Holtzman”, presentado por las Bachilleres Herrera Flores, Rosalía Karen y Pongo Alcalá, Elizabeth, por lo que se expide la presente constancia a solicitud de la interesada, para los fines que estime conveniente.

Ica, 25 de Febrero del 2015



Mg. Torres Veliz, Ernesto

Asesor de tesis