



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional

Esta licencia permite a otras combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial, siempre y cuando den crédito y licencia a nuevas creaciones bajo los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>

"AÑO DEL BICENTENARIO DEL PERÚ "
UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



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

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Leucaena leucocephala* (Lam.)
DE WIT.**

AUTOR:

Bach. QUISPE CIPRIAN, LILIANA ROSARIO

ICA – PERÚ

2021

DEDICATORIA

A mis padres, Por su sacrificio, amor y confianza incondicional que me brindaron durante mi proceso de estudio para ser una profesional. Mi esposo por su apoyo incondicional en cada momento de mi vida. Mis hijos que me ayudan a ser mejor persona cada día.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de forma especial a la Mg. Q.F. Ferreyra Paredes Carmela, a la Dra. Chávez Orellana Haydee y al Mg. Q.F. Garayar Flores Roberto, por su paciencia, orientación y enseñarme que sólo con esfuerzo y dedicación puedo lograr mis objetivos.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga, por mi formación profesional. Agradezco profundamente a la Asociación Científica de Investigación Farmacéutica – ACIF, por su enseñanza e incentivo a la investigación.

ÍNDICE

RESUMEN	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUCCIÓN	viii
CAPÍTULO I.....	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
1.1. Descripción de la realidad problemática.	10
1.2. Formulación del problema.....	10
1.3. Justificación e importancia.....	10
1.4. Objetivos de la investigación.	12
1.4.1. Objetivo General.	12
1.4.2. Objetivos Específicos.....	12
1.5. Hipótesis y variables.....	13
1.5.1. Hipótesis.....	13
1.5.2. Variables.	13
CAPÍTULO II	14
BASES TEÓRICAS	14
2.1. Antecedentes.....	14
2.2. Marco teórico.....	15
2.2.1. Piel.....	15
2.2.2. Heridas.....	16
2.2.3. Cicatrización de las heridas.....	17
2.2.4. Fases de la cicatrización.....	17
2.2.5. Tratamiento de las heridas.....	18
2.2.6. Posición taxonómica.....	21
2.3. Marco conceptual.....	22
2.3.1. Cicatrización de las heridas.....	22
2.3.2. Heridas.....	22
2.3.3. Heridas agudas.....	22
2.3.4. Heridas crónicas.....	22
CAPÍTULO III.....	23
METODOLOGÍA	23
3.1. Materiales.....	23
3.1.1. Material Vegetal.....	23

3.1.2. Reactivos.	23
3.1.3. Material Biológico.	24
3.1.4. Equipos de Laboratorio.	24
3.1.5. Materiales de Laboratorio.	24
3.2. Localización geográfica.	25
3.3. Recolección de la muestra.	26
3.4. Procesamiento de la muestra.	26
3.5. Tamizaje fitoquímico.	27
3.6. Reacciones sobre las Fracciones.	30
3.6.1. Detección de Metabolitos Secundarios sobre la Fracción A.	30
3.6.2. Detección de Metabolitos Secundarios sobre la Fracción B.	31
3.6.3. Detección de Metabolitos Secundarios sobre la Fracción C.	32
3.6.4. Detección de Metabolitos Secundarios sobre la Fracción D.	32
3.6.5. Detección de Metabolitos Secundarios sobre la Fracción E.	33
3.6.6. Detección de Metabolitos Secundarios sobre la Fracción F.	34
3.7. Evaluación de la Actividad Cicatrizante.	34
3.7.1. Procedimientos previos a la evaluación de la actividad.	34
3.7.2. Actividad Cicatrizante.	35
3.8. Técnicas de Procesamiento de la Información.	37
3.9. Aspectos Éticos.	37
CAPITULO IV	38
4.1. Resultados.	38
4.1.1. Identificación de los Metabolitos Secundarios.	38
4.1.2. Resultados de la Actividad Farmacológica.	40
4.1.3. Estudio histológico de efecto cicatrizante extracto etanólico de <i>Leucaena leucocephala</i> en ratones método del tensiómetro.	42
4.2. Discusión.	44
CONCLUSIONES.....	47
RECOMENDACIONES.....	48
FUENTES DE INFORMACIÓN	49
ANEXOS.....	55

RESUMEN

Leucaena leucocephala (Lam.) De Wit es utilizada por los pobladores del distrito de Santa Cruz, provincia de Palpa, departamento de Ica, para la cicatrización de heridas en forma externa.

Objetivos: Determinar el efecto cicatrizante del extracto etanólico de las hojas, e identificar los metabolitos secundarios presentes mediante un tamizaje fitoquímico preliminar.

Materiales y métodos: El extracto etanólico fue obtenido por extracción mediante reflujo, en el que se evaluó la actividad cicatrizante a diferentes concentraciones por el método tensiométrico de Vaisberg y col. Para el análisis fitoquímico se utilizó la marcha fitoquímica propuesta por Olga Lock.

Resultados.

Se identificaron los siguientes grupos de metabolitos secundarios: grupos fenólicos, libres flavonoides, triterpenoides y/o esteroides, antraquinonas, catequinas, saponinas y grupos aminos libres. El extracto etanólico al 110% mostró mayor actividad. La actividad cicatrizante fue mayor a la concentración de 110% con un porcentaje de eficacia de 214.1% ($p < 0.05$, con respecto al control negativo). Además, se realizó un posterior estudio histológico, tomando muestras de la piel regenerada, donde la muestra tratada con la concentración de 110% presenta mejor cicatrización con respecto a las concentraciones de 140% y 170%.

Palabras Clave: *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit, método tensiométrico
Actividad cicatrizante, Flavonoides.

ABSTRACT

Leucaena leucocephala (Lam.) De Wit is used by the inhabitants of the Santa Cruz district, Palpa province, Ica department, for external wound healing.

Objectives: To determine the healing effect of the ethanolic extract of the leaves, and to identify the secondary metabolites present by means of a preliminary phytochemical screening.

Materials and methods: The ethanolic extract was obtained by extraction by reflux, in which the healing activity was evaluated at different concentrations by the tensiometric method of Vaisberg et al. For the phytochemical analysis, the phytochemical march proposed by Olga Lock was used.

Results.

The following groups of secondary metabolites were identified: free phenolic groups, flavonoids, Triterpenoids and / or Steroids, anthraquinones, catechins, saponins and free amino groups. The healing activity of the 110% ethanolic extract had the highest activity with a 214.1% efficiency of healing activity ($p < 0.05$, with respect to the negative control). In addition, a subsequent histological study was carried out, taking samples of regenerated skin, where the sample treated with the 110% concentration has better healing compared to the 140% and 170% concentrations.

Key Words: *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit, tensiometric method Healing activity, Flavonoids.

INTRODUCCIÓN

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha realizado desde tiempos inmemoriales. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso de que disponían los antiguos médicos (Luna Flores y col, 2010)¹.

En nuestro país el uso de plantas medicinales está muy arraigado, tanto en la población rural como en la urbana, llegando incluso a integrar este conocimiento ancestral a la terapéutica de muchas enfermedades prevalentes.

En los últimos años se ha observado un nuevo interés hacia el empleo de las plantas medicinales, especialmente en la investigación de la flora medicinal de pueblos como el nuestro, pues a través de muchos estudios se ha demostrado que el uso de dichas plantas tiene un fundamento científico basado en el contenido de principios activos susceptibles de ser aislados, purificados y posteriormente modificados con fines de aplicación terapéutica (Flores Montes, 2006)².

Hoy en día la curación de heridas, especialmente las heridas crónicas, es un tema de especial interés de salud pública. Por un lado, el número de personas afectadas, además de las repercusiones que ocasiona en la calidad de vida, el aumento del riesgo de mortalidad, así como los elevados costos de tratamiento.

En la actualidad se dispone de tratamientos farmacológicos para la curación de heridas. Pese a ello recientemente se ha experimentado un creciente interés en el uso de plantas medicinales, como terapia alternativa.

Existe diversa información sobre plantas que presentan un buen efecto cicatrizante, por este motivo y teniendo en cuenta la información sobre el uso de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit Yaravisco, nos planteamos evaluar la actividad cicatrizante de esta especie, como una alternativa para tratar heridas de difícil cicatrización y validar el efecto farmacológico de la planta en mención.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la realidad problemática.

La cicatrización de las heridas es un proceso natural que normalmente no requiere de tratamientos especiales, sin embargo, existen heridas crónicas o complicadas que no cicatrizan debido a la existencia de factores subyacentes, en estos casos es necesario intervenir; ejemplo de estos casos son: las úlceras por presión, las úlceras vasculares y las heridas quirúrgicas que cicatrizan por segunda intención (Flores Montes, 2006)².

A lo largo de la historia las heridas han estado siempre inherentes a nosotros. Actualmente las infecciones de la herida y las heridas crónicas constituyen una carga económica substancial para los sistemas sanitarios de salud.

Se habla de una estimación a nivel mundial de 400 millones de personas con heridas de diferente naturaleza, de las cuales 20 millones son crónicas, las cuales son cifras abrumadoras (Carrera Castro, 2013)³.

1.2. Formulación del problema.

¿Tendrá actividad cicatrizante el extracto etanólico de hojas de *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit? “Yaravisco”?

1.3. Justificación e importancia.

En la actualidad, el 80 % de la población mundial utiliza plantas para el tratamiento de las enfermedades, y en los países industrializados el 35 % de los medicamentos prescritos contienen principios activos de origen natural.

Las plantas presentan diversos usos en la medicina moderna y son utilizadas en la atención primaria de salud; son fuentes de agentes terapéuticos para la fabricación de compuestos semisintéticos, y sus estructuras químicas sirven como modelos para nuevos productos sintéticos; por otra parte, han llegado al campo de la biotecnología, pues se han ensayado implantes de células vegetales en animales (Prieto-González y col, 2004)⁴.

La flora peruana presenta varias especies vegetales con actividad cicatrizante, las cuales han sido estudiadas mediante diversos modelos experimentales.

La presencia de taninos, cumarinas, flavonoides y esteroides, son responsables de la acción cicatrizante, astringente, antimicrobiana, antimicótica y antiinflamatoria de las plantas que la poseen.

Leucaena leucocephala (Lam) de Wit. “Yaravisco”, es una planta que crece tanto en la costa, sierra y selva de nuestro país, entre los 0 y 1500 msnm. Se ha reportado su presencia en las regiones de Cuzco, Huánuco, Junín, Lambayeque, Lima, Loreto, Pasco, San Martín, Tacna (Brako lois y Zarucchi James, 1993)⁵. Estudios previos han demostrado la actividad antioxidante de Yaravisco (Olaechea Gonzales y col, 1998)⁶. Asimismo, presenta flavonoides, los cuales son reconocidos agentes antioxidantes. Por otro lado, la cicatrización de las heridas puede ser afectada adversamente por muchos factores, tales como la presencia de agentes oxidantes, la inflamación y las infecciones microbianas. Por ello de acuerdo a los antecedentes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. “Yaravisco”, sería importante verificar en un modelo farmacológico sus posibles propiedades cicatrizantes referidas en su uso popular (Olaechea Gonzales y col, 1998)⁶.

Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit. “Yaravisco, presenta diversos estudios de actividad farmacológica y biológica, pero no presenta hasta el momento ningún reporte de estudio de actividad cicatrizante, por lo que el presente estudio pretende también cubrir este vacío en sus estudios a fin de poder validar su uso tradicional. Asimismo, es utilizada por los pobladores del valle de Santa Cruz, provincia de Palpa, región Ica, para la cicatrización de heridas en forma externa.

1.4. Objetivos de la investigación.

1.4.1. Objetivo General.

Determinar la actividad cicatrizante del extracto etanólico de hojas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. “Yaravisco”.

1.4.2. Objetivos Específicos.

- Obtención del extracto etanólico de hojas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. “Yaravisco.
- Determinar la actividad cicatrizante del extracto etanólico de hojas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. “Yaravisco” por el modelo del tensiómetro.
- Determinar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. “Yaravisco”, mediante un tamizaje fitoquímico.

1.5. Hipótesis y variables.

1.5.1. Hipótesis.

El extracto etanólico de hojas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.

“Yaravisco” tiene actividad cicatrizante.

1.5.2. Variables.

Tabla 1. Operacionalización de variables

Variabes	Tipo de Variable	Definición Conceptual	Dimensiones	Indicadores
Extracto etanólico de Hojas de <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit. “Yaravisco”	Independiente	Extracto obtenido a partir del material vegetal con etanol.	Rendimiento del extracto	Cantidad en gramos de extracto obtenido con etanol.
Actividad Cicatrizante	Dependiente	Proceso de reparación celular que permite el cierre de una herida.	Eficacia cicatrizante	Fuerza para abrir la herida en mililitros.

CAPÍTULO II

BASES TEÓRICAS

2.1. Antecedentes.

Tailandia, en un estudio donde utilizaron diferentes extractos de semillas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.; los extractos con solventes de diferente polaridad, determinaron la actividad antioxidante utilizando diferentes test. El extracto con mayor actividad fue el extracto acuoso secado por liofilización (Soottawat Benjakul y col, 2014)⁷.

Brasil, en un estudio destinado a evaluar la actividad antihelmíntica de extractos proteicos de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. en huevos de *Haemonchus contortus*, determinaron que el extracto total de semillas exhibió efectos ovicidas más significativos que los obtenidos por el extracto de cotiledón. (Dos Santos Soares y col, 2015)⁸.

Egipto, en un estudio destinado a evaluar la actividad antioxidante y citotóxica de extractos y compuestos aislados de partes aéreas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.; concluyeron que la fracción acetato de etilo y los flavonoides aislados mostraron alta actividad antioxidante mas no exhibieron actividad citotóxica (Hassan y col, 2017)⁹.

Taiwán, en un estudio destinado a evaluar los efectos anti-cáncer de compuestos aislados de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.; encontraron que la Feoforbida un metilester, pirofeoforbida y feofitina mostraron una alta actividad anti-migración y anti-invasiva en líneas celulares de cáncer gástrico (Chien She y col, 2017)¹⁰.

Malasia, en un estudio diseñado para evaluar las actividades in vitro del extracto acuoso de frutos de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. El extracto acuoso de frutos de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. puede ser potencialmente usado como un adyuvante en el tratamiento de diabetes mellitus y manejo de peso debido a su captación mejorada de glucosa y propiedades equilibradas de adipogénesis y lipólisis (Rani Kuppusamy y col, 2014)¹¹.

2.2. Marco teórico.

2.2.1. Piel.

La piel cubre casi la totalidad de la superficie corporal. Se caracteriza porque es elástica, se regenera por sí misma y es casi totalmente permeable. Presenta las funciones de: protección externa, percepción sensorial, termorregulación y secreción. Las capas de la piel son la epidermis, la dermis y la hipodermis.

- **Epidermis** Es la capa más externa y está constituida por varias capas de células llamadas queratinocitos, dispuestas unas encima de otras constituyendo una barrera impermeable para casi todas las sustancias. Es la capa que primero se ve perjudicada cuando hay una exposición excesiva al sol o cuando se producen lesiones leves con pérdida de la continuidad de la piel.
- **Dermis** Representa la mayor proporción de la piel y es el verdadero soporte de este órgano. Está constituida por un complicado sistema de

fibras entrelazadas, embebidas de una sustancia denominada sustancia fundamental, y en ella se encuentran los principales anejos cutáneos (pelos, uñas, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas). Resulta afectada cuando hay heridas de mayor profundidad. Además, por contener en su estructura vasos sanguíneos y linfáticos, se presentan hemorragias y ampollas, así como una mayor sensibilidad debido a la presencia de terminaciones nerviosas. Por ello, cuando se lesiona la dermis aparece el dolor.

- **Hipodermis** Es la capa más profunda de la piel. También se llama tejido subcutáneo y está formada por gran cantidad de células que contienen grasa, llamadas adipocitos (Esteva Estelita, 2006)¹².

2.2.2. Heridas.

Una herida es el efecto producido por un agente externo que actúa de manera brusca sobre una parte de nuestro organismo, superando la resistencia de los tejidos sobre los que incide, produciendo una rotura de la superficie cutánea o mucosa.

Desde un punto de vista más práctico, una herida es una lesión caracterizada por una discontinuidad en el epitelio de revestimiento (Martín-Aragón y Marcos Elena, 2008)¹³.

- **Clasificación de las heridas** Las heridas se pueden clasificar en función del tiempo de evolución en heridas agudas, de corto tiempo de evolución, y en heridas crónicas, cuando persisten durante un período prolongado.

- **Heridas agudas** Se caracterizan por la curación completa en el tiempo previsto y por no presentar complicaciones. Hay diferentes tipos de heridas agudas: cortantes, contusas, punzantes, raspaduras, avulsivas, magulladuras, por aplastamientos y quemaduras.
- **Heridas crónicas** Se caracterizan por mantener retraso en el tiempo de curación y la ausencia de crecimiento de los tejidos. Se asocian a una excesiva inflamación y/o pobre perfusión de oxígeno. A veces, pueden aparecer enfermedades concomitantes. Las heridas crónicas más frecuentes son las úlceras por presión, las úlceras vasculares (arteriales y venosas), las úlceras neuropáticas (pie diabético) y las úlceras neoplásicas (Esteva Estelita, 2006)¹².

2.2.3. Cicatrización de las heridas.

La cicatrización de las heridas es un fenómeno fisiológico que comienza con la coagulación sanguínea para después continuar con la activación de los procesos catabólicos de limpieza y seguir con la regeneración de nuevo tejido de relleno (fase anabólica) y finalizar con la estructuración de un nuevo tejido cicatricial.

2.2.4. Fases de la cicatrización.

Por regla general, la cicatrización de una herida consta de tres fases: inflamatoria/exudativa, proliferativa y de diferenciación, maduración o remodelación.

- **Fase inflamatoria/exudativa** Se detiene la hemorragia por medio de las plaquetas y de la formación de fibrina. Aparecen los primeros

signos de defensa del organismo (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) con el objetivo de evitar la contaminación de microorganismos.

- **Fase proliferativa** Predomina la proliferación celular (fibroblastos y colágeno) con el objetivo de que se vuelvan a formar los vasos destruidos y se rellene la zona defectuosa mediante tejidos de granulación.
- **Fase de diferenciación, maduración o remodelación** Se produce una contracción de la herida mediante la transformación del tejido granular en tejido cicatricial. La epitelización cierra el proceso de cicatrización. El proceso de curación de heridas es un proceso activo, dinámico e involuntario en el que las distintas fases que lo componen se superponen en el tiempo, sin poder separar claramente unas de otras (Castrillón y col, 2011; Sociedad Argentina De Dermatología, 2008)^{14,15}.

2.2.5. Tratamiento de las heridas.

- **Tratamiento Farmacológico.**

Los fármacos empleados para reepitelización o aumento de la fuerza tensil de las heridas, pueden clasificarse bajo el criterio de su aplicación, en:

✚ **Tópica**, para aquellos que se utilizan en ungüentos o cremas.

En aplicaciones tópicas se emplean fármacos como sulfadiazina de plata, peróxido de benzoilo al 10%, ácido fusídico, mupirocina, y ácido lisofosfatídico, el cual promueve un acelerado cierre de la herida, aumenta el grosor neoepitelial y la migración de células macrófago-histiocito.

Asimismo, en el proceso de granulación de heridas, para estimular la síntesis de colágeno y la neovascularización. Se utilizan membranas como hidrocoloides, alginato de Ca^{++} , hidropolímeros, colágeno + alginato, alginato con plata, matriz moduladora de proteasas + plata.

Para la reepitelización de heridas para el cierre completo de las mismas se utilizan films de poliuretano e hidrocoloide extrafino (Sociedad Argentina De Dermatología; 2008)¹⁵.

✚ **De uso parenteral**, que incluyen intramuscular e inyecciones directas en los sitios o alrededor de las heridas.

Recientemente se utilizó trombina en una aproximación parenteral (con inyecciones directas en las heridas) con un modelo animal (*in vivo*) y herida incisional. La trombina se empleó unida a nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), y se encontró que mejoraba la fuerza tensil en dichas heridas, en comparación con el grupo control. Por otro lado, en estudios en ratones desnudos con heridas excisionales en la cabeza, se halló que se trataron con vesículas lipídicas unilamelares, con un

contenido de Magnesio–Adenosintrifosfato (Mg-ATP), a una concentración de 25mm. Se halló que los ratones tratados, presentaron diferencias significativas en el tiempo de cicatrización respecto del control (12 días Vs. 16 días). Igualmente, observaron que la expresión de VEGF en el desarrollo del tejido de granulación y la reepitelización fue más alta en el grupo que recibió el tratamiento con las vesículas lipídicas con Mg-ATP. Se determina que la furosemida, aminofilina y ácido ascórbico, pueden aumentar o disminuir el eflujo de iones, que generan corrientes eléctricas en las heridas, al acelerar o retrasar su cicatrización. Uno de los hallazgos más extraños tiene como sustrato activo la estreptolisina O, conocida exotoxina del estreptococo, que cuando se modifica por oxidación (ML-05) acelera el proceso de cicatrización e induce la proliferación y la migración de los queratinocitos durante la reepitelización en modelos *in vitro* (Valencia Basto, 2018)¹⁶.

- **Fitoterapia.**

Se han aplicado múltiples plantas y sus derivados para la cicatrización de heridas, entre ellas: *Agrimonia eupatoria* (agrimonia), *Actiumlappa* (bardana), *Capsellabursa-pastoris* (bolsa de pastor), *Cupressus sempervivens* (ciprés), *Equisetum arvense* (cola de caballo), *Symphytum officinale* (consuelda), *Echinacea angustifolia* (echinácea), *Rammus frangula* (frangula), *Fucus vesiculosus* (fucus),

Arbustus uva-ursi (gayuba), *Genciana lutea* (genciana), *Hederahelix* (hiedra), *Citrus limonum* (limón), *Plantago major* (llantén), *Zea mays* (maíz), *Malva sylvestris* (malva), *Matricaria chamomilla* (manzanilla), *Origanum majorana* (mejorana), *Melilotus officinalis* (meliloto), *Melissa officinalis* (melisa), *Juglans regia* (nogal), *Carica papaya* (papaya), *Glycyrrhiza glabra* (regaliz), *Rosa gallica* (rosa), *Salvia officinalis* (salvia) y *Salbucus migra* (saúco). Las más utilizadas son: *Aloe vera* y *Aloe barbadensis* (sábila), *Caléndula officinalis* (caléndula), *Uncaria guianensis* (uña de gato) e *Hidrocotile asiática* (centella asiática).

Uno de los usos tradicionales de la especie *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. “Yaravisco”, es que presenta actividad cicatrizante. El cocimiento de tallos y hojas es utilizado por los pobladores del valle de Santa Cruz, provincia de Palpa, región Ica, para la cicatrización de heridas en forma externa.

2.2.6. Posición taxonómica.

División : Magnoliliophyta

Clase : Magnoliopsida

Subclase : Rosidae

Orden : Fabales

Familia : Mimosaceae

Género : *Leucaena*

Especie : *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit.

2.3. Marco conceptual.

2.3.1. Cicatrización de las heridas.

La cicatrización de las heridas es un fenómeno fisiológico que comienza con la coagulación sanguínea para después continuar con la activación de los procesos catabólicos de limpieza y seguir con la regeneración de nuevo tejido de relleno (fase anabólica) y finalizar con la estructuración de un nuevo tejido cicatricial.

2.3.2. Heridas.

Una herida es el efecto producido por un agente externo que actúa de manera brusca sobre una parte de nuestro organismo, superando la resistencia de los tejidos sobre los que incide, produciendo una rotura de la superficie cutánea o mucosa.

2.3.3. Heridas agudas.

Se caracterizan por la curación completa en el tiempo previsto y por no presentar complicaciones. Hay diferentes tipos de heridas agudas: cortantes, contusas, punzantes, raspaduras, avulsivas, magulladuras, por aplastamientos y quemaduras.

2.3.4. Heridas crónicas.

Se caracterizan por mantener retraso en el tiempo de curación y la ausencia de crecimiento de los tejidos. Se asocian a una excesiva inflamación y/o pobre perfusión de oxígeno. (Valencia Basto, 2018)¹⁶.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1. Materiales.

3.1.1. Material Vegetal.

- Hojas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. “Yaravisco”

3.1.2. Reactivos.

- Etanol Q.P.
- Diclorometano Q.P
- Ácido Clorhídrico Q.P.
- Reactivo de Shinoda
- Reactivo de Gelatina
- Reactivo de Cloruro Férrico
- Reactivo de Rosenheim
- Reactivo de Ninhidrina
- Reactivo de Borntrager
- Reactivo de Lieberman-Burchard
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Dragendorf
- Reactivo de Wagner
- Tween 80
- Tween 20
- Cloruro de Sodio 9%

- Agua Destilada

3.1.3. Material Biológico.

- Ratones albinos Balb/C3.

3.1.4. Equipos de Laboratorio.

- Balanza Analítica
- Estufa
- Equipo de Reflujo
- Rotavapor
- Dinamómetro

3.1.5. Materiales de Laboratorio.

- Crema depilatoria (opilca)
- inKaNat Sangre de Grado
- Pentobarbital sódico
- Sutura seda negra 5/0 con aguja
- Hojas de bisturí
- Algodón x 500 g.
- Papel de filtro
- Papel de aluminio

3.2. Localización geográfica.

Las hojas de *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. “Yaravisco” se recolecto en el distrito de Santa Cruz, Provincia de Palpa, Región Ica. Se eligió este lugar por ser el más próximo a las regiones donde crecen, como son la costa, sierra y selva de nuestro país.

Haciendo uso de la herramienta Google Earth® se realizó un mapa donde se muestra el lugar donde se recolecto la muestra.

Figura 1. Localización geográfica de la recolección de muestra.



UBICACIÓN: 14 ° 29'16.45" S 75 ° 14'47.48" O

Elev. 535 m. Alt. Ojo 847 m.

3.3. Recolección de la muestra.

Las hojas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. “Yaravisco” fueron recolectadas en el distrito de Santa Cruz, Provincia de Palpa, Región Ica por la autora, en la ubicación: 14 ° 29’16.45” S 75 ° 14’47.48” O, Elev. 535 m. Alt. Ojo 847 m. durante los meses de junio del año 2018 y trasladada al laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga.

3.4. Procesamiento de la muestra.

El material vegetal fue seleccionado, limpiado con un trapo húmedo para eliminar los restos de polvo y secado a temperatura ambiente bajo sombra en papel Kraft durante 15 días; fue estabilizado en una estufa a 40°C hasta peso constante, una vez seca se redujo a un tamaño apropiado con ayuda de un molino manual.

- **Obtención del extracto etanólico.**

500 gramos del material seco y molido se maceraron por 20 horas en etanol de 96° en frasco de vidrio. A cabo de este tiempo se filtró y al marco, se sometió a extracción por reflujo con etanol de 96° por espacio de 4 horas. El líquido obtenido se filtró, se reunieron los filtrados para concentrar a sequedad en un evaporador rotatorio marca BUCHI, a una temperatura de 45°C.

Se obtuvo 77g de un extracto seco de color verde oscuro.

Figura 2. Extracto seco



3.5. Tamizaje fitoquímico.

Se efectuó un tamizaje fitoquímico preliminar de acuerdo al esquema propuesto (Lock de Ugaz, 1994)¹⁷. Con el fin de detectar los tipos de metabolitos secundarios presentes. La identificación se realizó mediante reacciones de coloración y precipitación.

100g del material seco y molido fue macerado por 20 horas a temperatura ambiente con 500mL de etanol 96° y sometido a reflujo por espacio de 4 horas.

Se filtró en caliente y a este filtrado se llamó **Fracción A**, se separó 2mL para efectuar reacciones de identificación. El resto se concentró a sequedad y presión reducida en un evaporador rotatorio a una temperatura de 40°C.

El extracto seco se disolvió en HCL al 1% (2x100mL), se filtró y se obtuvo dos partes:

a. Insoluble: Se lavó hasta pH neutro con agua destilada, seguidamente se disolvió en 5mL de diclorometano, se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró. Este filtrado constituye la **Fracción B**.

b. Solución Acida: Se filtró y alcalinizó con hidróxido de amonio, extrayéndose con diclorometano (2x100mL) obteniéndose dos fases:

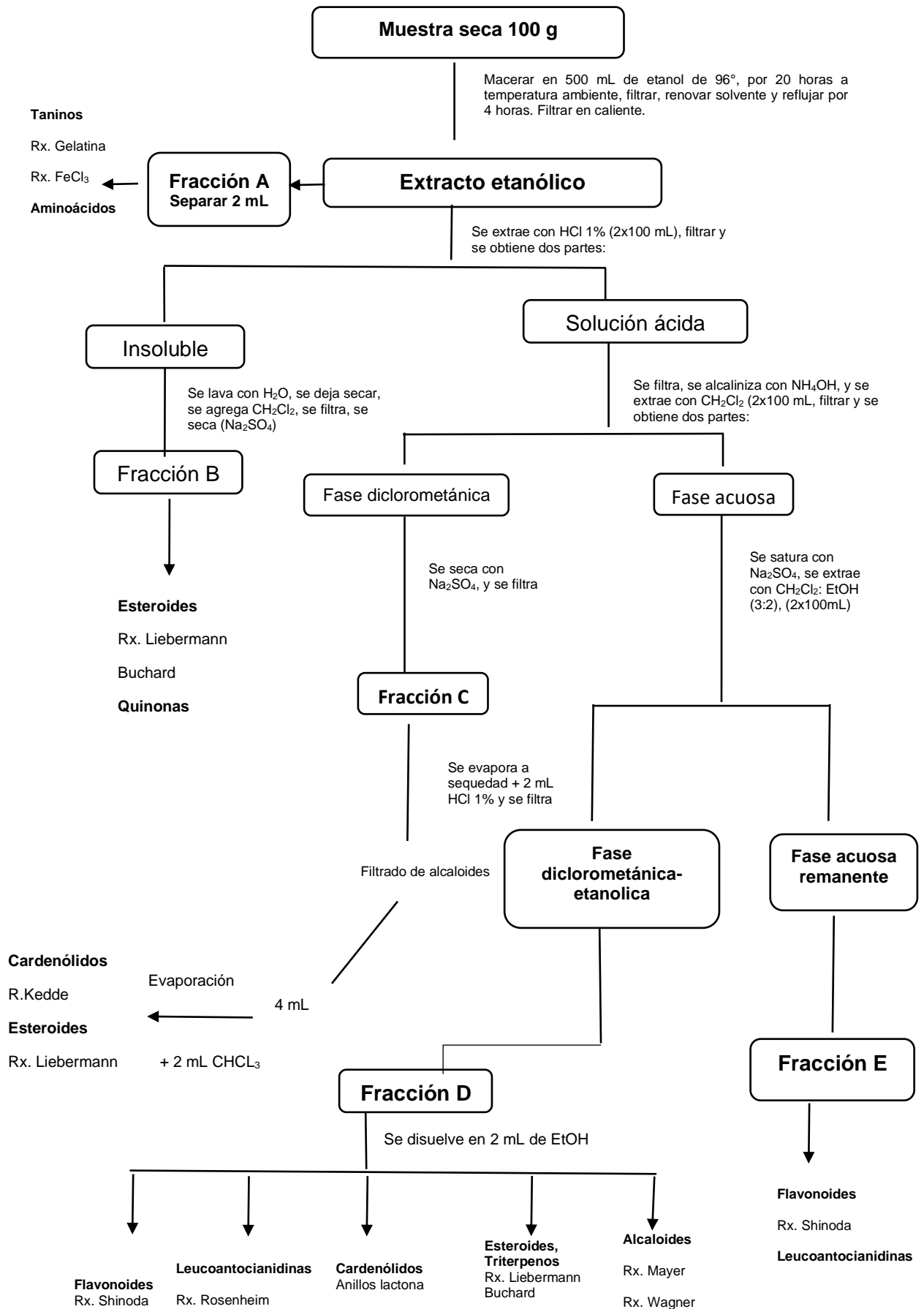
- Fase Diclorometánica: Se lavó con 10mL de agua destilada, luego la fase diclorometánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró obteniéndose la **Fracción C**.

- Fase Acuosa: Se saturó con 5g de sulfato de sodio anhidro y se extrajo con diclorometano: etanol (3:2) (2x100mL).
Se obtuvo dos fases:
 - ✓ Fase Orgánica (Diclorometánica – etanólica). Se lavó con solución de sulfato de sodio anhidro (10mL) reuniendo las fases acuosas. Seguidamente la fase orgánica se deshidrató con 1g de sulfato de sodio anhidro, se filtró y esto constituye la **Fracción D**.
 - ✓ Fase Acuosa: A esta se adicionó los residuos acuosos obtenidos del lavado de la fase orgánica y esto constituirá la **Fracción E**.

Obtención de la fracción F

En un vaso de precipitado se colocó 1g de droga seca y molida con 20mL de agua, se agitó con una bagueta e hirvió durante 15 minutos. Luego se procedió a filtrar en caliente y se completó a volumen (20mL) a través del filtro y se dejó enfriar a temperatura ambiente constituyendo la **Fracción F**.

Figura 3. Tamizaje fitoquímico de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit



3.6. Reacciones sobre las Fracciones.

3.6.1. Detección de Metabolitos Secundarios sobre la Fracción A.

➤ Detección de Taninos:

- **Reacción de Gelatina-Sal:** Se tomó tres tubos de ensayo y se vertió en cada uno de ellos 0.5mL de la fracción A (disuelta en agua).

Tubo N° 1. Se agregó 1mL de solución de NaCl 5%.

Tubo N° 2. Se agregó 1mL de solución de gelatina al 1%.

Tubo N° 3. Se agregó 1mL de solución de NaCl 5% y 1mL de solución de la gelatina al 1 % (solución gelatina-sal).

La precipitación con este último reactivo o con ambos el 1° y 2° es indicativo de la presencia de taninos, **si solamente ocurre con el 1°, podría ser un falso positivo.**

- **Reacción de Cloruro Férrico:** En un tubo de ensayo se colocó 0.5mL de la Fracción A disuelta en etanol y se le agregó una gota de solución acuosa de FeCl_3 1%.

La reacción será positiva cuando aparecen colores azul-negro y verde o azul verdoso.

➤ Detección de Aminoácidos:

- **Reacción de Ninhidrina:** Sobre tiras de papel de filtro se colocó con una pipeta capilar una gota de Fracción A más una gota del reactivo Ninhidrina al 2%.

Blanco: solución etanólica de ninhidrina al 2%

Luego del secado a temperatura ambiente, las tiras de papel se colocan en la estufa a 110-120°C hasta la aparición de un color en el blanco. Se comparó con la mancha azul violáceo de la solución testigo.

La reacción es positiva si el papel de la muestra presenta un color azul violáceo.

➤ **Detección de Flavonoides:**

- **Reacción de Shinoda:** En una placa se vertieron 3 gotas de la fracción A, 5 limaduras de Magnesio y 2 gotas de Ácido Clorhídrico concentrado.

La reacción es positiva cuando aparecen tonos de color rojo, anaranjado y violeta.

3.6.2. Detección de Metabolitos Secundarios sobre la Fracción B.

➤ **Detección de Triterpenoides y/o Esteroides:**

- **Reacción de Lieberman Burchard:** Sobre 1mL de la Fracción B se vertieron 5 gotas de ácido acético y 3mL de anhídrido acético/ácido sulfúrico (50:1).

La reacción es positiva si aparecen colores verdes, azul verdoso (vías rojo o azul).

➤ **Detección de Antraquinonas:**

- **Reacción de Borntrager:** Sobre el resto de la Fracción B se agregó 5mL de NaOH 5% y se agitó suavemente.

La reacción es positiva si la fase acuosa toma un color rojo.

3.6.3. Detección de Metabolitos Secundarios sobre la Fracción C.

➤ **Detección de Triterpenoides y/o Esteroides:**

- **Reacción de Lieberman Burchard:** Sobre 1mL de la Fracción B se vertieron 5 gotas de ácido acético y 3mL de anhídrido acético/ácido sulfúrico (50:1).

La reacción es positiva si aparecen colores verdes, azul verdoso (vías rojo o azul).

- **Detección de Alcaloides:** La Fracción C se evaporó a sequedad y luego se agregaron 2mL de HCl 1%, filtrar. Se realizaron las reacciones de precipitación, de Dragendorf, Mayer en un tubo de ensayo.

Las reacciones serán positiva si aparece un precipitado.

3.6.4. Detección de Metabolitos Secundarios sobre la Fracción D.

Se evaporó a sequedad y luego se agregó 2.5mL de etanol, efectuándose las reacciones siguientes:

➤ **Detección de Flavonoides:**

- **Reacción de Shinoda:** En una placa se agregó 3 gotas de la fracción D, 5 limaduras de Magnesio y 2 gotas de Ácido Clorhídrico concentrado.

La reacción es positiva cuando aparecen tonos de color rojo, anaranjado y violeta.

➤ **Detección de Leucoantocianidinas y Catequinas:**

- **Reacción de Rosenheim:** A 0.2mL de la Fracción D se agregó 0.1mL de HCl concentrado, se calentó durante 10 minutos a 100°C. Se enfrió, luego se adicionó 2mL de agua y 0.4mL de alcohol amílico, se agitó y observó el color en la fase amílica.

La reacción se considerará positiva si aparece un color que va desde el rosado débil hasta carmesí oscuro.

Si es rojo indicará la presencia de leucoantocianidinas. Si es marrón indicará presencia de catequinas.

3.6.5. Detección de Metabolitos Secundarios sobre la Fracción E.

➤ **Detección de Flavonoides:**

- **Reacción de Shinoda:** En una placa se vertieron 3 gotas de la fracción E, 5 limaduras de Magnesio y 2 gotas de Ácido Clorhídrico concentrado.

La reacción es positiva cuando aparecen tonos de color rojo, anaranjado y violeta.

➤ **Detección de Leucoantocianidinas y Catequinas:**

- **Reacción de Rosenheim:** A 0.2mL de la Fracción E se agregó 0.1mL de HCl concentrado, se calentó durante 10 minutos a 100°C. Se enfrió, luego se adicionó 2mL de agua y 0.4mL de alcohol amílico, se agitó y observó el color en la fase amílica.

La reacción se considerará positiva si aparece un color que va desde el rosado débil hasta carmesí oscuro.

Si es rojo indicará la presencia de antocianidinas. Si es marrón indicará presencia de catequinas.

3.6.6. Detección de Metabolitos Secundarios sobre la Fracción F.

➤ Detección de Saponinas:

- **Prueba de la Espuma:** En un tubo de ensayo se agitó 2.5mL de extracto por un minuto. Se dejó reposar por 15 minutos y se observó la formación de espuma.

Se considera negativa la reacción si la altura de la espuma es menor de 5mm.

3.7. Evaluación de la Actividad Cicatrizante.

Fue realizada en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga.

Se utilizaron ratones albinos machos cepa Balb C3 obtenidos del Bioterio del Instituto Nacional de Salud.

3.7.1. Procedimientos previos a la evaluación de la actividad.

Se emplearon ratones albinos machos cepa Balb C de 25- 30g. procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Salud, los que fueron mantenidos bajo condiciones estándares de humedad, temperatura y ciclos de 12 horas luz/oscuridad, con agua y comida a voluntad.

Dieciocho horas antes de las pruebas se les privó de alimento dejándoles libre acceso al agua.

3.7.2. Actividad Cicatrizante.

Los animales se reunieron en V grupos de 5 animales cada uno, considerando un grupo control negativo (etanol 70°), grupo control positivo (sangre de grado) y III grupos experimentales (concentración del extracto al 110%, 140%, 170%)

- Inicialmente los animales fueron depilados en la región dorsal, luego anestesiados con Pentobarbital Sódico, realizándose un corte transversal de 1 cm a nivel de la cintura escapular. A continuación, se juntaron los pliegues (labios) de la herida, mediante un punto de sutura con seda negra 5/0 en la parte central, y se procedió a la aplicación de la primera dosis del extracto, del fármaco de referencia (sangre de grado) y el control negativo (etanol 70°), mediante pincelaciones las que se repitieron cada 8 horas. Los ratones fueron colocados individualmente en jaulas para evitar que se lastimen entre ellos. Después de 63 horas los animales fueron sacrificados, se les retiró el punto de sutura y fueron colocados en el Equipo de Medida de Tensión, cuya técnica se traduce en la medida del gasto de agua que se produce al sujetar por ambos lados la herida, en forma vertical de tal manera que la fuerza ejercida por el peso de agua en el vaso produzca la abertura de esta.

La actividad es expresada en porcentaje y se determinó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Actividad Cicatrizante} = \frac{(F_t - F_c)}{F_c} \times 100$$

F_t = Fuerza ejercida para abrir la herida del animal tratado

F_c = Fuerza para abrir la herida del animal control

Asimismo, se realizó un posterior estudio histológico con cortes longitudinales de la piel regenerada. Las muestras de tejido con cicatrices experimentales fueron obtenidas inmediatamente a la muerte de los animales, seccionando un área de 1cm^2 que incluyó además parte de la piel sana tomada como referencia para las observaciones histológicas. Dichos fragmentos fueron fijados en formol neutro al 10% y procesadas para su inclusión en parafina. Las coloraciones se realizaron con hematoxilina - eosina para su observación y evaluación histológica (Maldonado y Zapata, 1997; Segura y Vergel, 2004; Villegas y col, 1997; Cortez y Jayo, 2008)¹⁸⁻

21.

3.8. Técnicas de Procesamiento de la Información.

Los resultados de los diferentes grupos experimentales de la actividad farmacológica, se expresaron en promedios con su respectiva desviación estándar. Para la contratación de hipótesis se ha utilizado la prueba de Kruskal Wallis y el test de Dunn como post-test. Para el análisis de datos se ha empleado el programa SPSS v. 20.0 for Windows. Se consideró como nivel de significación un valor de $p < 0,05$ (Bejarano y col, 2006)²².

3.9. Aspectos Éticos.

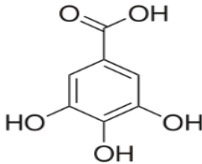
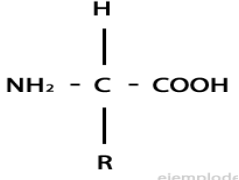
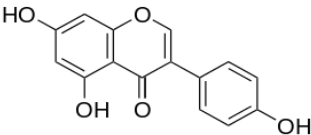
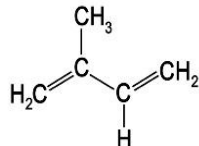
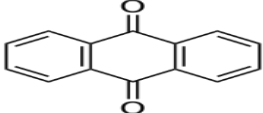
Se tuvieron en cuenta los principios éticos internacionales que guían la investigación biomédica con animales. (Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires, 2018)²³.

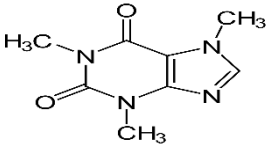
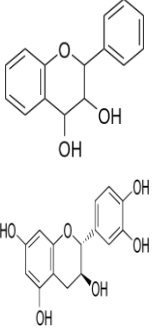
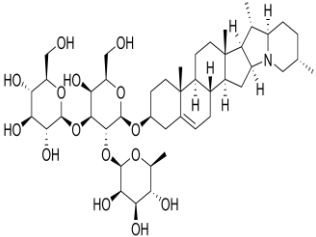
CAPÍTULO IV

4.1. Resultados.

4.1.1. Identificación de los Metabolitos Secundarios.

Tabla 2. Metabolitos Secundarios identificados en *Leucaena Leucocephala*

Metabolitos Secundarios		Fracción A	Fracción B	Fracción C	Fracción D	Fracción E	Fracción F
Detección De Taninos 	Reacción de Gelatina-Sal	-					
	Reacción de Cloruro Férrico. (Grupos fenólicos libres)	+					
Detección de Aminoácidos 	Reacción de Ninhidrina	+					
Detección de Flavonoides 	Reacción de Shinoda	+			+	+	
Detección de Triterpenoides y/o Esteroides 	Reacción de LiebermanBurchard		+	+			
Detección de Antraquinonas 	Reacción de Borntrager		+				

<p>Detección de Alcaloides</p> 				-			
<p>Detección de Catequinas</p> 	<p>Reacción de Rosenheim</p>				+	+	
<p>Detección de Saponinas</p> 	<p>Prueba de la Espuma</p>						+

4.1.2. Resultados de la Actividad Farmacológica.

Tabla 3. Actividad Cicatrizante de *Leucaena leucocephala* en ratones.

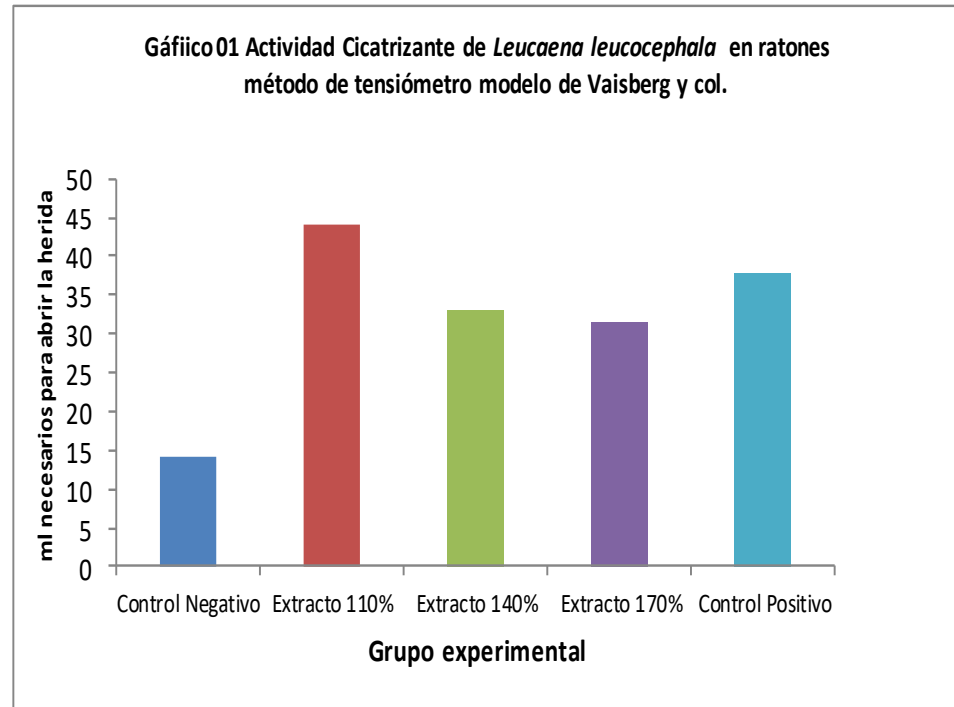
Método tensiométrico modelo de Vaisberg y col.

Grupo Experimental	N	mL necesarios para abrir herida Media ± DE	% de eficacia actividad cicatrizante
Control Negativo	5	14,04 ± 2,07	-
Extracto 110%*	5	44,1* ± 3,56	214,1
Extracto 140%	5	33,16 ± 3,97	136,18
Extracto 170%	5	31,48 ± 1,17	124,1
Control Positivo*	5	37,88* ± 6,36	169,8

* Posee diferencia significativa con respecto al control $p < 0,05$ test de Dunn.

Figura 4. Actividad Cicatrizante de *Leucaena Leucocephala* en ratones.

Método del tensiómetro modelo de Vaisberg y Col.



El extracto etanólico a la concentración de 110% presentó la mayor actividad cicatrizante, siendo mayor al control positivo.

4.1.3. Estudio histológico del efecto cicatrizante extracto etanólico de *Leucaena leucocephala* en ratones método del tensiómetro.

Tabla 4. Muestra de la Biopsia de piel

TEJIDO	PROCESO FISIOLÓGICO		INDICADOR	INTERPRETACIÓN HISTOLÓGICA		
				CONTROL NEGATIVO	Extracto Etanólico 110%	Extracto etanólico 140%
PIEL	REACCIÓN INFLAMATORIA	INFLAMACIÓN AGUDA	MIGRACIÓN DE POLIMORFONUCLEARES	+++	+	+
			PRESENCIA DE LINFOCITOS	+	++	+
			CAMBIO VASCULARES	+	++	+
	INFLAMACIÓN CRÓNICA	PRESENCIA DE CÉLULAS PLASMATICAS	-	+	+	
		CAMBIOS VASCULARES	-	+	+	
	TEJIDO DE GRANULACIÓN	SÍNTESIS DE COLAGENO	PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS	-	++	+
			PRESENCIA DE FIBRAS DE COLAGENO	-	++	+
	EPITELIZACIÓN	PROLIFERACIÓN CÈLULAR	PROLIFERACION DE CÉLULAS EPITELIALES	-	+	+
			MIGRACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES.	-	+	+
	<p style="text-align: center;">LEVE + MODERADO ++ SEVERO ++++ AUSENTE -</p>					

• RATÓN 1 - CONTROL NEGATIVO

Al examen microscópico se observa epitelio con solución de continuidad rodeada de reacción inflamatoria aguda supurada de grado severo (constituido por polimorfonucleares y detritus) y cambios vasculares de grado leve, a nivel de la dermis no se observa respuesta de los fibroblastos y producción del colágeno.

- **RATÓN 2 - EXTRACTO ETANÓLICO DE *Leucaena leucocephala* (Lam.) DE WIT. 110 %**

Al examen microscópico se observa epitelio con solución de continuidad rodeada de reacción inflamatoria aguda de grado leve constituido por polimorfonucleares cambios vasculares de grado leve, a nivel de la dermis se observa respuesta de los fibroblastos, producción del colágeno de grado moderado y epitelización de grado leve.

- **RATÓN 3 - EXTRACTO ETANÓLICO DE *Leucaena leucocephala* (Lam.) DE WIT. 140 %**

Al examen microscópico se observa epitelio con solución de continuidad rodeada de reacción inflamatoria aguda de grado leve constituido por polimorfonucleares cambios vasculares de grado leve, a nivel de la dermis se observa respuesta de los fibroblastos, producción del colágeno de grado leve y epitelización de grado leve.

4.2. Discusión.

La flora medicinal peruana presenta diversas especies de uso medicinal, las mismas que provienen del uso tradicional. Algunos autores han reportado especies con actividad cicatrizante (Villegas y col, 1997)²⁰.

La búsqueda de agentes con actividad cicatrizante ha adquirido singular importancia en los últimos años, siendo la especie más representativa *Croton lechleri* “Sangre de grado”. Últimamente el Instituto de Medicina Tradicional de Iquitos ha desarrollado un producto natural, el mismo que está en fase de estudio Dermo Imet a base de *Plukenetia volubilis* L. “Sacha Inchi (Organización Panamericana de la Salud, 2018)²⁴.

Remedio contra las amebas y la viruela (Zárate Pedroche, 1987)²⁵

La especie *Leucaena leucocephala* (Lam) DE WIT. no presenta a la fecha estudios de actividad cicatrizante, presentando estudios de otras actividades biológicas (Hassan y col, 2014; Benjakul y col, 2013; Naphatsorn kumar y Chaiyavat Chaiyasut, 2017)^{26,27,28}.

Asimismo, especies de la familia Fabaceae, a la cual pertenece la especie *Leucaena leucocephala* (Lam) DE WIT. como *Senna reticulata* (willd) H. Irwin & Barneby (“Retama”), han demostrado presentar actividad cicatrizante del extracto etanólico de las hojas, donde el mayor efecto cicatrizante es a mayores concentraciones. Esto podría deberse a la presencia de dihidroxiisoflavonas, trihidroxiisoflavonas y taninos (Vargas Carbajal, 2007)²⁹.

En otra especie de la misma familia *Senna Versicolor* (Meyen ex.J. Vogel) H.S. Irwin & Barneby. Var: versicolor “mutuy”, se identificó flavonoides, taninos, carbohidratos, azúcares reductores y/o esteroides, saponinas y cumarinas, teniendo actividad cicatrizante el extracto hidroalcohólico de las hojas secas (Chuctaya Yauri y Roque Magno, 2018)³⁰.

Finalmente, otra especie de la misma familia *Astragalus garbancillo* Cav (garbancillo), también mostro actividad cicatrizante en ratones, en el extracto hidroalcohólico al 20%, y presencia de flavonoides, alcaloides, taninos y compuestos fenólicos (Robles Perez y Torres Taipe. 2018)³¹.

El estudio de actividad cicatrizante planteado en el presente trabajo, ha sido realizado durante la fase inflamatoria de la cicatrización, donde se produce un estrés oxidativo por la presencia de especies reactivas de oxígeno, debido a la injuria producida por la incisión para producir la herida. Esto produce retraso en el proceso de cicatrización de heridas, reducción en la producción de colágeno entre otros (Emery Tsala y col, 2013)³². Es importante resaltar que tanto el extracto etanólico a la concentración de 110% y 140% presentan producción de colágeno en grado moderado y leve, el extracto de 110% lo hace en mayor proporción de grado moderado. La actividad cicatrizante de *Leucaena leucocephala* (Lam) DE WIT, podría deberse a la presencia de flavonoides presentes en la planta, las cuales son capaces de aumentar la disponibilidad de antioxidantes endógenos, así como la actividad de enzimas antioxidantes (Díaz-Solares y Col, 2017)³³. Hay que tener en cuenta que la especie ha demostrado tener alta actividad antioxidante (Naphatsorn kumar y Chaiyavat Chaiyasut, 2017)²⁸, lo que permite reforzar esta hipótesis. Por otro

lado, sería conveniente que en estudios posteriores se evalúen la actividad cicatrizante en diferentes condiciones, evaluándola por ejemplo en otras fases de la cicatrización.

CONCLUSIONES

1. La especie vegetal presentó metabolitos como grupos fenólicos libres, aminoácidos, flavonoides, triterpenoides y/o esteroides, antraquinonas, catequinas y saponinas.
2. El extracto a la concentración de 110% presentó mayor actividad cicatrizante significativa $p < 0.05$. Siendo mayor al control positivo.
3. En cuanto al estudio histológico, de la muestra tomada de la piel regenerada de los ratones con la concentración de 110% se observó que posee una mayor producción de colágeno y tejido de granulación al compararlo con el control negativo.

RECOMENDACIONES

1. Continuar el estudio de la especie, en otros modelos experimentales de actividad cicatrizante.
2. Seguir con estudios relacionados a otras actividades.
3. Determinar la estructura química de los metabolitos secundarios identificados en el extracto etanólico.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Juro S, Flores V, Mendoza Y, Del Carpio C. Efecto cicatrizante de las diferentes formas farmacéuticas tópicas elaboradas con el extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels “nogal” en ratones albinos. *Folia Dermatológica Perú* 2010; 21 (1): 19-24.
2. Flores MI. Manejo avanzado de heridas. *Revista Mexicana de Enfermería Cardiológica* 2006; 14 (1): 24-28.
3. Carrera CC. En la naturaleza está la respuesta: "Micronutrientes: las vitaminas, agentes terapéuticos en las heridas". *Enferm. glob.* vol. 12 no. 31 Murcia jul. 2013.
4. Prieto-González S, Garrido-Garrido G, González-Lavaut JA, Molina TJ. Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 35, No. 1, 2004.
5. Brako, L, Zarucchi, JL. Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Peru. St. Louis. Missouri Botanical Garden, 1993.
6. Olaechea GA, Tincopa CR, Vargas CY. Estudio Químico y Biológico de *Leucaena leucocephala* de Wit. “Yaravisco”. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica, 1998.
7. Benjaku S, Kittiphattanabawon P, Sumpavapol P, Maqsood S. Antioxidant activities of lead (*Leucaena leucocephala*) seed as affected by extraction

solvent, prior dechlorophyllisation and drying methods. J Food Sci Technol (November 2014) 51(11):3026–3037

8. Soares AMS, Sandra Alves de Araújo, Lopes SG; Junior LMC. Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* protein extracts on *Haemonchus contortus*. Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal, v. 24, n. 4, p. 396-401, Oct.-Dec. 2015.
9. Hassan RA, Tawfik WA, Abou-Setta LM. The flavonoid constituents Of *Leucaena Leucocephala*. Growing in Egypt, and their Biological Activity. Biomedical Research 2017; 28 (7): 2893-2897.
10. She LCH, Liu CHM, Chen CHT, Li HT, Li WJ, Chen CHY. The anti-cancer and anti-metastasis effects of phytochemical constituents from *Leucaena leucocephala*. Biomedical Research 2017; 28 (7): 2893-2897.
11. Kuppusamy UR, Arumugam B, Azaman N, Wai CHJ. *Leucaena leucocephala* Fruit Aqueous Extract Stimulates Adipogenesis, Lipolysis, and Glucose Uptake in Primary Rat Adipocytes. The Scientific World Journal Volume 2014.
12. Esteva E. El Tratamiento De Las Heridas. Tipos De Apósitos Y Antisépticos. O F F A R M 2006 Vol. 25 Núm. 8 septiembre 54-60
13. Martín-Aragón S. Marcos E. Tratamiento de las cicatrices. Farmacia Profesional. Farmacia Espacio de Salud. Vol. 22, Núm. 6, junio 2008.

14. Castrillón RL, Alejandro Palma RA, Padilla DMC. Interferencia de las biopelículas en el proceso de curación de heridas. *Dermatología RevMex* 2011; 55(3): 127-139.
15. Sociedad Argentina De Dermatología. Consenso Sobre Cicatrización De Heridas 2008). Acceso 20 de enero 2018, Disponible en <http://www.sad.org.ar/wp-content/uploads/2016/04/cicatrizacion.pdf>.
16. Valencia CB. Cicatrización: Proceso de Reparación Tisular. Aproximaciones Terapéuticas. *Investigaciones Andina* N° 20 Vol. 12 (85-98). Acceso 20 de enero 2018, Disponible en www.scielo.org.co/pdf/inan/v12n20/v12n20a08.pdf.
17. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 2ª Ed. Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima; 1994: 300 p.
18. Maldonado ME, Zapata ZM. Determinación de la Actividad Cicatrizante y Toxicidad Aguda, In vivo, del extracto etanólico del fruto de la *Caesal piniaspinosa* (Mol.) Kuntze; Tara. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica, 1997.
19. Segura MA, Vergel MR. Determinación de la Actividad Cicatrizante de una forma farmacéutica semisólida de uso tópico a partir del propóleo. Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico. UN San Luis Gonzaga de Ica 2004.
20. Villegas LF, Fernández ID, Maldonado H, Torres R, Zavaleta A, Vaisberg AJ, Hammond GB. Evaluation of the wound-healing activity of selected

traditional medicinal plants from Perú. J Ethnopharmacol. 1997 Feb; 55(3):193-200.

21. Cortez OJ, Jayo VS. Actividad Antioxidante y cicatrizante de una solución hidroalcohólica de *CrotonLechleri* (Sangre de Grado), absorbido en un biopolímero (hydrogel de quitosano) Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico. UN San Luis Gonzaga de Ica 2008.
22. Bejarano BL, Mormontoy LW, Tipacti AC. Muestreo e Inferencia Estadística en Ciencias de la Salud. 1ª Ed. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima; 2006: 250 p.
23. Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires. Reglamento para el cuidado y uso de Animales de Laboratorio en la Facultad de Medicina Fecha de acceso 5 de febrero del 2018. Disponible en <http://www.fmed.uba.ar/investigadores/cicual/reglamfmed.doc>
24. Organización Panamericana de la Salud. Situación De Las Plantas Medicinales En Perú. Grupo técnico de expertos en plantas medicinales OPS/OMS Lima-Perú 2018. Fecha de acceso 30 octubre 2019. Disponible en https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50479/OPSPER19001_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
25. Zárate S. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit subsp. glabrata (Rose). *Phytologia* **63**(4): 304-306. 1987.

26. Hassan, RA; Tawfik, WA; Abou-Setta, LM. The flavonoid constituents of *Leucaena leucocephala*. Growing in Egypt, and their biological activity. Afr J Tradit Complement Altern Med ; 11(1): 67-72, 2014.
27. Benjakul S, Kittiphattanabawon P, Shahidi F, Maqsood S. Antioxidant activity and inhibitory effects of lead (*Leucaena leucocephala*) seed extracts against lipid oxidation in model systems. Food Sci Technol Int ; 19(4): 365-76, 2013 Aug.
28. Kumar N, Chaiyasut Ch. Health Promotion Potential of Vegetables Cultivated in Northern Thailand: A Preliminary Screening of Tannin and Flavonoid Contents, 5 α -Reductase Inhibition, Astringent Activity, and Antioxidant Activities. Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine 2017, Vol. 22(4) 573-579.
29. Vargas C.J. Estudio de la actividad cicatrizante y antiinflamatorio del extracto alcohólico de las hojas de *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby (“Retama”) Tesis para optar el Grado de Magisterg en Recursos Vegetales y Terapéuticos. UN Mayor De San Marcos 2007.
30. Chuctaya Y. Roque M. Investigación de las tesis realizadas sobre plantas medicinales y alimenticias en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Norbert Wiener del 2012 al 2016. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. U. Norbert Wiener 2018.
31. Robles P. Torres L. Efecto cicatrizante de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Astragalus garbancillo* cav. (Garbancillo) en ratones *Mus musculus* Balb c.

en la Facultad de Farmacia y Bioquímico de la Universidad María Auxiliadora.
Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico U. María
Auxiliadora 2018.

32. Tsala D.E., Amadou D, Habtemariam S. Natural wound healing and bioactive natural products. *Phytopharmacology* 2013, 4(3), 532-560.
33. Díaz-Solares M, Castro-Cabrera I, Lugo-Morales Y, Prieto-Abreu M, Altunaga-Pérez N, López-Vigoa O. Potencial antioxidante y cicatrizante de extractos frescos de *Morus alba* Antioxidant and healing potential of fresh *Morus alba* extracts. *Pastos y Forrajes*, 2017, (40), 2, 135-143.

ANEXOS

Anexo N°1: Matriz de Consistencia

Problema	Tipo de Investigación	Objetivos	Variables	Definición	Tipo y Naturaleza	Operacionalización de Variables		
						Dimensión	Indicador	Instrumento
¿Tendrá actividad cicatrizante el extracto etanólico de hojas de <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam) de Wit? “Yaravisco”?	Estudio cuasi-experimental, preclínico in vivo	Obtención del extracto etanólico de hojas de <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit. “Yaravisco.	Extracto etanólico de Hojas de <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit. “Yaravisco”	Extracto obtenido a partir del material vegetal con etanol.	Independiente	Rendimiento del extracto	Cantidad en gramos de extracto obtenido con etanol.	Balanza Analítica
		Determinar la actividad cicatrizante del extracto etanólico de hojas de <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit. “Yaravisco	Actividad Cicatrizante	Actividad Farmacológica, por la cual las heridas son cerradas con la aplicación de un fármaco cicatrizante	Dependiente	Eficacia cicatrizante	Fuerza para abrir la herida expresada en gramos	Tensiómetro
		Determinar los metabolitos secundarios presentes en las hojas de <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit. “Yaravisco.	Metabolitos Secundarios	Metabolitos secundarios presentes en el extracto y/o fracciones.	Dependiente	Grupos Químicos	Presencia/Ausencia de Metabolitos Secundarios	Reacciones de Identificación

Anexo N°2: Recolección de la especie vegetal



Anexo N°3: Obtención del Extracto



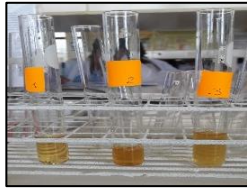


Anexo N°4: Obtención de Fracciones



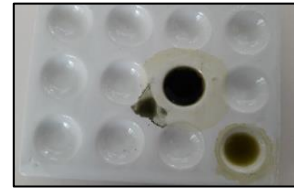
Anexo N°5: Detección de Metabolitos Secundarios

Fracción A



Reacción de Gelatina-Sal

Detección de Taninos



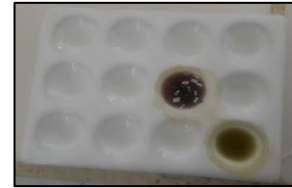
Reacción de Cloruro

Detección de Aminoácidos



Reacción de Ninhidrina

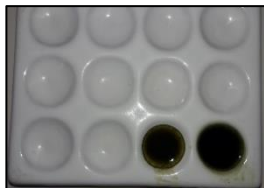
Detección de Flavonoides



Reacción de Shinoda

Fracción B

Detección de Triterpenoides
y/o Esteroides



Reacción de Lieberman
Burchard

Detección de Antraquinonas



Reacción de Borntrager

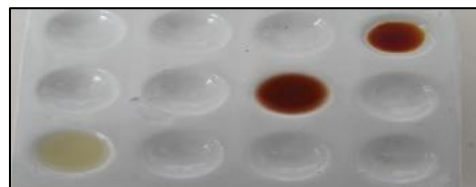
Fracción C

Detección de Triterpenoides y/o Esteroides



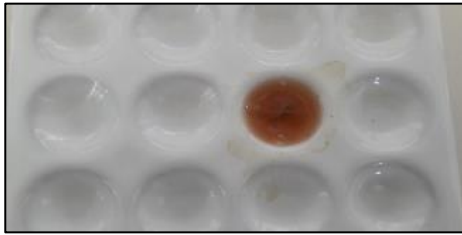
Reacción de Lieberman Burchard

Detección de Alcaloides



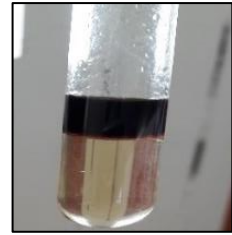
Fracción D

Detección de Flavonoides



Reacción de Shinoda

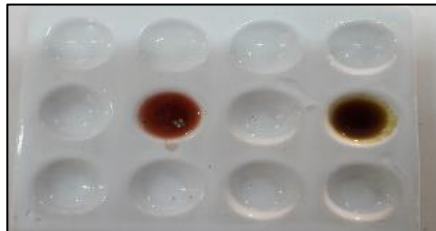
Detección de Leucoantocianidinas y Catequina



Reacción de Rosenheim

Fracción E

Detección de Flavonoides



Reacción de Shinoda

Detección de Leucoantocianidinas y Catequina



Reacción de Rosenheim

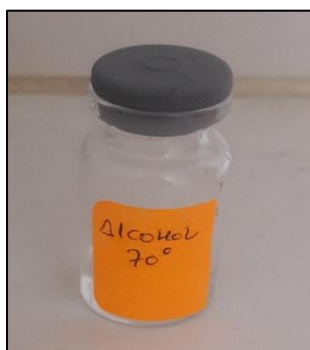
Fracción F

Detección de Saponinas



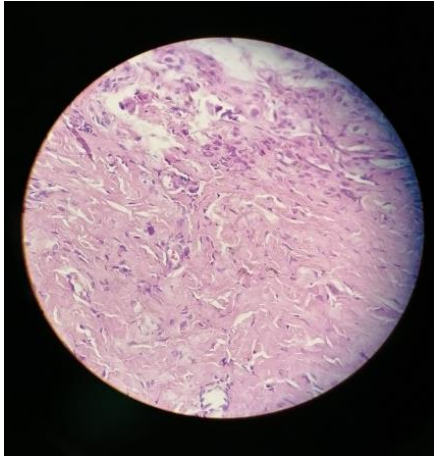
Prueba de la Espuma

Anexo N°6: Ensayo Farmacológico

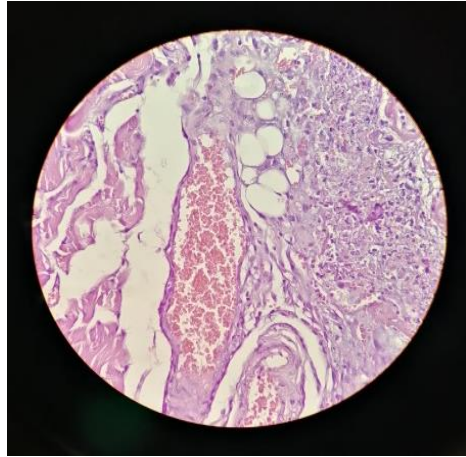




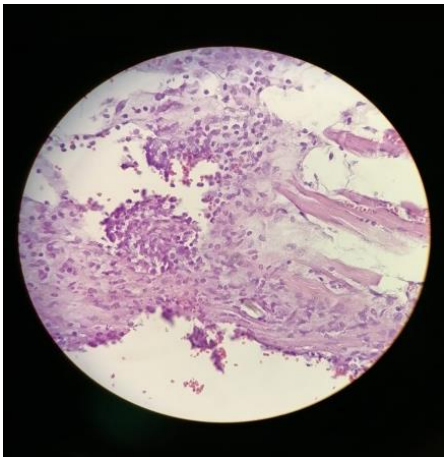
Anexo N°7: Cortes Histológicos



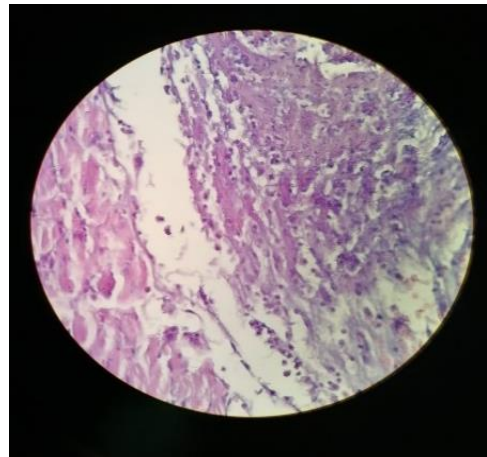
Extracto 110%



Extracto 140%



Control Negativo



Control Positivo

Anexo N°8: Certificado Sanitario

**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS
COORDINACIÓN DE BIOTERIO**

CERTIFICADO SANITARIO N° 191- 2018

Producto	: Ratón albino	Lote N°	: M-27-2018
Especie	: <i>Mus musculus</i>	Cantidad	: 40
Cepa	: Balb/c/CNPB	Edad	: 1 mês
Peso	: 15 a 24 g.	Sexo	: machos
Guía de remisión	: 036070	Destino	: Quispe Ciprian, Liliana
Chorrillos	: 02 - 07 - 2018		Palpa - Ica

El Médico Veterinario, que suscribe, **Arturo Rosales Fernández**. Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias * .

*Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.

Chorrillos, 02 de julio del 2018
(Fecha de emisión del certificado)

NOTA: El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.



.....
M.V. Arturo Rosales Fernández.
C.M.V.P. 1586

Anexo N°9: Constancia de Posición Taxonómica



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

CONSTANCIA N°51-USM-2017

EI JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa) recibida de **Liliana QUISPE CIPRIAN**; estudiante de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica, ha sido estudiada y clasificada como: ***Leucaena leucocephala*** (Lam.) de Wit. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ROSIDAE

ORDEN: FBALES

FAMILIA: MIMOSACEAE

GENERO: *Leucaena*

ESPECIE: *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.

Nombre vulgar: "yarabisco"
Determinado por Blgo. Severo Baldeón Malpartida

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Lima, 25 de abril de 2017



Mag. ASUNCIÓN CANO ECHEVARRIA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ACE/ddb