

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA.

ESCUELA DE POST-GRADO



**Estudio de la actividad cicatrizante y antiinflamatoria del
extracto alcohólico de las hojas de Senna reticulata (Willd.) H.
Irwin & Barneby ("Retama")**

TESIS

**para optar el Grado de Magister en Recursos Vegetales y
Terapéuticos**

AUTOR

Carlos Javier Vargas Carbajal

ASESOR

Miguel Félix Véliz

Lima – Perú

2007

SUMARIO

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
I- INTRODUCCIÓN.....	4
II-1 GENERALIDADES.....	6
1.1-Estudio de la planta.....	6
1.2-Estudio de la Inflamación.....	16
1.3-Estudio de la Cicatrización.....	18
III- PARTE EXPERIMENTAL	21
1-Materiales, reactivos, equipos e instrumentos.....	21
2-Método Experimental.....	22
2.1-Recolección de la especie y obtención del extracto etanólico.....	22
2.2-Screening Fitoquímico.....	23
2.3-Screening cromatográfico.....	23
2.4-Estudio Farmacológico.....	24
2.4.1-Actividad antiinflamatoria.....	24
2.4.2-Actividad cicatrizante	26
IV- RESULTADOS	28
V- DISCUSIÓN.....	42
VI- CONCLUSIONES.....	44
VII- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
VIII- ANEXOS.....	50

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto antiinflamatorio y cicatrizante del extracto etanólico de hojas de *Senna reticulata* (Willd.)H.Irwin & Barneby “Retama” procedente del Departamento de San Martín (Tarapoto). Se determinaron los metabolitos secundarios mediante la marcha fitoquímica, identificando flavonoides, alcaloides, taninos, saponinas y glicósidos. Luego se efectuó el screening cromatográfico, para posteriormente realizar las lecturas al espectrofotómetro.

Para la investigación farmacológica se preparó una crema base cold-cream a la cual se le añadió concentraciones de 5%, 10% y 20% del extracto, realizando el estudio antiinflamatorio y cicatrizante en ratones albinos de 25 a 30 g. Comparándose con Diclofenaco al 1% en gel para el efecto antiinflamatorio dando resultados no significativos. Mostró acción cicatrizante significativa confrontando con Neomicina-Bacitracina, glicina, L- cisteina, DL – treonina; obteniendo mayor efecto con la crema al 20% luego la crema al 10% y la crema al 5% del extracto etanólico.

PALABRAS CLAVES: *Senna*, “Retama”, actividad antiinflamatoria, cicatrizante.

ABSTRACT

In the present thesis there was evaluated the antiinflammatory and healing effect of the extract etanolic of leaves of *Senna reticulata* (Willd.) H Irwin & Barneby “Broom” proceeding from the departament of San Martín (Tarapoto). The secondary metabolitos were identified by phytochemistry procedure identifying flavonoids, alkaloids, tannins, saponines and glicosides. Then the chromatographic screening was effected later to realize the readings to the spectrophotometer.

For the pharmacological investigation a cream was prepared base cold-cream to which were added concentrations of 5%, 10% and 20% of the extract, realizing the antiinflammatory and healing study in albino mice from 25 to 30 g. being compared by Diclofenaco to 1% in gel for the antiinflammatory effect giving not significant results. Showed healing significant action bordering with Neomicine – Bacitracine, glicine, L-cisteine, DL –treonine; obtaining major effect with the cream to 20% then the cream to 10% and the cream to 5% of the extract etanolic.

KEY WORDS: Senna, “Broom”, antiinflammatory, healing activity.

I - INTRODUCCIÓN

Actualmente dada la importancia y el redescubrimiento de la medicina alternativa llamada a una de sus ramas Medicina Tradicional, la cual ha servido por muchas generaciones al alivio de un sin número de enfermedades, nuestro país no está ajeno a estos procedimientos, por el contrario posee diversidad de plantas medicinales, debido a los diferentes ecosistemas en las regiones naturales del Perú, donde existe una gran biodiversidad de la flora y puede ser la fuente para el tratamiento de diversas enfermedades. El Perú como país del tercer mundo tiene todavía mucho por hacer, como elevar el nivel de vida de los pobres, disminuir la desnutrición infantil y aminorar diversas afecciones. Es así que a los profesionales de la salud y más aún a los Químicos – Farmacéuticos nos toca el deber de contribuir con nuestros conocimientos científicos y hacer extensivo las propiedades de nuestras especies que pueden abarcar el mercado interno y el externo. La posibilidad de industrialización de nuestros recursos naturales, terapéuticos, es una línea promisoría que tendría sustento siempre y cuando corroboremos su eficacia, primero con la identificación de sus componentes y posteriormente su aplicación en personas (55). Los sistemas de promoción han encontrado dificultades en la definición de metodologías, para poder comercializarlo como producto natural, la conversión de huertos caseros a empresas comerciales de fitofármacos para el mercado interno deben cumplir parámetros de acuerdo a las normas dadas por la autoridad de salud. (DIGEMID). Tradicionalmente diversos pueblos de nuestra costa, sierra y selva recurren a las plantas medicinales para aliviar sus enfermedades en forma empírica o en todo caso recurren al curandero para que le recomiende una pócima o un emplasto para el alivio de sus males.

El presente estudio realizado con las hojas de *Senna reticulata* (Willd.) H.Irwin & Barneby “Retama” permitirá crear un medicamento a través del conocimiento científico, a partir del extracto etanólico, ejecutando la marcha fitoquímica, el screening cromatográfico y el estudio farmacológico.

OBJETIVOS GENERALES:

1. Determinar la actividad antiinflamatoria y cicatrizante del extracto etanólico de las hojas de *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby.
2. Identificar los metabolitos secundarios principales presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Identificación de los principales metabolitos por marcha fitoquímica, cromatografía en capa fina y métodos espectroscópicos.
2. Determinar el efecto antiinflamatorio de la fracción responsable en animales de experimentación.
3. Determinar el efecto cicatrizante de la fracción responsable en animales de experimentación.
4. Demostrar la dosis responsable de los efectos terapéuticos en animales de experimentación.

HIPÓTESIS:

1. El extracto etanólico de las hojas de *Senna reticulata* (Willd) H.Irwin & Barneby tiene actividad antiinflamatoria.
2. El extracto etanólico de las hojas de *Senna reticulata* (Willd) H.Irwin & Barneby tiene actividad cicatrizante.

II- GENERALIDADES

II-1.1-ESTUDIO DE LA PLANTA

La Retama, *Senna reticulata* (Willd.) H.Irwin & Barneby es una especie que crece en forma silvestre, en los valles andinos y en ciudades de ceja de selva. Las diferentes variedades de Retama se indica que son originarias del sur de Europa; crece espontánea en España y países del Mediterráneo (57). Se menciona que muchas variedades de Retama se distribuyen en el Perú, en las ciudades serranas como Cajamarca, Chachapoyas, Huancayo, Abancay y Urubamba. Requiere de un clima templado y seco, es muy resistente a las sequías vegetando en suelos estériles, pedregosos y áridos (57). Existe la Retama de Tintoreros “*Genista tinctoria* L.” la cual posee propiedades diuréticas al tomar infusiones de flores en menos concentración, pero a mayor concentración se utiliza como laxante o purgante(28). La Retama Gayomba “*Spartium junceum* L.” llamada retama de olor presenta el alcaloide citisina. También existe la Retama común “*Retama sphaerocarpa* Boissier” denominada Retama ginestra la cual en las cortezas y ramas contiene el alcaloide retamina en 0,40% variando a 1,1% y la d-esparteína (paquicarpina) al 1,6% (28). Se conoce la Retama negra “*Cytisus scoparius* (L.)” la cual presenta la esparteína, alcaloide quinolizidínico gangliopléjico y analéptico cardíaco, se toma como infusión ya sea de las ramas ó flores , contiene flavonoides los cuales se encuentran en todos los órganos; son principalmente isoflavonas y c-glucósido en C – 8 de las 5, 7, 4 – Trihidroxi – 3 – metoxiflavona y aminas que se concentran sobre todo en las flores, tiramina, dopamina y su derivado N – metilado, la epinina. (14)

La retama, *Senna reticulata* (Willd.) H.Irwin & Barneby presenta una raíz típica, axonomorfa, profunda y se orientan en busca del agua del subsuelo. Sus hojas simples, oblongas, enteras, algo pilosas en el dorso, de 14 cm de longitud por 5 cm ancho en promedio, enteras, con ápice y bases agudos.

El nervio principal está impreso en el haz y el relieve en el envés; la nervación secundaria es inconspicua, láminas glabras. (49). Las flores son papilionadas de simetría irregular, la prefloración de la corola es imbricada descendente, y presenta los estambres soldados unidos por sus filamentos, es monodelfo formando un solo haz alrededor del pistilo, el gineceo de unos 2 cm de longitud con ovario súpero alargado pubescente, estilo incurvado y el estigma capitado, el cáliz cupuliforme y oblicuo irregularmente dentado. Frutos legumbres de 4 a 6 cm de longitud de color verduzco a marrón claro, pubescentes con 15 a 20 semillas por vaina.

Foto N°1

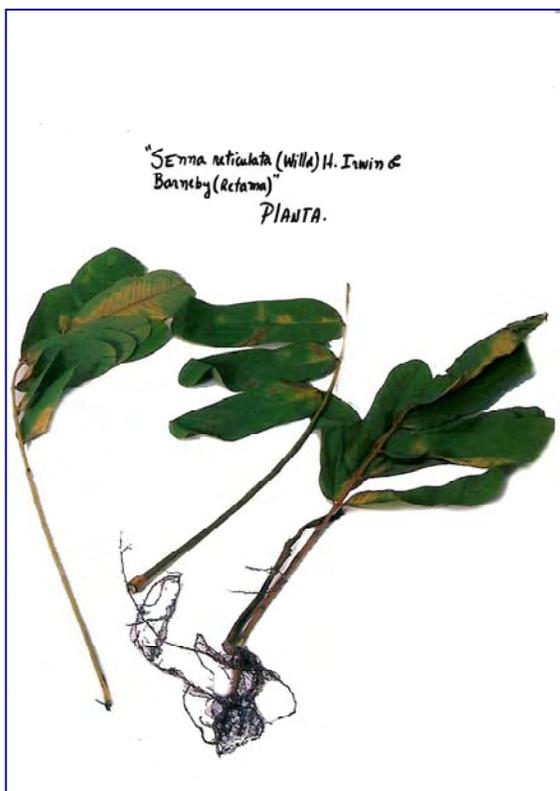


Foto N°2

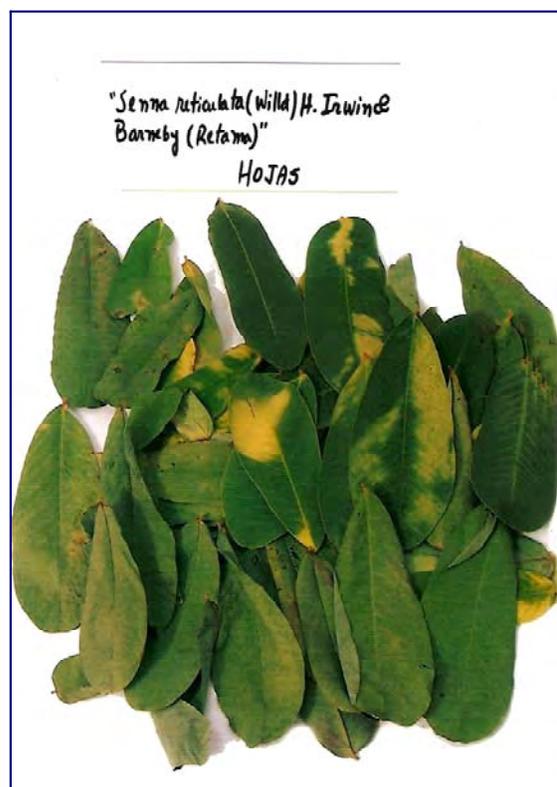


Foto N°3

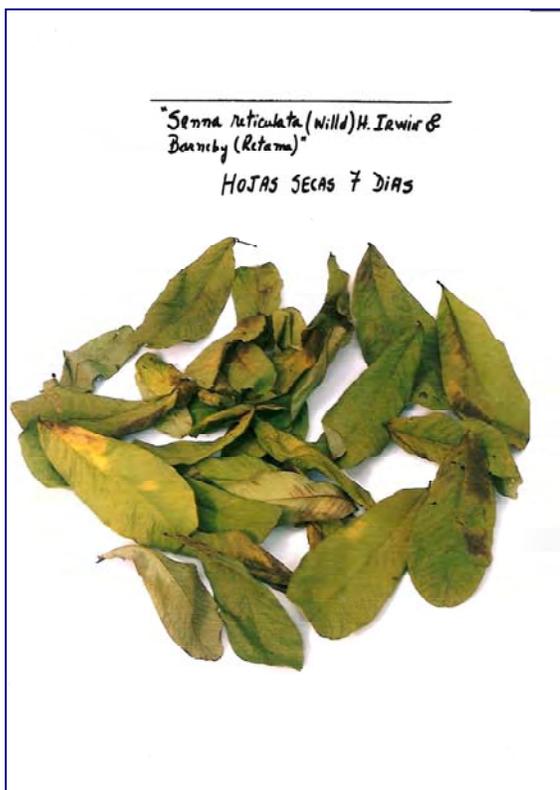
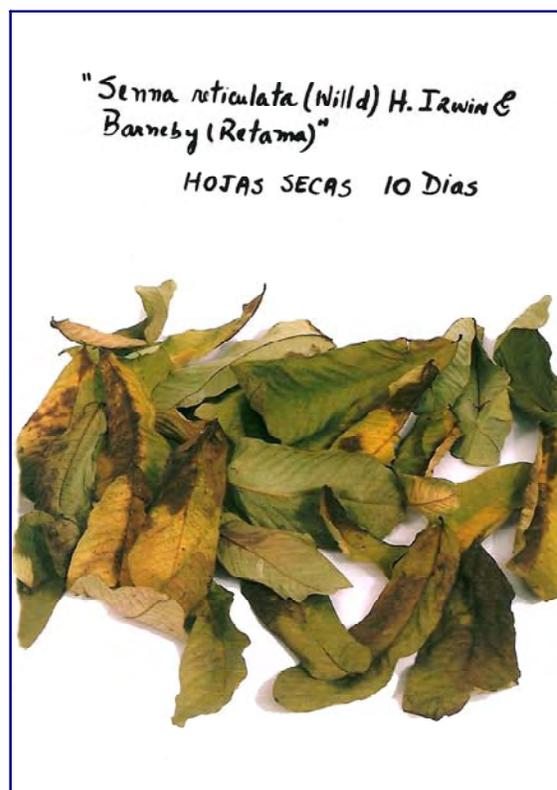


Foto N°4



II-1.1.1-CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA

La familia Fabaceae, es extraordinariamente rica en especies. Se haya difundida por toda la tierra constituida por numerosas plantas con más de 12000 variedades de hierbas, matas y árboles. Las formas leñosas se ubican principalmente en las regiones tropicales, las herbáceas mayormente en las extratropicales. Muchas especies prefieren terrenos pobres en nitrógeno o calcáreos por lo que abundan sobretodo en las estepas. (57)

Las hojas son alternas, generalmente compuestas, pinadas y con estipulas. Poseen flores hermafroditas, con cáliz y corola; esta última dialipétala de simetría radiada o zigomorfa, generalmente la inflorescencia es racimosa. (23). Las bacterias del género *Rhizobium*, que se introducen a las raíces de este tipo de plantas en donde hipertrofía las células y forman tuberosidades, las bacterias aprovechan los azúcares de la planta y con ellos fijan el nitrógeno libre de la atmósfera sintetizando proteínas. La planta a su vez utiliza parte de los compuestos nitrogenados elaborados por las bacterias. (53)

II-1.1.2-ANTECEDENTES DE USO

La *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby, llamada popularmente “Retama”, en el Perú es usada como emplasto triturado sobre la piel , previamente lavado, para el tratamiento de inflamaciones y heridas. Para abscesos se coge un puñado de hojas, se extiende sobre una gasa, machacándolas ligeramente para que exude el jugo y se aplica en forma de cataplasma varias veces al día hasta que madure. (49)

En algunas comunidades altoandinas, es muy usada por los campesinos, junto con otras plantas como el “Romero” *Rosmarinus Officinalis* y la “Ruda” *Ruta graveolens* para sacar el mal de la casa cuando alguna persona fallece después de 8 días pasando estas plantas por toda la casa, a la vez que se reza. Sus flores solas son usadas en baños para eliminar la mala suerte. (55).

El mecanismo de acción del estudio farmacológico de la “Retama” es desconocido, en otras variedades de Retamas tanto en flores como en semillas, se han encontrado el ácido esparteico, genisteína, sarotamina, escorparina, melanina, citisina, taninos, principio amargo, aceite esencial y resina. (28)

II-1.1.3-CARACTERISTICAS DEL GÉNERO SENNA

En la actualidad las especies del género Cassia L. han sido segregadas en dos géneros mas, Chamaecrista Moench (250 especies) y Senna Mill. (250 especies) basándose en el detalle del androceo, de los frutos y las semillas. En el Perú el número de especies es alrededor de 60, son arbustos erguidos que miden de 50 cm hasta 3.5 m de altura, con tallo cilíndrico casi siempre torcido y ramificaciones alternas desde la base. Las hojas son compuestas de 8 a 10 foliolos paripinnados, las flores son completas de color amarillo dispuestas en racimos axilares, alargados. Los frutos son vainas de cubierta lisa, miden de 7 a 10 cm de largo y 1 cm de ancho. (57)

II-1.1.4-SENNAS NATIVAS Y EUROPEAS

Entre las más importantes en el Perú se tiene a C. Tomentosa, C. Hookeriana y C. Latopetiolata, se encuentran entre 2700 y 3800 msnm. Existen la Cassia senna L. (Cassia acutifolia Delile, Senna alexandrine Mill.) y Cassia augustifolia Vahl, la Cassia tora L. es utilizada en el Perú como sustituto del café, existe también la Cassia alata L. (Senna alata L. Roxb.), la Cassia occidentalis. (Senna occidentalis (L.) Link) usada como laxante y purgante. (40, 39).

II-1.1.5-CLASES DE RETAMA EN EL PERÚ Y SINONIMIAS POPULARES

- C. bicapsularis* L. s.v. odipera, bejuco, alcapaquilla, alcaparillo, alpaquilla, retama. En Cuba la llaman “sen del país”, sus hojas usadas como purgante.
- C. fruticosa* Mill. s.v. amargo – caspi, llucho vainilla, retama, retamilla, retama común, retamilla.
- C. lorentensis* Killip & Macbr. s.v. flor de caña, matayo, retama, yana huir.
- C. occidentalis* L. s.v. achuporoto, achuporoto, ayo porotillo, ayac poroto, retama, retamilla, retanilla, uchpa poroto, sus raíces son diuréticas.
- C. reticulata* Willd. s.v. retama, sapechihua, shunashut, según Robins se usa contra la gonorrea crónica y afecciones a la piel.
- C. tomentosa* L.f. s.v. alcaparra, huashlla, mutui, motuy, mutuy – mutuy, tanquis.
- C. spinencens* Hoff. s.v. retama con espinas. (58).

De acuerdo al Sistema de Clasificación de A. Cronquist et al 1981, se ubica en las siguientes categorías taxonómicas:

CLASE : Magnoliopsida

SUBCLASE : Rosidae

ORDEN : Rosales

FAMILIA : FABACEAE

GENERO : Senna

ESPECIE : *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby

NOMBRE : Retama
COMÚN

II-1.1.6-ESTUDIOS EFECTUADOS CON ESPECIES DE “RETAMA”

Román, M. (1999):

Evaluación de la Aptitud Forrajera de *Spartium junceum* “Retama” y *Verbiana Tomentosa* D.C. (Putka). Tesis Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima

Se realizó un screening fitoquímico para determinar metabolitos secundarios.

Callapiña, M.; Crispin, V.; Pérez, A.(1995).

Actividad Mutagénica de los extractos de *Spartium junceum* L. “Retama” Investigación realizada en el Instituto de Recursos Naturales y Terapéuticos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

El extracto acuoso de flores de *Sparteum junceum* no presentó actividad mutagénica evidente con ninguna de las cepas con y sin activación metabólica.

Pareja, B.; Juárez, J.; Garcia, M.; Gorriti, A.; Benavides, E.; Plasencia, M. (2002):

“Plantas empleadas en la Medicina Tradicional”. Investigación realizada en la Facultad de Farmacia y Bioquímica con *Plantago mayor* L. zumo de hojas tiene efecto antiinflamatorio y cicatrizante; se determinó que posee proteínas, flavonoides, taninos y terpenos.

II-1.1.7-ESTUDIOS EFECTUADOS EN PLANTAS CON ACCIÓN ANTIINFLAMATORIA Y CICATRIZANTE.

Arroyo, J. et.al (1999):

Efecto cicatrizante del *Piper angustifolium* R&P sobre lesiones de piel inducidas en animales de experimentación (2). Se comprobó la actividad cicatrizante del extracto en animales de experimentación utilizando un fármaco estándar.

Felix, M. (1999):

Estudio fitoquímico y determinación de las flavanonas y alcaloides de naturaleza indólica en hojas de *Perezia multiflora* (H. Et B.) Less. “Escorsonera”. Tesis para optar el título de Magister en Recursos Vegetales y Terapéuticos – Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se determinó mediante la marcha fitoquímica la presencia de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides y taninos. Los flavonoides presentes en la especie tipo flavona serían los responsables de la actividad antiinflamatoria.

Orna, R.; Llacsahuanga, E. (2000):

“Estudio del efecto cicatrizante de un gel formulado a base de *Rumex cuneifolius* *Campdera* “*CUTU RUMANSA*” Tesis para optar el título de Químico-Farmacéutico – Universidad Nacional Mayor de San Marcos Se efectuó cocimientos de la especie a diversas concentraciones dando mayor resultado al 8 %, el gel preparado al 16% produce mayor acción cicatrizante corroborado con el método de fuerza de tensión aplicado. La marcha fitoquímica determinó azúcares, compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, gomas y mucílagos.

Guillermo, F.; Bonilla, P.; Arroyo, J. (1995)

“Efecto cicatrizante del tallo subterráneo de *Peperomia scutellaefolia* R. Et P. en geles aplicados a *Ratus norvegicus*” Trabajo de investigación realizada en el Instituto de Orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se obtuvo mayor efecto cicatrizante con el gel al 5%, se determinó la presencia de flavonoides, derivados del núcleo de los dihidroflavonoles e isoflavonas.

Tillán, J.; Castro, I. ; Bueno, V.; Carrillo, C.; Ortiz, M. (2004)

“Efecto cicatrizante de la crema de extracto etanólico de cera de caña” Investigación desarrollada en la ciudad de la Habana Cuba, en le Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Se realizaron formulaciones semisólidas del extracto etanólico de cera de caña 2,5, 5, 10, 20, 30 y 40%, determinándose una mejor respuesta a dosis de 5 al 10%.

II-1.1.8-COMPOSICIÓN QUÍMICA

En los trabajos realizados en la parte físico-química que incluyen la marcha fitoquímica, se determinaron la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, compuestos fenólicos, glicósidos, carbonilos.

II-1.2-ESTUDIO DE LA INFLAMACIÓN

El proceso inflamatorio incluye una serie de fenómenos que pueden ser desencadenados por diversos estímulos como son agentes infecciosos, isquemia, interacciones antígeno-anticuerpo, y lesiones térmicas o físicas de otra índole. Cada tipo de estímulo desencadena un patrón característico de reacción o respuesta que constituye una variante relativamente menor del mismo fenómeno. A un nivel macroscópico, la respuesta por lo común se acompaña de los conocidos signos clínicos como eritema, edema y dolor (hiperalgesia) a la palpación y espontáneo. Las respuestas inflamatorias surgen en tres fases diferentes y cada una al parecer es mediada por mecanismos distintos: una fase transitoria aguda que se caracteriza por vasodilatación local y mayor permeabilidad; una fase subaguda tardía que se identifica más bien por infiltración de leucocitos y fagocitos, y una fase proliferativa crónica en que se advierten degeneración y fibrosis tisulares. En el proceso global, intervienen muchos mecanismos **Gallin y col.1992; Kelly y col. , 1993**. La habilidad para desencadenar una respuesta de esta índole es esencial para la supervivencia, dados los innumerables agentes patógenos y lesivos ambientales existentes, aunque en algunas situaciones y enfermedades la respuesta que se expone puede ser intensificada y perpetuada sin un beneficio manifiesto (56).

II-1.2.1- MECANISMO DE ACCIÓN

El ácido araquidónico es un ácido graso constituyente de los fosfolípidos presentes en todas las membranas celulares. Es liberado al citoplasma en respuesta a un estímulo químico o mecánico a través de la acción de la fosfolipasa A. Una vez liberado, el ácido araquidónico es oxidado por dos vías: la ciclooxigenasa (COX) o la 5-lipoxigenasa. La primera lleva a la producción de las prostanglandinas y la segunda de los leucotrienos (35).

En la inflamación intervienen de manera esencial diversos tipos de leucocitos. Estudios recientes han explorado la participación de células endoteliales y de las moléculas de adherencia celular que incluyen las selectinas E, P y L, la molécula 1 de adherencia intracelular (ICAM-1), la molécula 1 de adherencia de células vasculares (VCAM-1) y las integrinas leucocitarias en la adherencia de leucocitos, plaquetas y células del endotelio en los sitios de inflamación **(Kishimoto y Anderson, Lasky y Rosen en Gallin y col. 1992; Bevilacqua y Nelson, 1993; y Cronstein y Weissmann, 1993.)** Las células endoteliales activadas intervienen en forma fundamental para “precondicionar” y orientar a las células circulantes hacia sitios de inflamación. La expresión de diversas moléculas de adherencia varía según los tipos celulares que intervienen en la respuesta inflamatoria. Por ejemplo, la expresión de la selectina E se limita más bien a las células endoteliales y aumenta su cantidad en los sitios de inflamación. La selectina P, en cambio se expresa más en plaquetas y células endoteliales y su acción es intensificada por citocinas. A diferencia de ello, la selectina L es receptora de la selectina P, y la primera se expresa en leucocitos y es secretada cuando se activan dichas células. Al parecer, la adherencia celular se produce por reconocimiento de la glucoproteína y carbohidratos de la superficie celular por medio de los elementos figurados circulantes (35).

La inflamación es muchas veces la expresión del intento del huésped por eliminar y localizar células metabólicamente alteradas, partículas extrañas, microorganismos o antígenos. Este proceso se cumple mediante la regeneración de la histoarquitectura típica y de un retorno a la función normal o la formación de tejido cicatrizal para reemplazar lo que no se puede reparar (19).

Las plaquetas que tienen un rol importante en la hemostasia normal y en la iniciación y regulación de la formación del coágulo, son fuentes de serotonina, hidroxitriptamina e histamina, mediadores que inducen cambios en la permeabilidad vascular. Producen además tromboxano A₂, metabolito del ácido araquidónico que posee propiedades vasoconstrictoras (56).

II-1.3-ESTUDIO DE LA CICATRIZACIÓN

Una herida es una solución de la continuidad normal de los tejidos. El hombre, en su evolución filogenética, perdió su capacidad de regenerar miembros o tejidos. Hoy sólo conserva la posibilidad de reparar las lesiones de sus tejidos con un proceso de cicatrización, es decir con un tejido similar aunque no idéntico. Sin esta capacidad de autorreparación el medio interno saldría al exterior permanentemente, lo cual sería incompatible con la vida. La cicatrización cutánea es un proceso reparativo complejo que conduce a la regeneración del epitelio y el reemplazo de la dermis por un tejido fibroso constituido por colágeno con características diferentes al normal. Las nuevas fibras son más cortas y desorganizadas, por lo que la cicatriz nunca presenta la fuerza tensora de la piel ilesa (35).

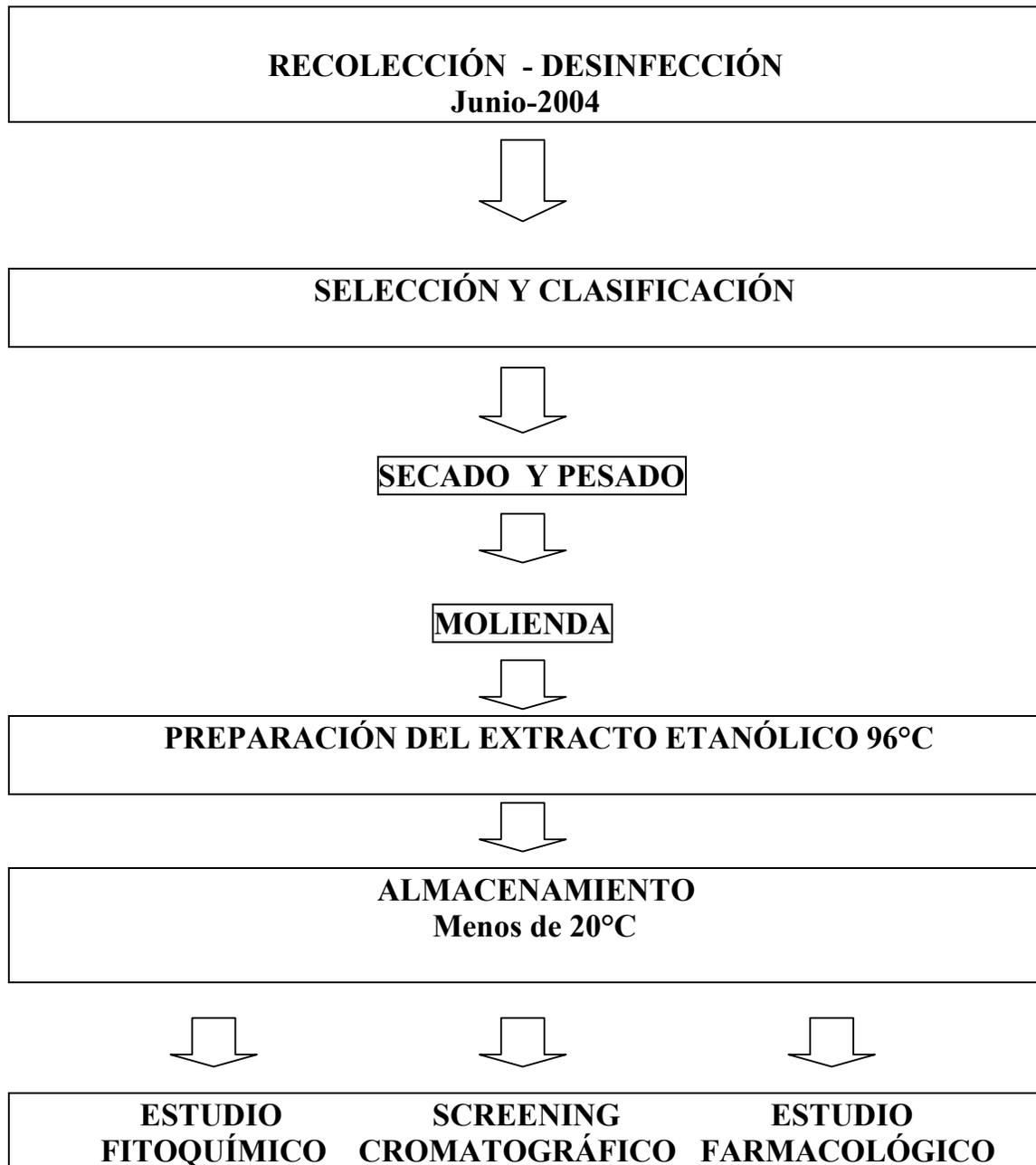
Las secuencias en el proceso de cicatrización son:

1. Limpieza del foco traumático y acumulación de material para la reparación (Fase inflamatoria) tenemos la respuesta vascular y los movimientos celulares.
A) La respuesta vascular es la respuesta inmediata en el área afectada, es una vasoconstricción transitoria (de 5 a 10 min) producida en gran parte, por la liberación de tromboxano (una prostaglandina) por las plaquetas para conseguir la hemostasia seguida de una vasodilatación activa. B) Movimientos celulares, coincidiendo con la vasodilatación y atraídos por mediadores enzimáticos locales, se producen los fenómenos de marginación, adherencia y diapédesis de los granulocitos neutrófilos, que son las primeras células que aparecen en el foco traumático. Los leucocitos, atraídos químicamente (quimiotaxis) comienzan la lisis y la acción fagocitaria de los gérmenes contaminantes. Los movimientos celulares en el foco traumático terminan con la aparición del fibroblasto, que se detecta ya en las primeras 24 horas, alcanzando un número muy elevado a las 72 horas.

2. Formación del colágeno y aumento de la resistencia a la separación de los bordes de la herida (fase de reparación). Comienza al tercer día mientras va cediendo el proceso inflamatorio, siendo claramente manifiesto a partir del quinto día.

3. Epitelización de la herida, la producción del colágeno requiere el aporte de aminoácidos y para la cohesión entre las fibras de colágeno, la sustancia fundamental. En las heridas cerradas, la proliferación a partir de los queratinocitos del epitelio se inicia rápidamente y en 48 horas ha rellenado el mínimo defecto existente entre ambos bordes, cuando todavía no se ha formado colágeno en el seno de la herida (50).

**FLUJOGRAMA DEL ESTUDIO PARA LA OBTENCIÓN DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Senna reticulata* (Willd.)
H.Irwin & Barneby (“Retama”)**



III-PARTE EXPERIMENTAL

1. MATERIALES Y EQUIPOS PARA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO Y ESTUDIO

1-1. MATERIAL BIOLÓGICO

- Hojas de *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby
- Ratonos Swiss albinos de ambos sexos, 2 meses de edad y 25 a 30 g de peso.

1-2. MATERIAL DE VIDRIO Y OTROS

- Beaker - Tubos de ensayo – Viales – Termómetro - jeringas 1 cm, 5cm, 10 cm - Papel Whatmann N°40 - Algodón hidrófilo – Guantes quirúrgicos – Bisturí N° 12-14 – Gasas estériles –Baguetas de vidrio
- Comida para animales – Pinzas – Hisopos estériles – Pentobarbital.

1-3. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Estufa eléctrica – Balanza analítica – Molino de cuchillas - Cocinilla eléctrica – Congelador –Lámpara UV – Cubeta de vidrio - Sacabocados- Espectrofotómetro – U.V. –Dinamómetro.

1-4. REACTIVOS

- Alcohol etílico – Agua destilada – Cloroformo Q.P. – Éter de petróleo Q.P.
- Ácido acético glacial Q.P. – Alcohol butílico Q.P. – Silica gel 60
- Hexano Q.P. – Ácido sulfúrico Q.P. – Ácido nítrico Q.P. – Hidróxido de amonio Q.P. – Tricloruro de fierro – Bórax Q.P. – Cera de abejas pura - Alántoína – Conservadores – Xilol – Tricloruro de aluminio Q.P. -Sodio metálico – Acetato de sodio Q.P.

2-MÉTODO EXPERIMENTAL

2.1-RECOLECCIÓN Y OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO.-

Las hojas frescas de la especie *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby se recolectaron de la ciudad de Tarapoto (San Martín) a 320 m.s.n.m. en Junio de 2004. Las hojas seleccionadas fueron sometidas a una limpieza previa y desinfección, deshidratadas al estado natural bajo sombra; a continuación se estabilizó en una estufa a 40 °C por espacio de 24 horas.

Luego las hojas fueron sometidas a una molienda utilizando un molino de cuchillas y se almacenó en frascos ámbar de boca ancha a 20 °C, para su posterior uso. Se pesaron 100 g de polvo de las hojas molidas en 1 litro de Alcohol etílico de 96 °C y se maceró en frascos ámbar de boca ancha durante 10 días con agitación constante y protegido de la luz y calor, luego se realizó una segunda maceración durante 10 días utilizando el mismo solvente, posteriormente se reunieron los filtrados y se evaporaron en estufa de aire circulante a una temperatura de 40 °C y se obtuvo el extracto etanólico.

2.2-SCREENING FITOQUÍMICO

El screening fitoquímico del extracto etanólico de hojas de *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby para determinación de metabolitos secundarios, según Marcha fitoquímica preliminar (Lock, 1994).

Reacciones de identificación de la Marcha fitoquímica preliminar (Lock, 1994).

2.3-SCREENING CROMATOGRÁFICO

El screening cromatográfico del extracto etanólico de hojas de *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby en cromatografía de capa fina para identificación de metabolitos responsables de la acción terapéutica. (Lock, 1994)

Para la cromatografía en capa fina se realizó el sembrado del extracto etanólico en primer lugar utilizando placas de vidrio pequeñas de 10 x 4 cm para observar las separaciones en diversos solventes, posteriormente se utilizó placas de vidrio de 20 x 20 cm, como soporte y como absorbente Silicagel G-60, y como fase móvil se utilizó el BAW y la mezcla cloroformo metanol (9:1), observándose a la luz visible y luz U.V. a 366 nm. se obtuvo seis fracciones las cuales fueron reveladas con vapores de NH₃ para la determinación de flavonoides, tricloruro de hierro para compuestos fenólicos y reactivo Dragendorff para alcaloides. Posteriormente las seis fracciones fueron aisladas para realizar las lecturas al Espectro UV. (Ver Anexos)

2.4-ESTUDIO FARMACOLÓGICO

2.4.1-ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA EN RATONES

Método: Edema Auricular

Administración tópica

Fundamento: Consiste en la inducción de inflamación por aplicación de xilol, principal responsable de la acción irritante, en el pabellón de la oreja del ratón, la evaluación de la técnica esta dada por la medición de la respuesta inflamatoria que se traduce por el aumento de peso que se produce en el área lesionada. (Cytel, 1995)

DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA:

Se usaron 25 ratones (raza Swiss) de aproximadamente 25 – 30 g de peso. Se distribuyeron en forma aleatoria en número de 5 animales por lote, número de 5 animales por lote (5 lotes x 5 ratones c/u). Los lotes recibieron los extractos como se detalla, menos el lote control.

PROCEDIMIENTO:

Para el ensayo se tuvo en cuenta la edad y peso de los animales de experimentación. Así se pesaron los animales y se formaron 5 lotes de pesos muy semejantes, además se estableció que las orejas derechas recibirían el agente irritante en la cara interna y externa con un hisopo estéril con pequeña cantidad de xilol frotando por cinco veces cada cara menos el grupo control. Las orejas izquierdas recibirían solo el agente irritante xilol menos el grupo control. Después de 20 minutos sólo las orejas derechas recibirían el estándar, las cremas con los extractos de acuerdo al lote, menos el grupo control.

Los lotes fueron formados de la siguiente manera:

LOTE A: CONTROL

LOTE B: SENNA 5 %

LOTE C: SENNA 10 %

LOTE D: SENNA 20 %

LOTE E: SENNA Diclofenaco en gel al 1%

Luego de establecer los grupos, se aplicó a los ratones el agente irritante por cada parte externa e interna del pabellón de la oreja derecha. Aplicada la sustancia flogógena se dejaron transcurrir 20 minutos, luego de los cuales se procedió a aplicar la crema con los extractos a diversas concentraciones y crema estándar Diclofenaco al 1% en las orejas derechas de los ratones de acuerdo al lote de ensayo. Las orejas izquierdas solo recibieron el agente irritante xilol, menos el grupo control.

TÉCNICA DE MEDICIÓN

Tres horas y media después de la aplicación de la sustancia a ensayar se matan a los animales por dislocación cervical y luego se procede a cortar una porción de ambas orejas utilizando un sacabocados de 7 mm de diámetro, estas porciones son envueltas en papel aluminio y pesadas inmediatamente y por separado, tomando nota de los respectivos pesos, con los que se calcula el porcentaje de inflamación e inhibición para cada grupo.

TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS:

Los datos serán sometidos a un análisis estadístico descriptivo e inferencial, utilizando el Análisis de Varianza para evidenciar el grado de dispersión de los datos así como se tendrá en cuenta una significación estadística a una $p < 0.05$

2.4.2-ACTIVIDAD CICATRIZANTE

Método: Lesión inducida en Lomo de ratón (**Vaisberg y col, 1989**).

Administración vía tópica.

DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA:

Se usaron 25 ratones blancos (raza Swiss), de 2 meses de edad y 20 a 25 g de peso distribuidos en forma aleatoria en lotes de 5 ratones según lo siguiente:

LOTE A: CONTROL

LOTE B: SENNA 5 %

LOTE C: SENNA 10 %

LOTE D: SENNA 20 %

**LOTE E: SENNA Fármaco Estándar (Neomicina + Bacitracina)
0.350 + 50.000 U Cicatrín**

PROCEDIMIENTO:

- 1) Depilación de cintura escapular del ratón 24 horas antes.
- 2) Anestesia Pentobarbital 30 mg /Kg peso corporal del ratón.
- 3) Incisión y corte con bisturí, 1 cm de longitud, hasta la dermis, paralelo al eje del cuerpo del animal, los bordes de la herida deben limpiarse con una gasa estéril.
- 4) El tratamiento se inició enseguida y cada 12 horas por 3 días, excepto el Control.
- 5) La administración vía tópica: cobertura total de la herida.
- 6) Eliminación de ratones a las 72 horas, con altas dosis de Pentobarbital.
- 7) Se mide el grado de fuerza de tensión con un dinamómetro, para determinar la fuerza de tensión que permita abrir la herida.
- 8) Parámetro Físico de Cicatrización, resistencia a la tensión medida por la carga necesaria (por área de sección transversal) para provocar la rotura de la herida (g. de peso en el dinamómetro).

TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS

Los datos serán sometidos a un análisis estadístico descriptivo e inferencial, utilizando el Análisis de Varianza para evidenciar el grado de dispersión de los datos, así como se tendrá en cuenta una significancia estadística a una $p < 0,05$.

IV - RESULTADOS

CUADRO N° 1

MARCHA DE SOLUBILIDAD EN EL EXTRACTO ETANÓLICO

MARCHA DE SOLUBILIDAD	
Solvente	Extracto etanólico de hojas de <i>Senna reticulata</i> (Willd.) H. Irwin & Barneby
n-hexano	-
Cloroformo	++
Acetato de etilo	+
Butanol	+
Etanol	+++
Metanol	+++
Agua	+

La marcha de solubilidad se realizó con el extracto etanólico de la especie de *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby usando solventes de diferente polaridad, determinando como mejores solventes el etanol, cloroformo y metanol.

Insoluble (-)
Poco soluble (+)
Soluble (++)
Muy soluble (+++)

CUADRO N° 2

SCREENING FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

SCREENING FITOQUÍMICO		
Reactivo	Metabolitos Secundarios	Extracto Etanólico
Cl ₃ Fe	Taninos	++
Ninhidrina	Aminoácidos	-
Shinoda	Flavonoides	+++
Borntrager	Quinonas	+
2,4 Dinitrofenilhidrazina	Carbonilos	+
1-Naftol + H ₂ SO ₄ conc.	Glicósidos	+
Indice de Espuma	Saponinas	+
Dragendorff	Alcaloides	+
Mayer	Alcaloides	++

El screening fitoquímico realizado con el extracto etanólico de hojas de *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby, determinó la presencia importante de flavonoides, alcaloides y menor presencia de quinonas, compuestos fenólicos y glicosidos.

Negativo (-)
 Reacción positiva moderada (+)
 Reacción positiva intensa (++)
 Reacción positiva muy intensa (+++)

CUADRO N° 3

SCREENING CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

SCREENING CROMATOGRÁFICO				
Rf		UV 366 nm	Vapores NH ₃ + UV	FeCl ₃ Reactivo Dragendorff
F1	1.03	verde, amarillo	amarillo, rojizo tenue	- -
F4	1.14	amarillo tenue	amarillo, verdosa	- -
F5	2.0	amarillo	Amarillo intenso	- -
F6	2.3	marrón		marrón, rojizo

El screening cromatográfico se realizó mediante cromatografía en capa fina analítica del extracto etanólico de la especie *Senna reticulata* (Willd.) H.Irwin & Barneby utilizando como solvente BAW, cloroformo – metanol (9:1).

CUADRO N° 4

INFLAMACIÓN DE OREJA DE RATÓN

PROCEDIMIENTO DE INFLAMACIÓN EN OREJA DE RATÓN			
Grupos	Inicio oreja Derecha	Después de 20 min. oreja derecha	Inicio oreja Izquierda
Control	-	-	-
Senna 5%	Xilol	Crema 5%	Xilol
Senna 10%	Xilol	Crema 10%	Xilol
Senna 20%	Xilol	Crema 20%	Xilol
Diclofenaco 1%	Xilol	Diclofenaco	Xilol

Se inicia el tratamiento inflamando la oreja derecha del ratón con xilol, usando un hisopo estéril y frotando por 5 veces cada cara, después de 20 minutos se agrega la crema con los extractos y el estándar de acuerdo al lote menos el grupo control. Las orejas izquierdas sólo reciben Xilol, menos el grupo control.

CUADRO N° 5

VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA EN RATONES

Tratamiento	Código	Peso (mg)
1 Control	0	3
2 Control	0	5
3 Control	0	3
4 Control	0	4
5 Control	0	6
6 Diclofenaco gel 1%	1	1
7 Diclofenaco gel 1%	1	4
8 Diclofenaco gel 1%	1	4
9 Diclofenaco gel 1%	1	6
10 Diclofenaco gel 1%	1	4
11 Crema Senna 5%	2	2
12 Crema Senna 5%	2	6
13 Crema Senna 5%	2	1
14 Crema Senna 5%	2	4
15 Crema Senna 5%	2	3
16 Crema Senna 10%	3	4
17 Crema Senna 10%	3	5
18 Crema Senna 10%	3	4
19 Crema Senna 10%	3	3
20 Crema Senna 10%	3	6
21 Crema Senna 20%	4	3
22 Crema Senna 20%	4	4
23 Crema Senna 20%	4	7
24 Crema Senna 20%	4	4
25 Crema Senna 20%	4	5

Se determinó que al administrar los extractos después de inducir la inflamación, se demuestra relativa actividad para el extracto etanólico de hojas de *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby, frente al grupo control pero ninguno es significativo.

CUADRO N° 6

ANÁLISIS DE MÚLTIPLES COMPARACIONES PARA LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

(I) Tto. (J) Tto.	Diferencia Media	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
				Límite Bajo	Límite Alto
Control St. 1%	0,40	0,99	0,690	-1,66	2,46
Senna 5%	1,00	0,99	0,324	-1,06	3,06
Senna 10%	-0,20	0,99	0,842	-2,26	1,86
Senna 20%	-0,40	0,99	0,690	-2,46	1,66
St 1% Control	-0,40	0,99	0,690	-2,46	1,66
Senna 5%	0,60	0,99	0,550	-1,46	2,66
Senna 10%	-0,60	0,99	0,550	-2,66	1,46
Senna 20%	-0,80	0,99	0,428	-2,86	1,26
Senna 5% Control	-1,00	0,99	0,324	-3,06	1,06
Senna 10%	-1,20	0,99	0,239	-3,26	0,86
Senna 20%	-1,40	0,99	0,172	-3,46	0,66
Senna10% Control	0,20	0,99	0,842	-1,86	2,26
St. 1%	0,60	0,99	0,550	-1,46	2,66
Senna 5%	1,20	0,99	0,239	-0,86	3,20
Senna 20%	-0,20	0,99	0,842	-2,26	1,86
Senna20% Control	0,40	0,99	0,690	-1,66	2,46
St. 1%	0,80	0,99	0,428	-1,26	2,86
Senna 5%	1,40	0,99	0,172	-0,66	3,46
Senna 10%	0,20	0,99	0,842	-1,86	2,26

Análisis de múltiples comparaciones de los datos obtenidos por el ensayo de actividad antiinflamatoria en ratones. Observándose de acuerdo a las comparaciones realizadas, que no existe ninguna diferencia significativa.

Múltiple Comparisons

Dependiente Variable: miligramo.

LSD

TABLA ANOVA N° 1

ANÁLISIS DE VARIANZA DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	gl	MEDIA CUADRÁTICA	F	Sig.
Tratamiento Antiinflamatorio					
Entre Grupos (Por TTO)	6,16	4	1,54	0,631	0,646001
Dentro Grupos (Por Dosis)	48,8	20	2,44		
TOTAL	54,96	24			

Análisis de Varianza del efecto antiinflamatorio en ratones al aplicar la crema con el extracto etanólico de hojas de *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby vía tópica. No hay diferencias significativas entre las medias ($p=0.646 > 0.05$).

CUADRO N° 7

ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA EN RATONES

Peso en mg	N	Media	Desviación Típica	Error Típico	95 Confianza		Mínimo	Máximo
					Límite Inferior	Límite Superior		
Control	5	4,20	1,304	0,583	2,58	5,82	3	6
St. 1%	5	3,80	1,789	0,800	1,58	6,02	1	6
C.S. 5%	5	3,20	1,924	0,860	0,81	5,59	1	6
C.S10%	5	4,40	1,140	0,510	2,98	5,82	3	6
C.S20%	5	4,60	1,517	0,578	2,72	6,48	3	7
Total	25	4,04	1,513	0,303	3,42	4,66	1	7

Análisis descriptivo de datos obtenidos en el ensayo de la actividad antiinflamatoria en ratones de la crema con el extracto etanólico de hojas de *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby vía tópica.

CUADRO N° 8

**PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS
PARA LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA**

Estadístico de Levene	gl 1	gl2	Sig.
250	4	20	0,906

Las varianzas son homogéneas.

CUADRO N° 9

VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE EN RATONES

Tratamiento	Código	Peso (g)
1 Control	0	50
2 Control	0	30
3 Control	0	47
4 Control	0	45
5 Control	0	40
6 Neomicina-Bacitracina 0.35%	1	48
7 Neomicina-Bacitracina 0.35%	1	75
8 Neomicina-Bacitracina 0.35%	1	65
9 Neomicina-Bacitracina 0.35%	1	95
10 Neomicina-Bacitracina 0.35%	1	80
11 Crema Senna 5%	2	85
12 Crema Senna 5%	2	95
13 Crema Senna 5%	2	100
14 Crema Senna 5%	2	93
15 Crema Senna 5%	2	106
16 Crema Senna 10%	3	135
17 Crema Senna 10%	3	134
18 Crema Senna 10%	3	95
19 Crema Senna 10%	3	116
20 Crema Senna 10%	3	105
21 Crema Senna 20%	4	124
22 Crema Senna 20%	4	130
23 Crema Senna 20%	4	105
24 Crema Senna 20%	4	120
25 Crema Senna 20%	4	145

Se determinó que la crema con los extractos etanólicos de hojas de *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby tiene efecto cicatrizante a mayor concentración, después de inducir la herida en lomo de ratón siendo estadísticamente significativo.

CUADRO N° 10

ANÁLISIS DE MÚLTIPLES COMPARACIONES PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE

Variable dependiente: Peso (g)

(I) COD 1	(J) COD1	Diferencia de Medias (I-J)	Error Típico	Sig.	95% Confidence	
					Límite Bajo	Límite Alto
HSD de Tukey						
Control	Estándar 0,35%	-30,20	8,729	0,19	-48,41	-11,99
Control	Senna 5%	-53,40	8,729	0,00	-71,61	-35,19
Control	Senna 10%	-74,60	8,729	0,00	-92,81	-56,39
Control	Senna 20%	-82,40	8,729	0,00	-100,61	-64,19
Estándar N-B 0.35%	Control	30,20	8,729	0,097	11,99	48,41
Estándar N-B 0.35%	Senna 5%	-23,20	8,729	0,000	-41,41	-4,99
Estándar N-B 0.35%	Senna 10%	-44,40	8,729	0,000	-62,61	-26,19
Estándar N-B 0.35%	Senna 20%	-52,20	8,729	0,000	-70,41	-33,99
Senna 5%	Control	53,40	8,729	0,000	35,19	71,61
Senna 5%	Estándar 0,35%	23,20	8,729	0,015	4,99	41,41
Senna 5%	Senna 10%	-21,20	8,729	0,148	-39,41	-2,99
Senna 5%	Senna 20%	29,00	8,729	0,025	-47,21	-10,79
Senna 10%	Control	74,60	8,729	0,000	56,39	92,81
Senna 10%	Estándar 0,35%	44,40	8,729	0,000	26,19	62,61
Senna 10%	Senna 5%	21,20	8,729	0,025	2,99	39,41
Senna 20%	Estándar 0.35%	52,20	8,729	0,000	33,90	70,41
Senna 20%	Senna 5%	29,00	8,729	0,003	10,79	47,21

Según la prueba de Tukey, todas las diferencias, excepto Neomicina vs Senna 5%, Senna 5% vs 10% y 10% vs 20%, son significativas ($p < 0,05$)

Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos. Todas las comparaciones vs Control son significativas.

TABLA ANOVA N° 2

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA FUERZA NECESARIA PARA ABRIR LAS LESIONES EN LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE EN RATONES

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	df	Media de cuadrados	f	Significancia
TRATAMIENTO CICATRIZACIÓN					
Entre Grupos (Por TTO)	22704,24	4	5676,06	2980	0,000
Dentro de Grupos (Por Concentración)	3810	20	190,50		
TOTAL	26514,24	24			

Análisis de Varianza de la fuerza necesaria para abrir las lesiones, de la actividad cicatrizante en ratones, después de 72 horas de la aplicación diaria (mañana y noche de la crema con el extracto etanólico de *Senna reticulata* (Willd.) H.Irwin & Barneby vía tópica.

CUADRO N° 11

ANÁLISIS DESCRIPTIVO DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE

Peso (g)

	N	Media	Desviación Típica	Error Típico	Intervalo Confianza Media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite Inferior	Límite Superior		
Control	5	42,40	7,829	3,501	32,68	82,12	30	50
Estándar 0,35 %	5	72,60	17,501	7,827	50,67	94,33	48	95
C. Senna 5%	5	95,80	7,855	3,513	86,05	105,55	85	106
C. Senna 10%	5	117,00	17,621	7,880	95, 12	13,88	95	135
C. Senna 20%	5	12,80	14,584	6,522	106,69	142,91	108	145
Total	25	90,52	33,238	6,648	76,80	104,24	30	145

Análisis descriptivo de datos obtenidos en el ensayo de la actividad cicatrizante en ratones de la crema con el extracto etanólico de hojas de *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby vía tópica.

CUADRO N° 12

LECTURA AL ESPECTROFOTÓMETRO DE LA FRACCIÓN N° 1 Y DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO

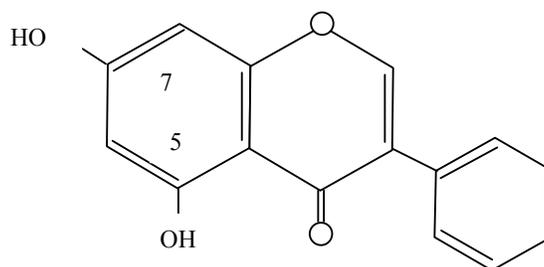
Fracción N° 1	Absorvancia	Desplazamiento
MeOH	215 - 254	33
MeONa	242 - 248	
MeONa – 5 minutos	242 - 248	
AlCl ₃	218	
AlCl ₃ / HCl	218	
AcONa – 2 minutos	250	
AcONa – 5 minutos	218 - 275	57
AcONa / H ₃ BO ₃	215 - 275	

De acuerdo a (41) y a la cromatografía realizada de la Fracción N°1, en la que al revelarse con la luz UV y luego con NH₃ nos da una fluorescencia amarilla, lo que probablemente tenga una estructura de Dihidroxiisoflavona que pueda tener un grupo OH- en posición 5 y 7 por lo que se propone la siguiente estructura química.

MeOH = Alcohol metílico
MeOHNa = Alcohol metílico sódico.
AcONa = Acetato de sodio.

FIGURA N° 3

ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA 5, 7 – DIHIDROXIISOFLAVONA



CUADRO N° 13

LECTURA AL ESPECTROFOTÓMETRO DE LA FRACCIÓN N° 4 Y DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO

Fracción N° 4	Absorvancia	Desplazamiento
MeOH	206 - 245	30
MeONa	206 - 275	
MeONa – 5 minutos	206 - 245	57
AlCl ₃	218 - 260	
AlCl ₃ / HCl	206 - 275	
AcONa – 2 minutos	215 - 260	
AcONa – 5 minutos	218 - 260	
AcONa / H ₃ BO ₃	218 - 275	

De acuerdo a (41) y a la cromatografía realizada de la Fracción N° 4 en la que al revelarse con la luz UV y luego con NH₃ nos da una fluorescencia amarillo verdosa lo que probablemente tenga una estructura de Dihidroxiisoflavona que puede tener un grupo OH- en posición 6 y 7 por lo que se propone la siguiente estructura:

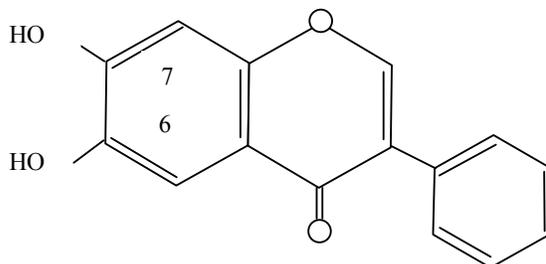
MeOH = Alcohol metílico.

MeOHNa = Alcohol metílico sódico.

AcONa = Acetato sódico.

FIGURA N° 4

ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA 6, 7-DIHIIDROXIISOFLAVONA



CUADRO N° 14

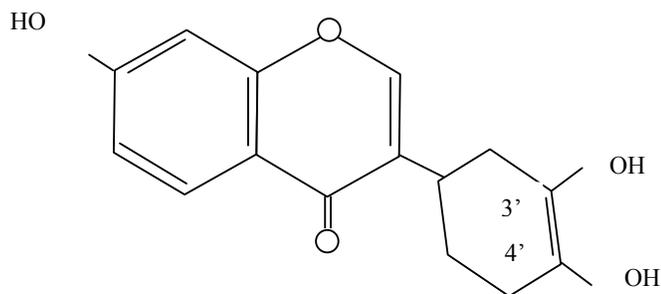
LECTURA AL ESPECTROFOTÓMETRO DE LA FRACCIÓN N° 5
Y DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO

Fracción N° 5	Absorvancia	Desplazamiento
MeOH	212 - 245	
MeONa	206 - 260	15
MeONa – 5 minutos	209 - 275	30
AlCl ₃	218 - 260	
AlCl ₃ / HC l	212 - 275	
AcONa – 2 minutos	212 - 260	
AcONa – 5 minutos	218 - 275	6
AcONa / H ₃ BO ₃	218 - 260	

De acuerdo a (41) y a la cromatografía realizada de la Fracción N° 5 en la que al revelarse con luz UV y luego con NH₃ nos da una fluorescencia amarilla intensa, lo que posiblemente tenga una estructura de Trihidroxiisoflavona que pueda tener un grupo OH- en la posición 3', 4' y 7 por lo que se propone la siguiente estructura química:

FIGURA N° 5

ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA 3', 4', 7, - TRIHIDROXIISOFLAVONA



V.- DISCUSIÓN

El extracto etanólico de hojas de *Senna reticulata* (Willd.) H.Irwin & Barneby (“Retama”) de acuerdo a los ensayos efectuados y las hipótesis propuestas, han demostrado que para el efecto antiinflamatorio el cual se realizó por el Método del Edema Auricular vía tópica en ratones (21) y (Cuadro N°4) no presenta actividad antiinflamatoria significativa como lo confirman los datos obtenidos (Cuadros N°5, 6 y 7) y (Tabla Anova N° 1, Figura N°1). En el caso del efecto cicatrizante presenta una gran efectividad, a mayor concentración mayor actividad terapéutica validando estos efectos farmacológicos atribuidos a las hojas.

En otras investigaciones (6) el efecto cicatrizante es mayor a menores concentraciones, en el presente trabajo se ha demostrado lo contrario, el extracto etanólico presenta mayor efecto cicatrizante a mayores concentraciones. La actividad cicatrizante podría deberse a la presencia de dihidroxiisoflavonas, trihidroxiisoflavona y taninos presentes que reaccionarían con las células de la piel injuriada interviniendo en el proceso de cicatrización (34).

La actividad cicatrizante del extracto se comparó con un producto farmacéutico estándar Neomicina-Bacitracina al 0,35% (Cicatrín), obteniéndose una mejor respuesta en las cremas preparadas a mayor concentración (Ver.Graf.N°2). El Método realizado fue Lesión inducida en Lomo de ratón (21).

En el cuadro N° 1 sobre la solubilidad, se observa que el extracto etanólico de *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby son solubles en metanol, etanol y cloroformo lo que concuerda con el trabajo realizado con formulaciones semisólidas del extracto etanólico de cera de caña. (59)

En el cuadro N° 2 sobre el screening fitoquímico realizado con el extracto etanólico se determinó la presencia importante de flavonoides, taninos, compuestos fenólicos y alcaloides lo que concuerda con investigaciones realizadas en extractos de plantas para la determinación de la actividad cicatrizante (31, 45).

Al realizar el screening cromatográfico en capa fina se observa en el cuadro N° 3, fracciones obtenidas las cuales a UV 366 nm se observa manchas de color amarillo ligeramente naranja, las cuales reveladas con vapores de NH₃ + UV se observa un cambio de verde a rosado lo que indica la presencia de flavonas e isoflavonas confirmado por el trabajo de investigación realizado en extractos (6, 31, 34).

La evidente actividad cicatrizante observada por el Método de Lesión inducida en lomo de ratón (Vaisberg y col.) (21), al administrarse por vía tópica el extracto en estudio puede atribuirse al efecto sinérgico de las estructuras químicas propuestas y a los taninos, los cuales al tener poder astringente reaccionarían con las proteínas de la piel activando el proceso de cicatrización, lo que coincide con otros trabajos de investigación desarrollados (6, 31 y 34).

En los datos obtenidos según se muestra (Cuadro N°8, 9, 10 y 11), (Tabla Anova N°2) y (Gráfico N°2) indican la evidente acción cicatrizante que presenta la crema con el extracto alcohólico de *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby comprobándose que la mayor actividad se observa en la crema que contiene el

extracto etanólico al 20%, que con el extracto al 10% y 5 % donde va disminuyendo su efectividad cicatrizante respectivamente.

Al determinar las especies químicas responsables de la actividad cicatrizante como son la 5, 7 – Dihidroxiisoflavona, 6, 7 – Dihidroxiisoflavona y la 3', 4', 7, Trihidroxiisoflavona se propone que estas especies obtenidas por desplazamiento batocrómico coinciden con este tipo de flavona. (41).

VI.- CONCLUSIONES

- 1- El extracto etanólico de hojas de *Senna reticulata (Willd.) H. Irwin & Barneby* (Retama) no presenta actividad antiinflamatoria significativa por vía tópica .
- 2- El extracto etanólico de hojas de *Senna reticulata (Willd.) H. Irwin & Barneby* (Retama) presenta actividad cicatrizante a la concentración de 20%.
- 3- Se ha determinado que presenta metabolitos secundarios como son alcaloides, taninos y Flavonas, proponiendo las siguientes estructuras químicas, 5, 7 -Dihidroxiisoflavona, 6, 7 –Dihidroxiisoflavona y 3', 4', 7 – Trihidroxiisoflavona

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alvarez, F. H.; Zarate; O.R.; Gorriti; G.A. Manual de Farmacognosia y Productos Naturales Terapéuticos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú. pp. 20 – 25. 1992.
2. Abul, K.; Andrew, H.; Jordan, S. Inmunología Celular y Molecular. Editorial Interamericana McCraw-Hill. Barcelona España. 2001.
3. Alonso, J; R. Tratado de Fitomedicina. Bases Clínicas y Farmacológica. Isis Ediciones. Buenos Aires Argentina. 1998.
4. Acherson, R; M. An introduction to the Chemistry of heretocyclic Compounds 3ra Edi. J.Wileyand Sons. N.Y. 1985.
5. Arévalo, V. Medicina indígena, las plantas medicinales y su beneficio en la salud. Lima (Perú). Asociación interétnica de Desarrollo de la Selva Peruana (AIDSESEP). pp. 354. 1994.
6. Arroyo, J. et. al Efecto cicatrizante del Piper angustifolium R&P sobre lesiones de piel inducidas en animales de experimentación. Fol. Derm.Per. 10 (1): 45-50. 1999.
7. Alcaraz, M.J; Hoult, J.R.S. Actions of flavonoids and the novel antiinflammatory flavone, hypolaetin-8-glucoside, on prostaglandin biosynthesis and inactivation. Biochem. Pharmacol.34.2477-2482 (1985)
8. Ayensu, E.S. Medicinal Plants of the West Indies. Algonac, Reference Publications.1981, pp 51-60.

9. Balee, W. Footprints of the forest: Kaapor ethnobotany. The historical ecology of plant utilization by an Amazonian people. New York; Columbia University. 1994.
10. Bandhari, B et al Flavor encapsulation by spray drying: Application of citral and linalyl acetate. Vol 57, N°2. 1992.
11. Barriga, E.G. Flora Medicinal Colombiana. Imprenta Nacional. 1975.
12. Bilbao M. Del R. Análisis Fitoquímico preliminar. Universidad del Quindío. Armenia. 1997.
13. Brucher, H. Useful plants of Neotropical origin and their wild relatives. Springer-Verlag Berlín Heidelberg. Germany (290p) pp. 158-170. 1989.
14. Bruneton, J. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Editorial Lavoisier, Hampshire. 1995.
15. Cáceres, A. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria UNSAC, Guatemala. pp. 48-57. 1996.
16. Cáceres, A. et al (1995) Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for sexually transmitted diseases. J.Ethnopharmacol, 1995 Oct; 48(2):81-89.
17. Callapiña, M.; Crispín, V.; Pérez, A. Actividad Mutagénica de los extractos de *Sparteum Junceum L.* (Retama). Investigación realizada en el Instituto de Recursos Naturales y Terapéuticos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 1995.
18. Cabieses, F. Apuntes de Medicina Tradicional 1ra Edición A y B SA. Lima- Perú. pp. 60-71. 1993.
19. Contreras, F. O. Fisiopatología 1ra Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana Venezuela pp. 13-24. 1997.
20. Cotillo, P.& Rojas, L.A. Métodos Farmacológicos en la Investigación de Productos vegetales. Graf. Jiménez E.I.R. L. 1ra Edición. 1990.
21. CYTED Manual de Técnicas de Investigación Marzo 1995 pp. 45-80
22. Dewek, P.M. Medicinal Natural Products, a biosynthetic approach. Wiley & Son, Chichester. 1997.
23. De Wit H.C.D. Plantas Superiores I tomo. Editorial Seix Barral S.A. Barcelona 1965.

24. Díaz, P.S. El Achiote peruano dentro del contexto mundial. Rev. Expoagro. Adex, Año 2 N°11 Lima, Perú. pp. 10-16. 1995.
25. Domínguez, X.A. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa, México. pp. 32. 1974.
26. Evans, W.C. Farmacognosia Trease-Evans, 13ava Edición. Editorial Interamericana, Mc Graw Hill, Madrid España. 1991.
27. Falcón M. Plantas Medicinales y sus Aplicaciones. Imprenta Vidal e hijos 4ta Edición. pp. 163. 1983.
28. Font Quer P. Plantas Medicinales. El dioscórides Renovado. Editorial Labos S.A. Barcelona-España. pp. 50-65. 1985.
29. Farreras, Rozmán. Medicina Interna. 14ava edición. Volumen 1 Cap. 179, 181, 182 pp 1521-1543
30. García, Barriga, H Flora medicinal de Colombia. Botánica Médica. TomoII. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia. Talleres Editoriales de la Imprenta Nacional. Bogotá, pp. 199 – 210. 1975.
31. Félix M. Estudio fitoquímico y determinación de las flavononas y alcaloides de naturaleza indólica en hojas de *Perezia multiflora* (H.Et B.) Less “Escorsonera”.Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 1999.
32. George, M & Pandalai, K.M. Hacia una Farmacopea Caribeña. (Tramil 7) Edición. Enda-Caribe. Santo Domingo. pp. 79-89. 1949.
33. Guerrero, M, 1700 Experiencias de uso medicinal del cocimiento de hojas de Achiotec. Lima-Perú. 1995.
34. Guillermo, F.; Bonilla, P.; Arroyo, J. (1995). Efecto cicatrizante del tallo subterráneo de *Peperonia scutellaefolia* R. Et P. en geles aplicados a *Ratus norvergicus*. Trabajo de investigación . Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima; 1995.
35. Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Editorial Mc Graw Hill Interamericana, 9na Edición pp. 1371-1387. 1996.
36. Hardman J, G.; Limbird, L, E.; Gilman, A, G.; Goodman & Gilmans. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9na Edición. New York (1988) .

37. Lawrence, MH. Taxonomy of Vascular Plants, the McMillan Company, United States of América. *Phytochemistry* 12(12): 2750. 1995.
38. Lemos, TLG. ; Matos, FLA. ; Alencar, JW. ; Craverio, AA.; Clark, AM. Antimicrobial activity of essential oil Brazil plants, *Phytother. Res*, 1995; 4(2): 82-841990.
39. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. 2da Edición. Fondo Editorial PUCP. Lima. Perú pp. 7-10. 1994.
40. Mac Bride, JF. Flora del Perú. Editorial Publ. Field. Museum Natural History Bot. Tomo II pp 58-70. 1937.
41. Mabry, T.; Markham, K. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer- Verlag. New York 1970
42. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Galénicos y Recursos Terapéuticos Naturales. Ministerio de Salud. DIGEMID. Lima 2000.
43. Montané, J y Col. Iron metabolism and oxidative stresses during acute and chronic phases of experimental inflammation. Effect of iron-dextran and deferoxamine. *J. Laboratory Clinic Medical*. 1995; 126: 435-43.
44. Morton, J. F. Atlas of Medicinal Plants of Middle América, Bahamas to Bahamas to Yucatán. Charles Thomas Publisher. Springfield-Illinois USA (1425). pp. 569-586. 1981.
45. Orna, R.; Llacsahuanga, E. Estudio del efecto cicatrizante de un gel formulado a base de *Rumex cuneifolius Campdera* "Cutu Rumansa" . (Tesis) Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima; 2000.
46. Palacios, J.A. Plantas medicinales nativas del Perú, Lima. Concytec, 1993 pp. 22-25.
47. Pasto, D.J.; Jhonson, C.R. Determinación de Estructuras Orgánicas. 2da Edición. Editorial Reverté. Madrid, España, pp. 180-195. 1974.
48. Pareja, B.; Juárez, J.; García, M; Gorriti, A.; Benavides, E.; Plasencia, M. Plantago mayor L. Zumo de hojas efecto antiinflamatorio y cicatrizante. *Folia Dermatológica Peruana*. Volumen 11 N°1 Abril 2000.
49. Rengifo, E.& Cerruti, T. Plantas Medicinales de la Amazonía Peruana. Estudio de su uso y cultivo. Ediciones IIAP- Iquitos, Perú pp. 40-46. 1997.

50. Robberr, J. E.; Speedie, M.K.; Tyler, V. E.; Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology, Wilkins, W. Ediciones. New-York (1650 p). pp 850-865. 1996.
51. Robbins, C. Patología Estructural y Funcional. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana Madrid pp. 72-119. 2000.
52. Rutter, R. Catálogo de plantas útiles de la Amazonía Peruana. Yannacocha Pucallpa (Perú) Ministerio de Educación. Instituto Lingüístico de Verano. pp. 349. 1990.
53. Ruíz, M.; Oronoz. Tratado Elemental de Botánica. Editorial Porrúa S.A. 8ava Edición. México 1964.
54. Salgado, V. Manual de Medicina popular a fitoterapia da Amazonía. Belem (Brasil): Facultad de Ciencias Agrarias do Pará. 248 pp. 1991.
55. Silva, D.H. et al. Plantas medicinales de la Amazonía Peruana Lima: IPSSIMET pp. 256. 1995.
56. Stites, D.; P. Inmunología Humana y Básica .1ra Edición. El Manual Moderno S.A. pp. 205-255. 1994.
57. Strasburger, E. Tratado de Botánica. 7ma Edición. Barcelona; Editorial Marín. 1996.
58. Soukup, J. Vocabulario de los Nombres Vulgares de la Flora Peruana y Catálogo de los géneros. Editorial Salesiana. 1ra Edición. Lima –Perú 1991.
59. Tillán, J.; Castro, I.; Bueno. V.; Carrillo, C.; Ortiz, M. Efecto cicatrizante de la crema de extracto etanólico de cera de caña. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. La Habana 2004.
60. Valles, P. Plantas comunes de la Amazonía Peruana; morfología y taxonomía. Tarapoto (Perú) pp. 127. 1987.
61. Vásquez, M. Plantas útiles de la Amazonía Peruana, I. Texto mimeografiado. Iquitos (Perú) pp. 195. 1989.

VIII-A N E X O S

FIGURA N° 1

MEDIOS ± ERROR ESTANDAR

Valores Medios- Actividad antiinflamatoria

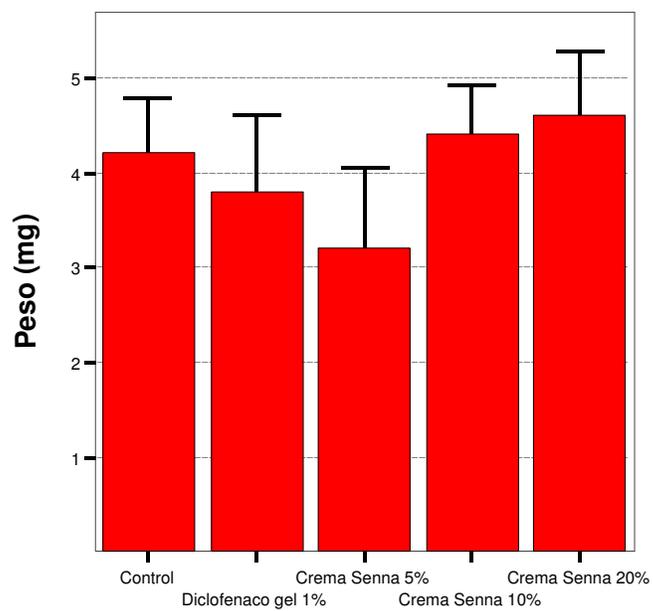
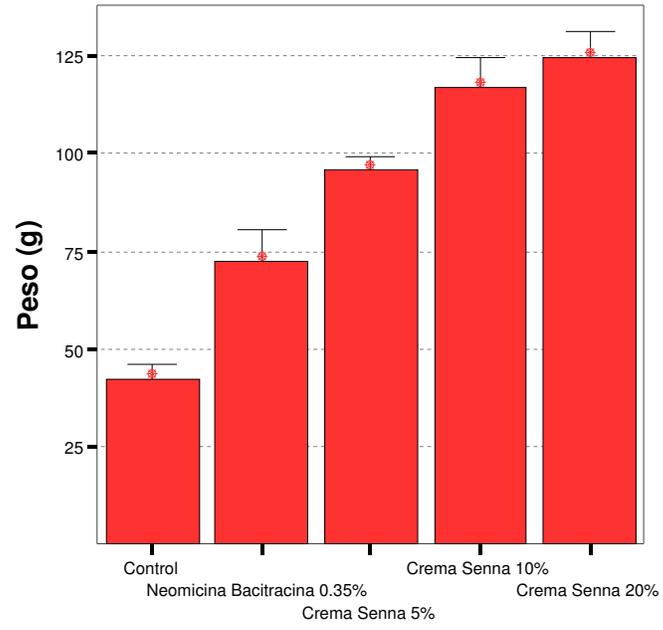


FIGURA N° 2

Valores medios. Actividad cicatrizante



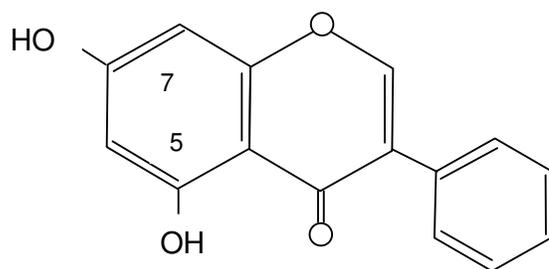


FIGURA N° 3

ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA 5, 7 – DIHIDROXIISOFLAVONA

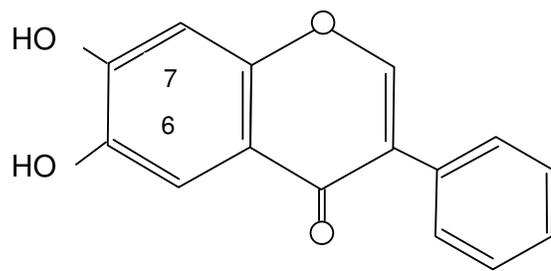


FIGURA N° 4

ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA 6, 7 -DIHIDROXIISOFLAVONA

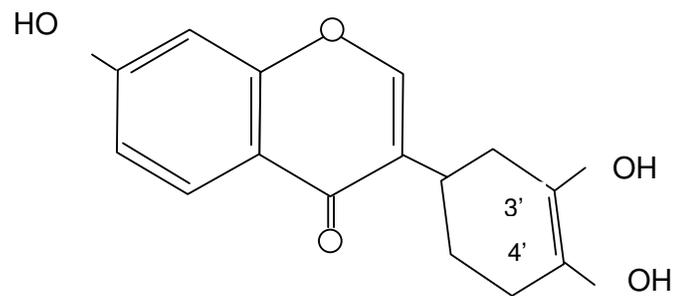


FIGURA N° 5

ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA 3', 4', 7, - TRIHIDROXIISOFLAVONA

FIGURA N° 6

LECTURA AL ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO (Fracción N° 1)

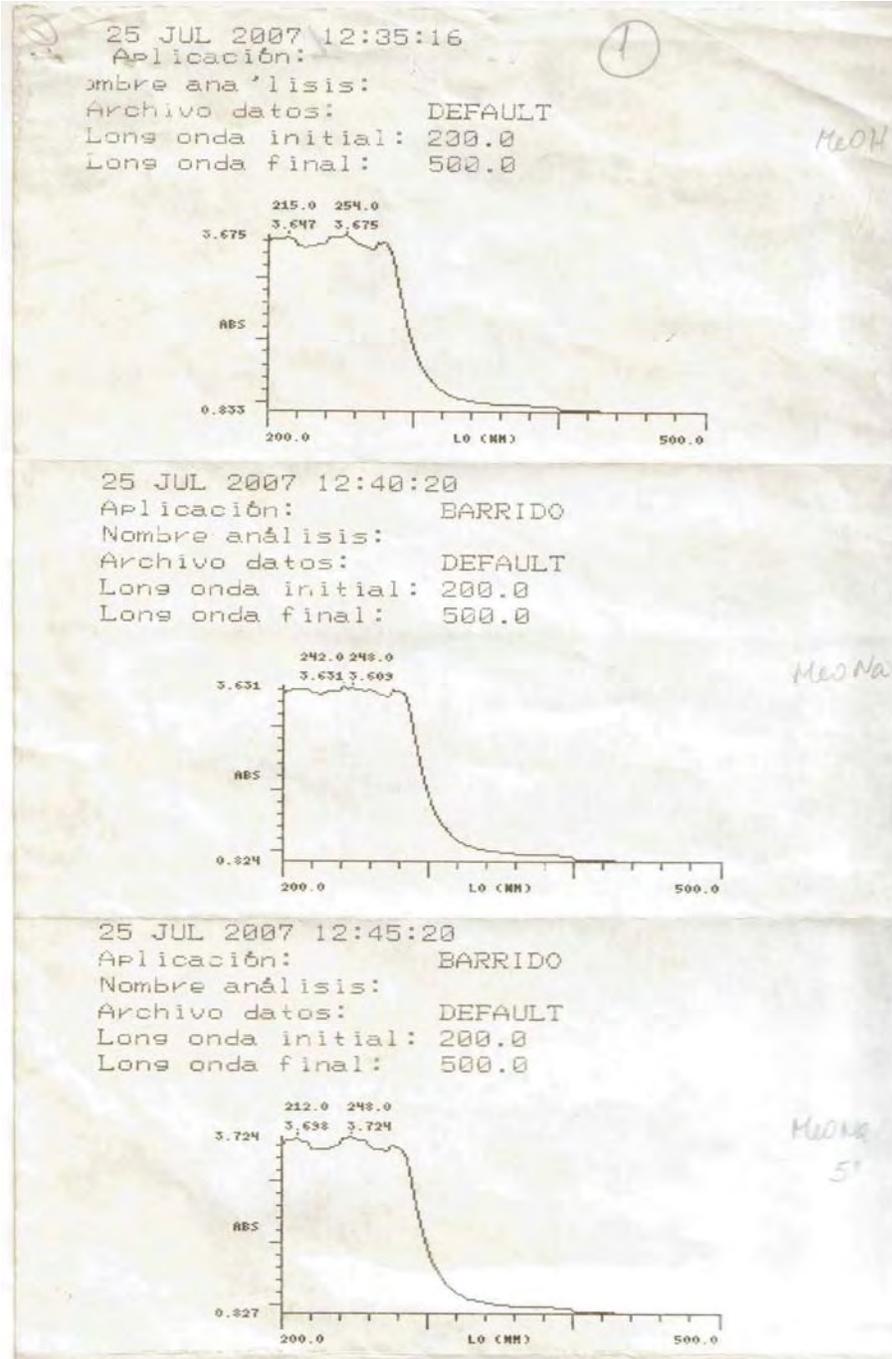


FIGURA N° 7

LECTURA AL ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO (Fracción N° 1)

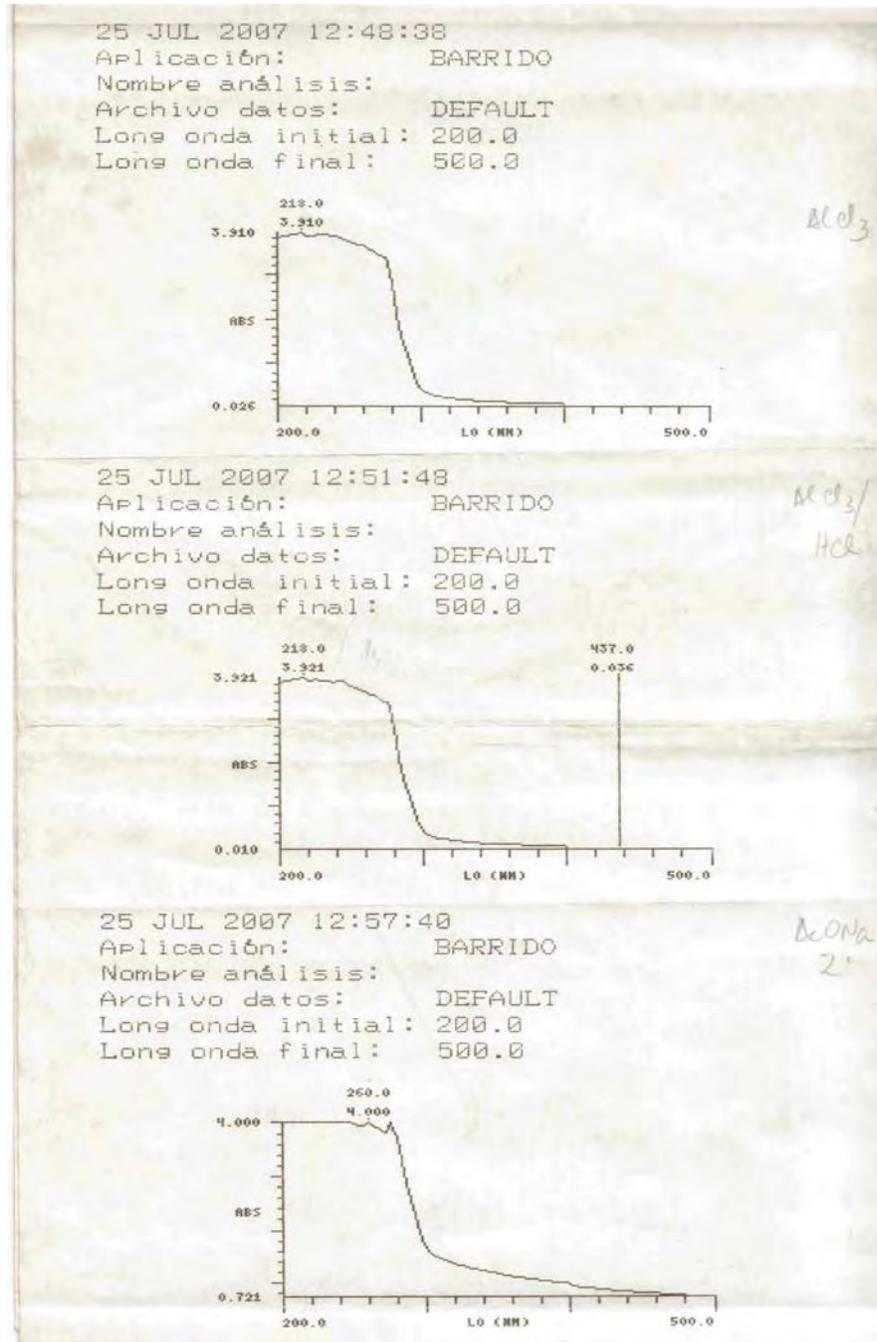


FIGURA N° 8

LECTURA AL ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO (Fracción N° 1)

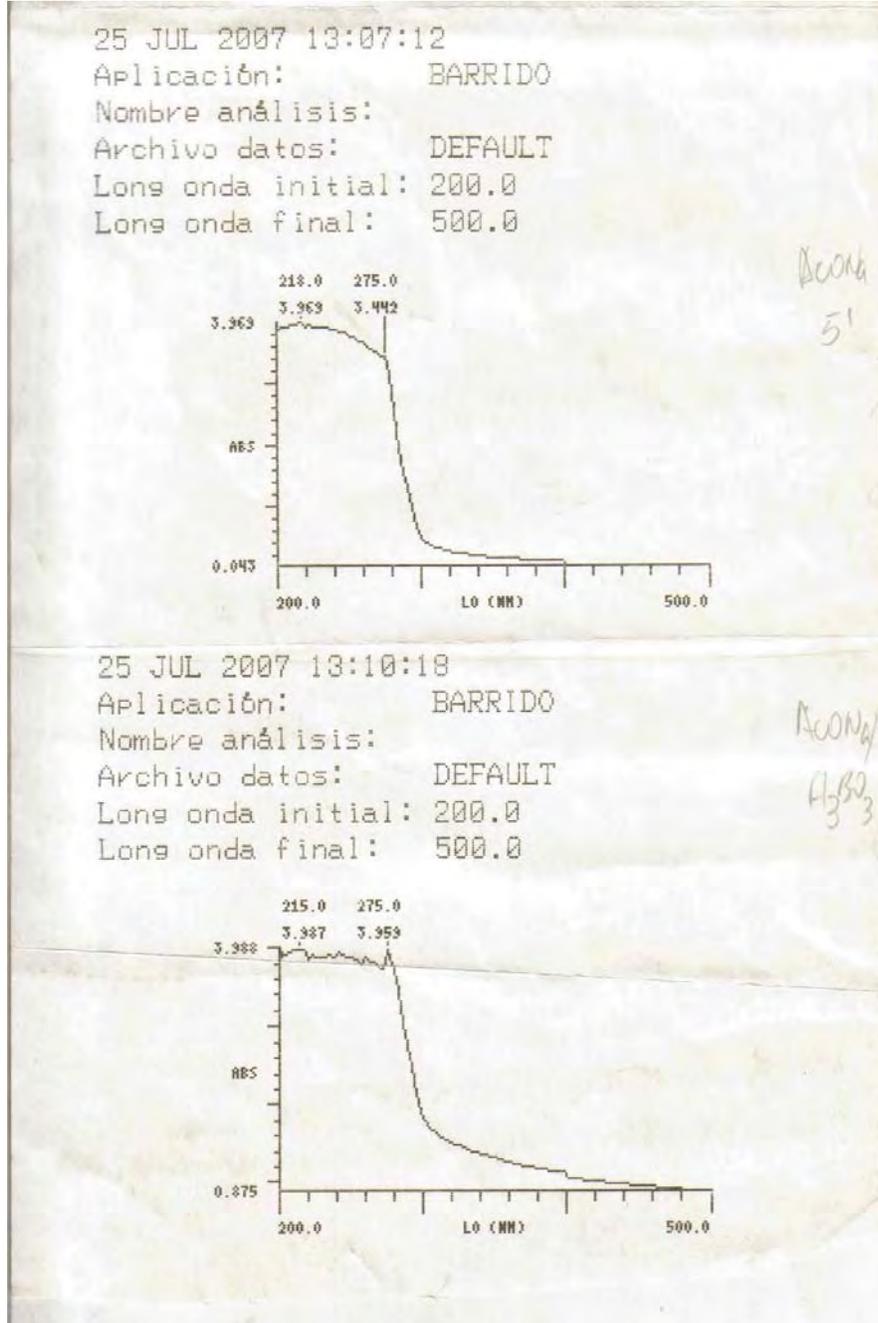


FIGURA N° 9

LECTURA AL ESPECTROFOTÓMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO (Fracción N° 4)

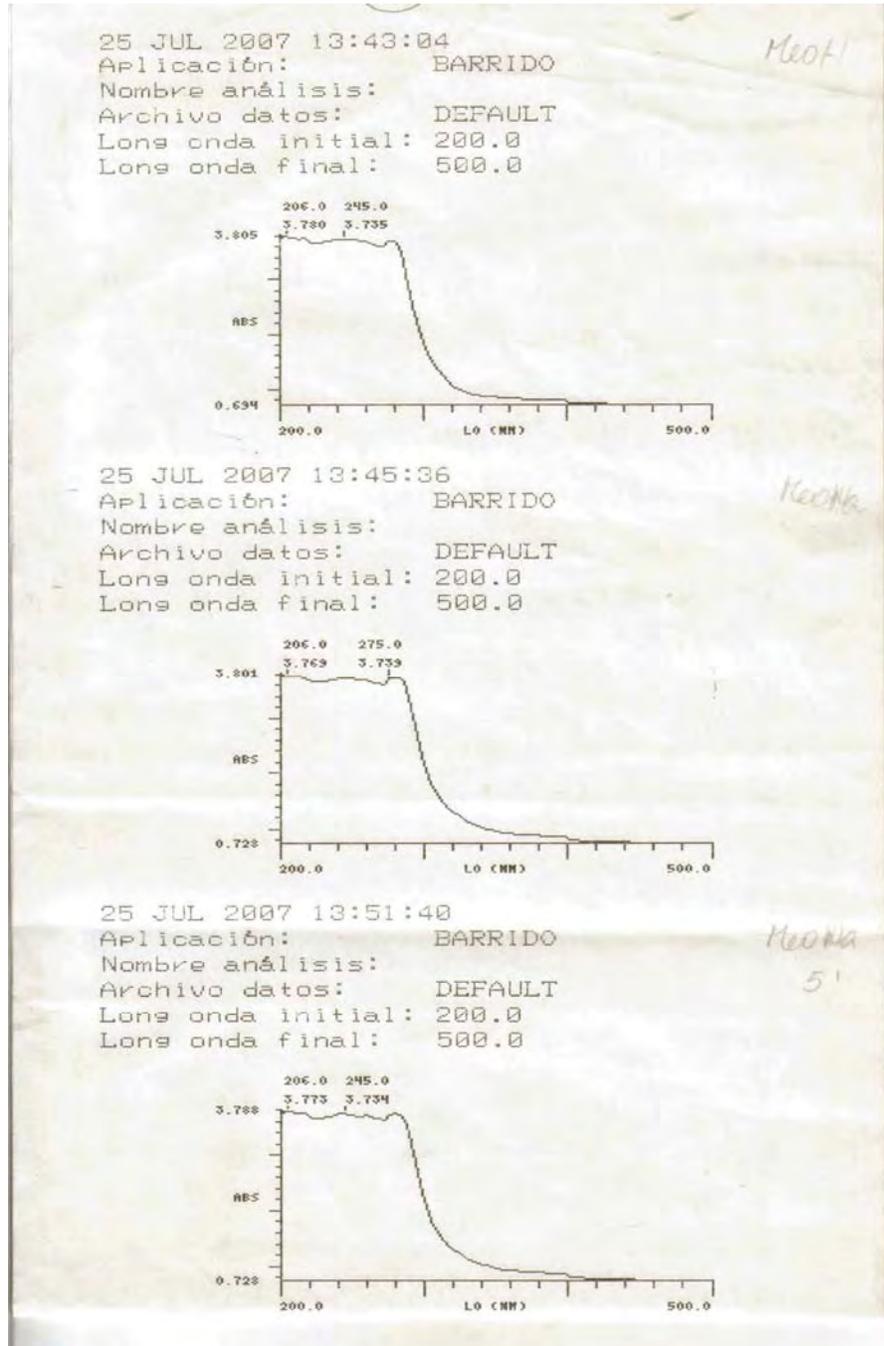


FIGURA N° 10

LECTURA AL ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO (Fracción N° 4)

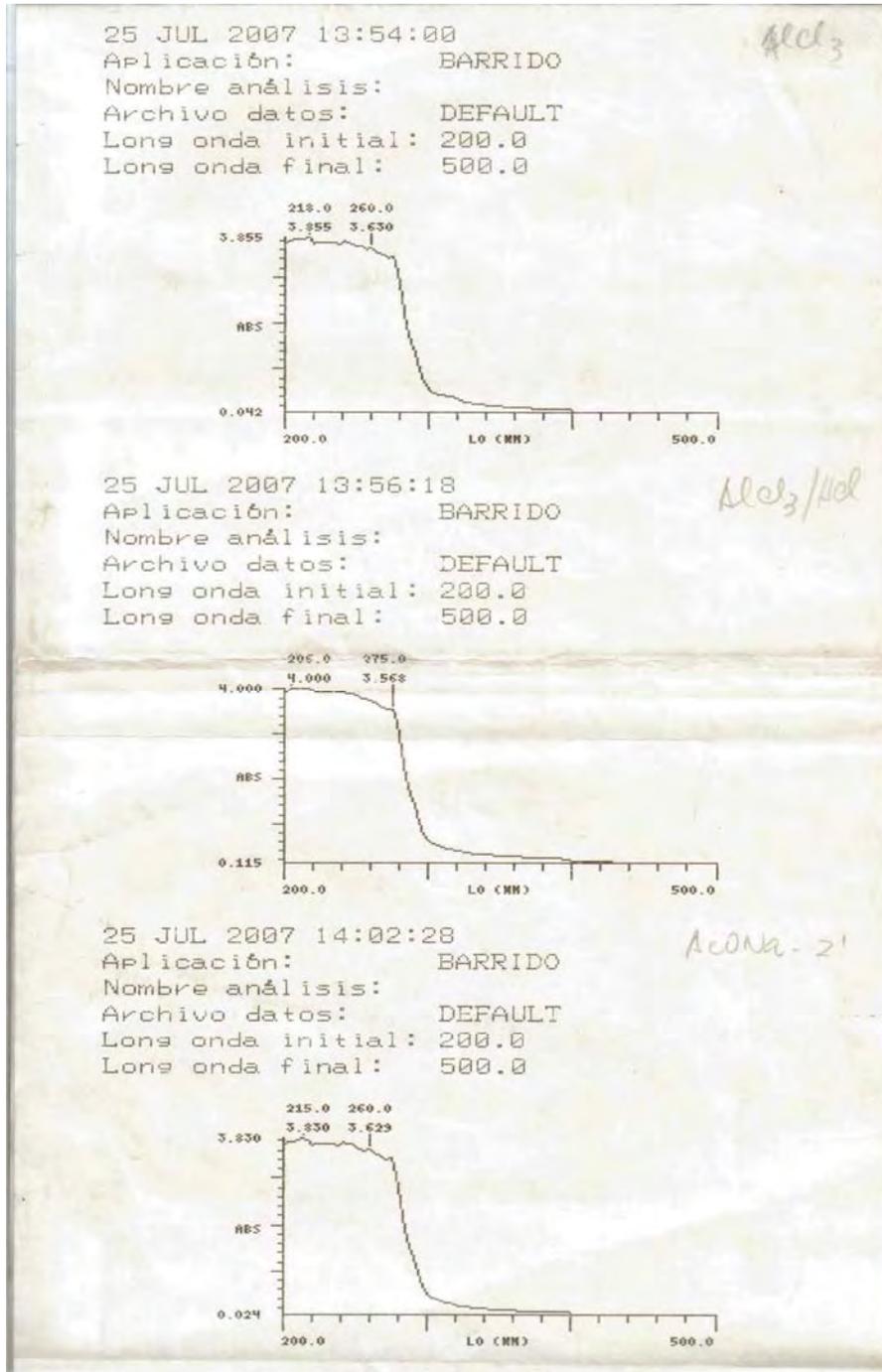


FIGURA N° 11

LECTURA AL ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO (Fracción N° 4)

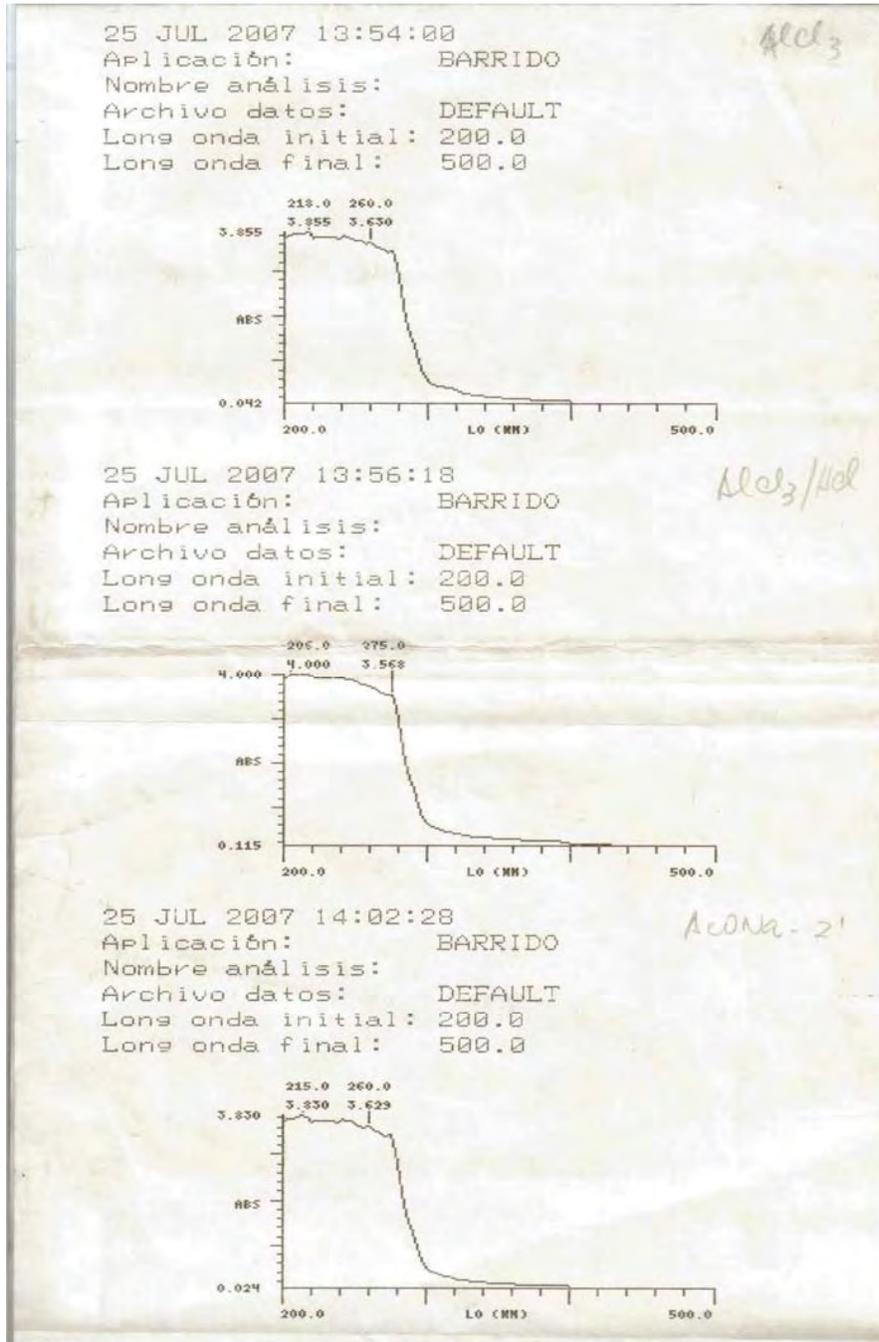


FIGURA N° 12

LECTURA AL ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO (Fracción N° 5)

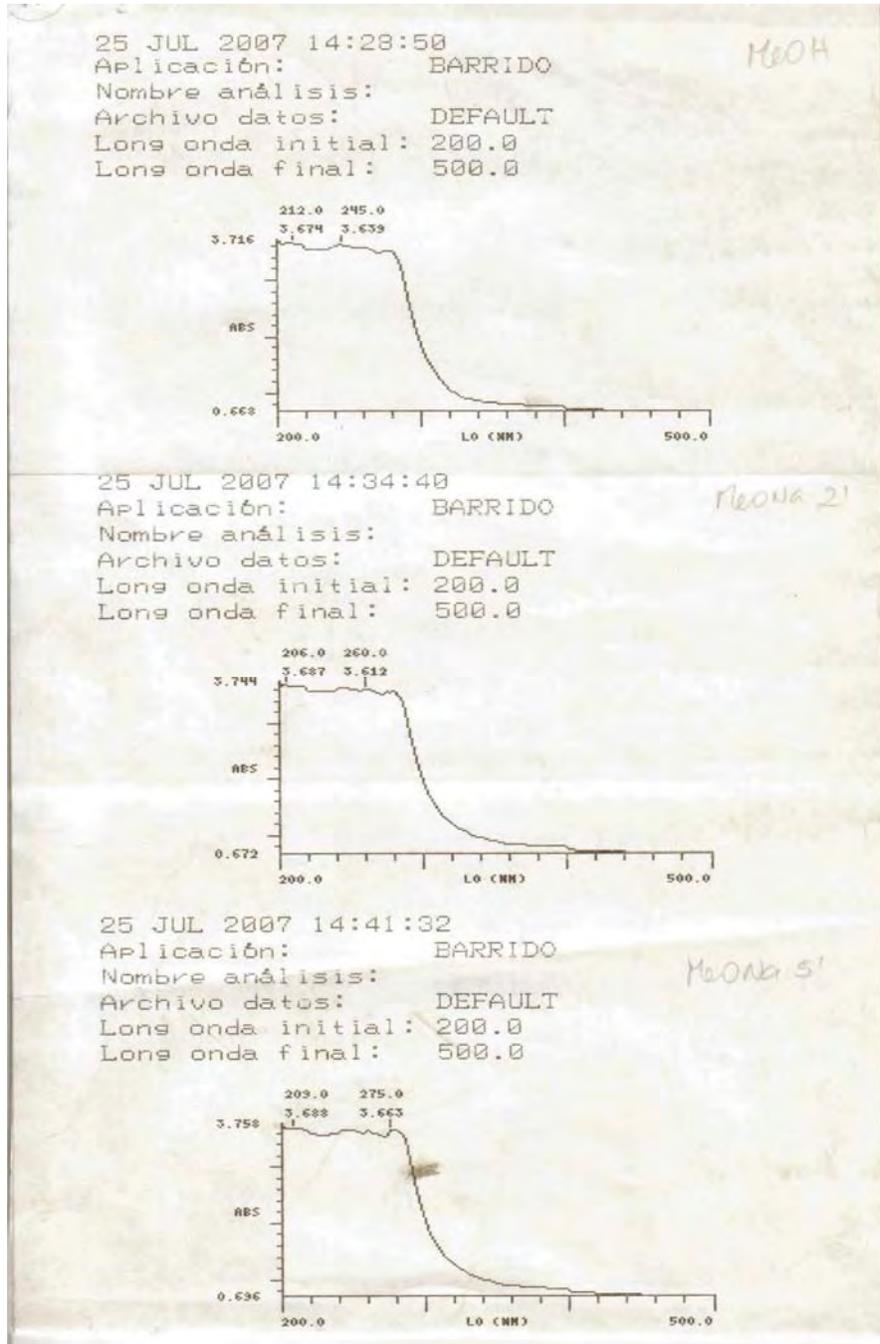


FIGURA N° 13

LECTURA AL ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO (Fracción N° 5)

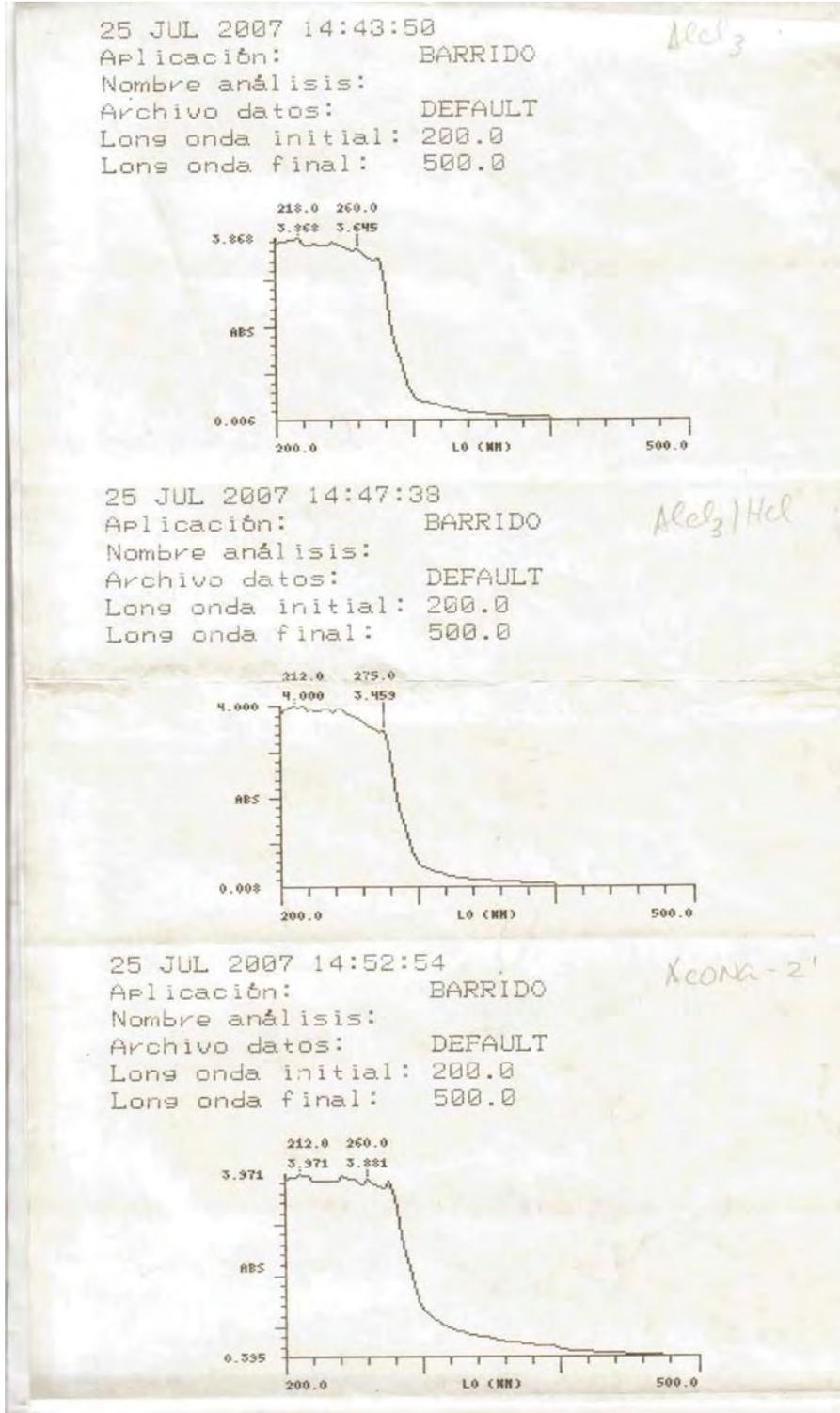
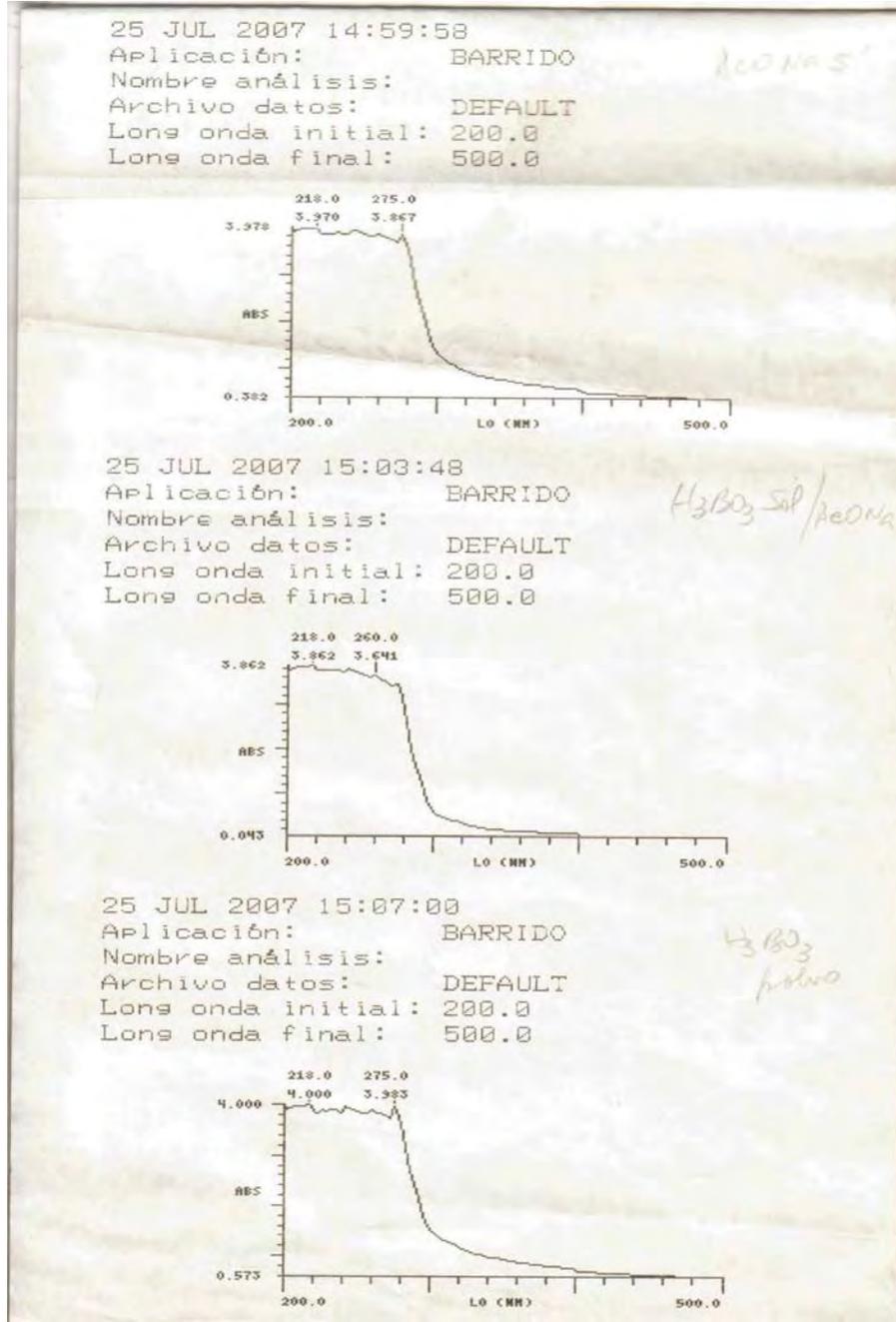


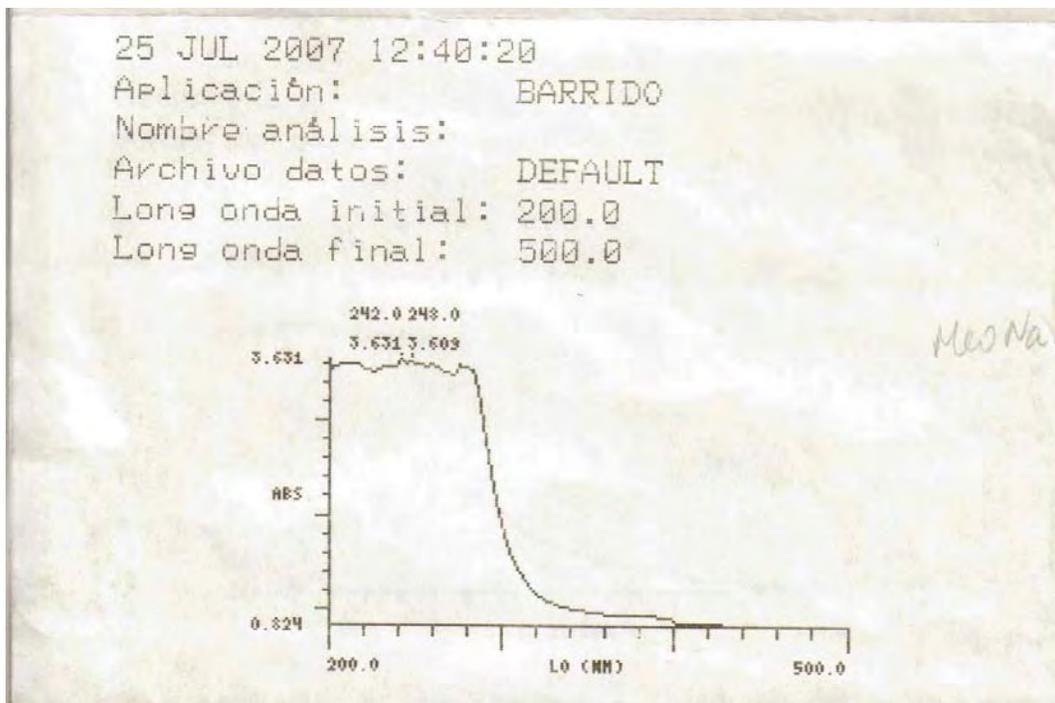
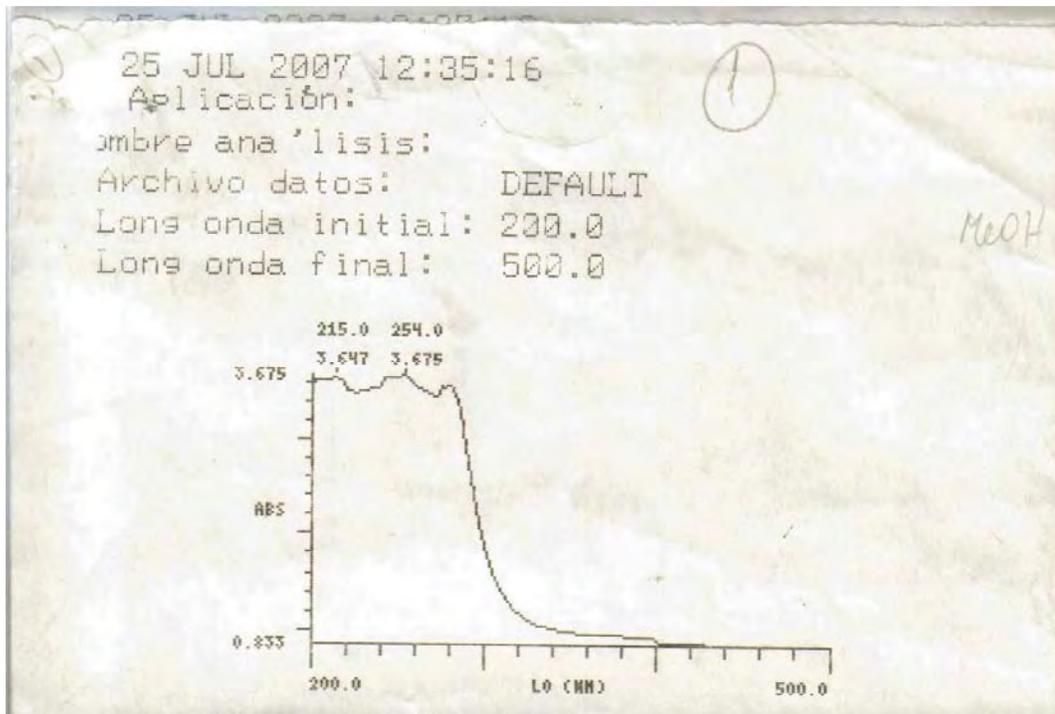
FIGURA N° 14

LECTURA AL ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

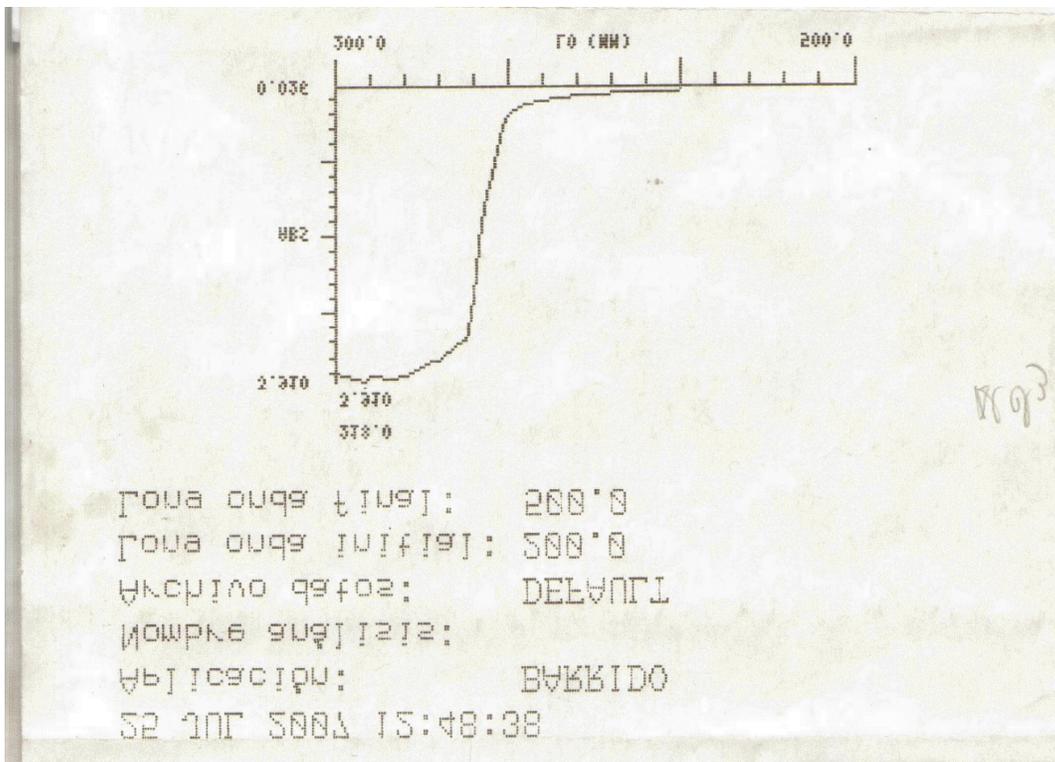
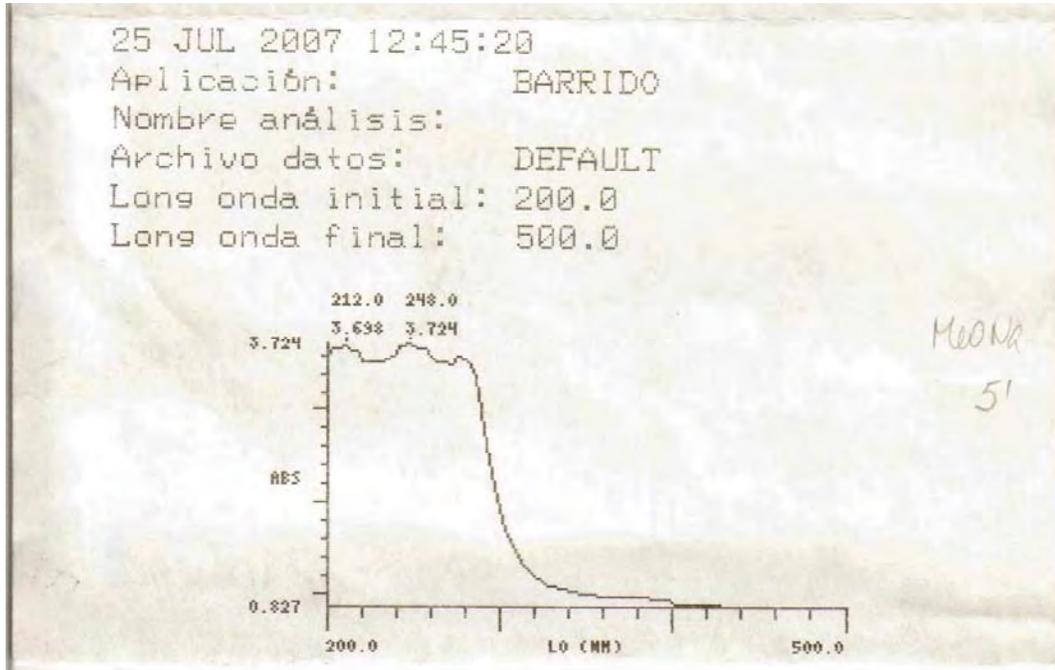
DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO (Fracción N° 5)



LECTURA N° 1 - 2 AL ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO

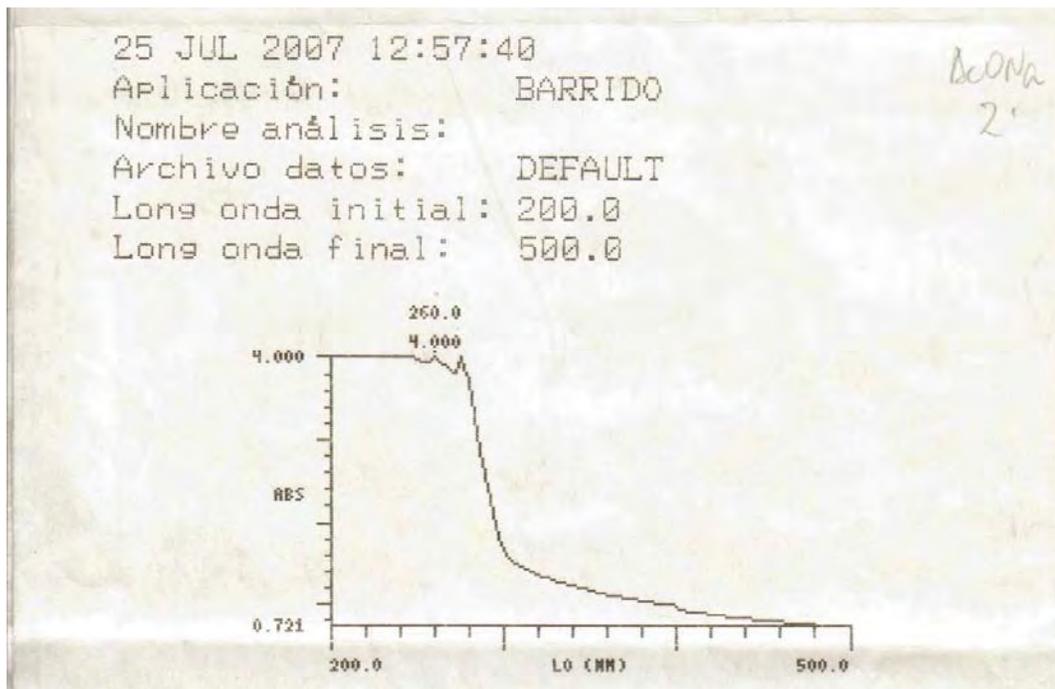
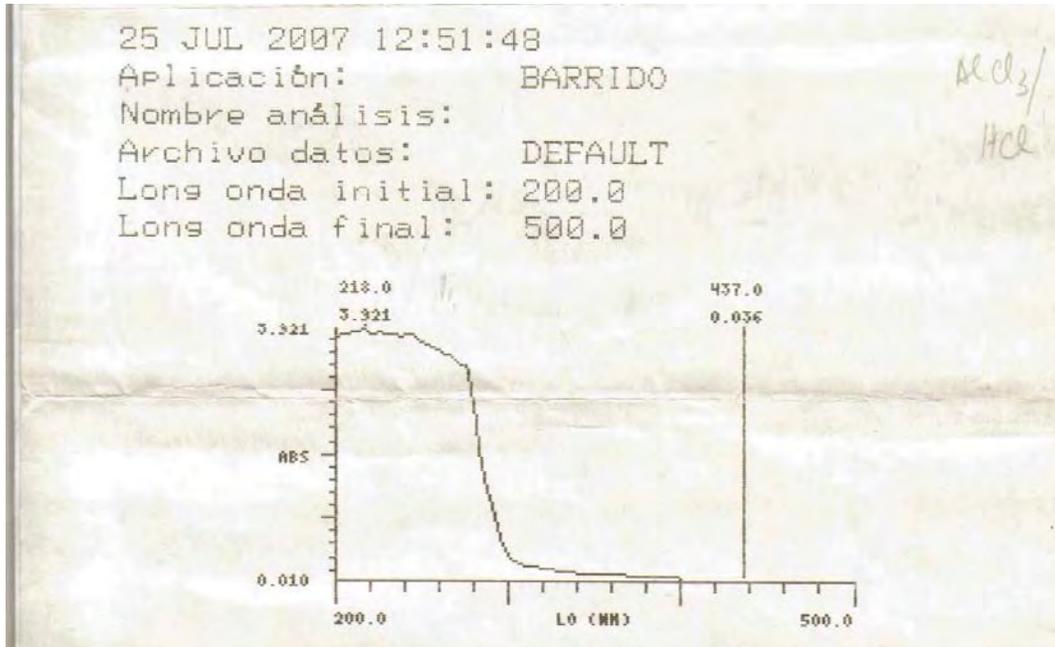


LECTURA N° 3-4 AL ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO

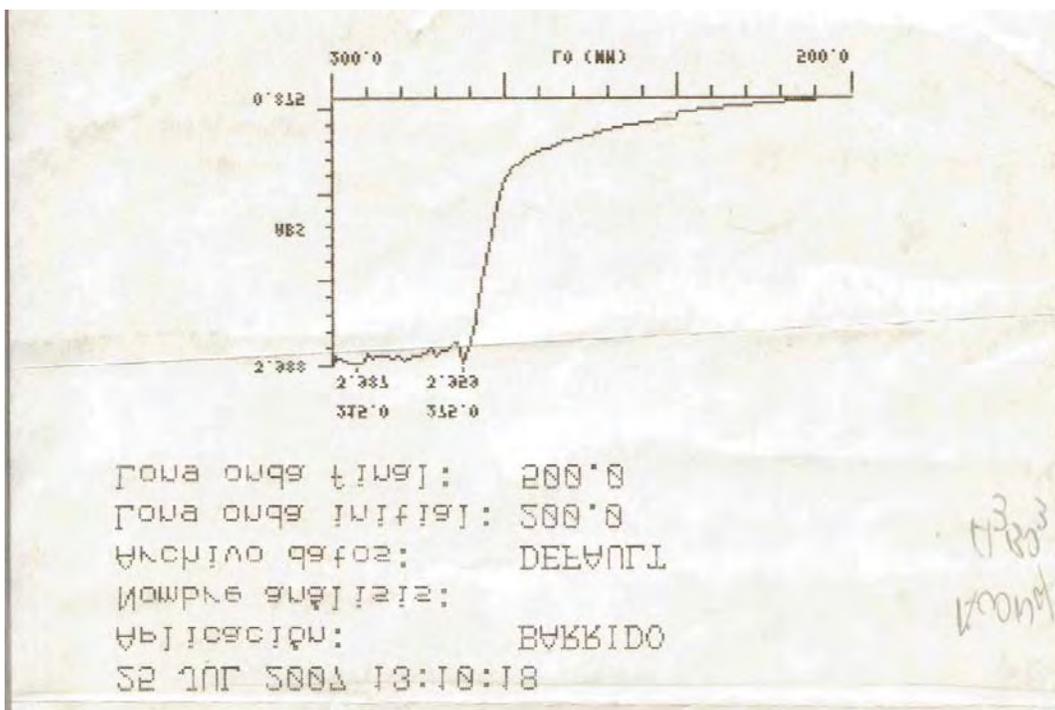
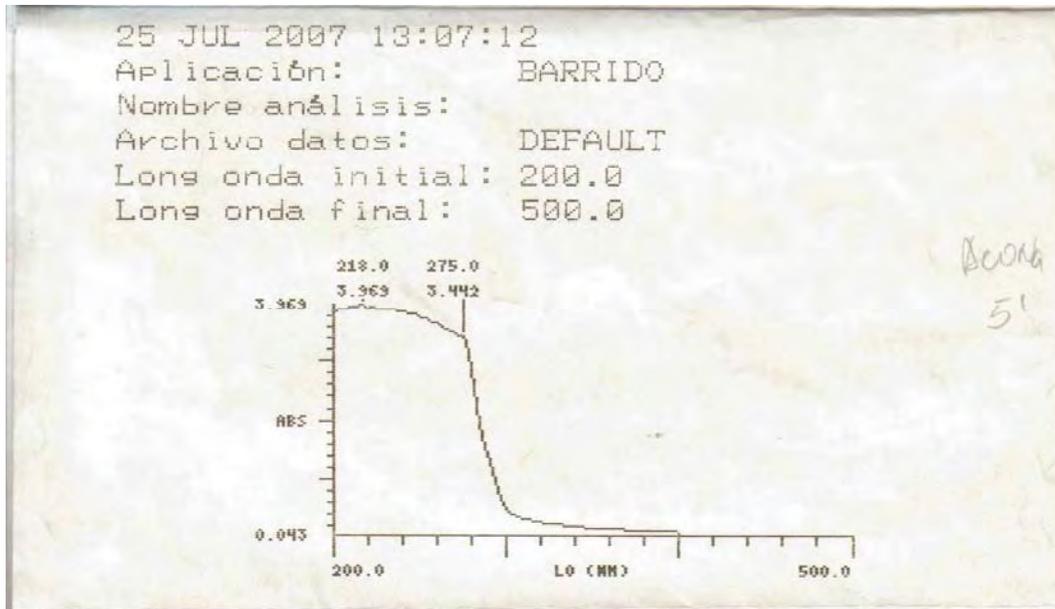


LECTURA Nº 5 - 6 AL ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

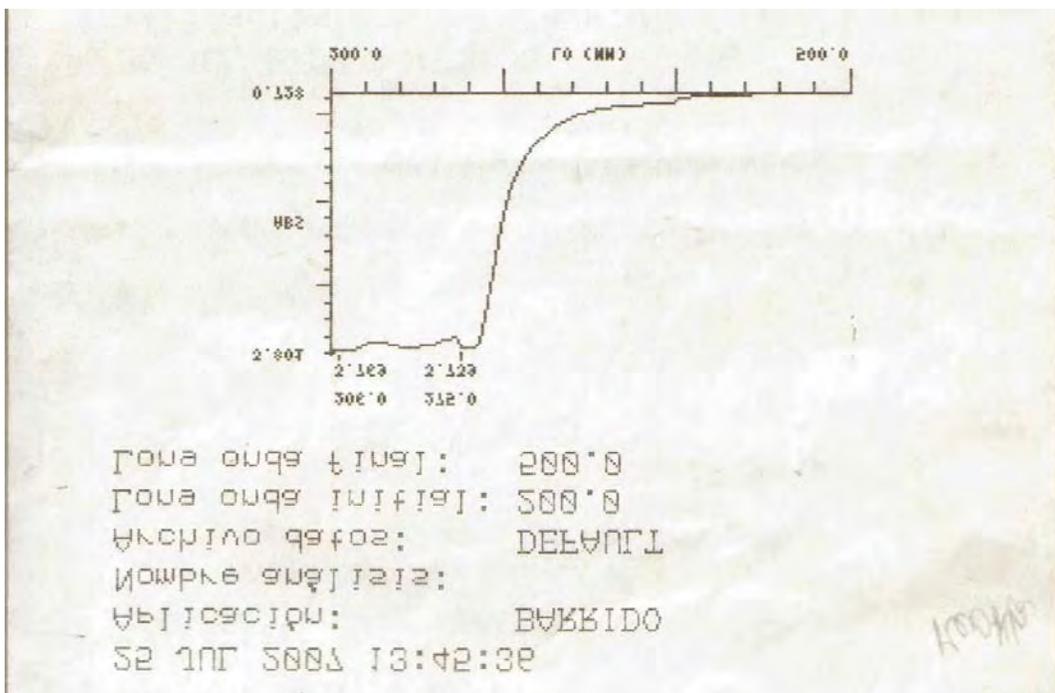
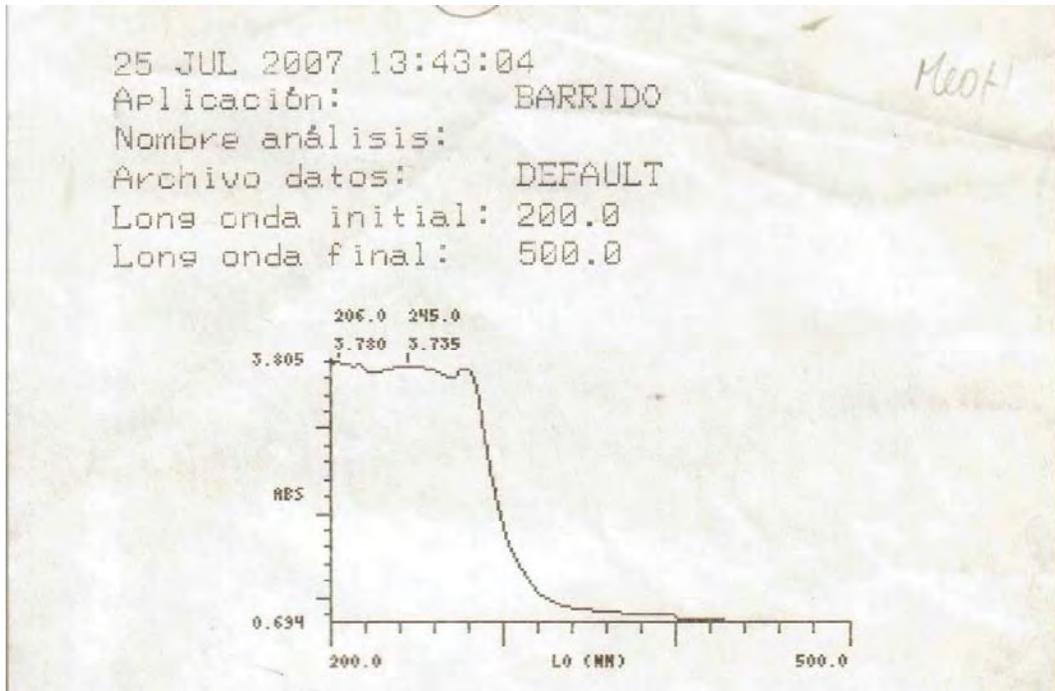
DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO



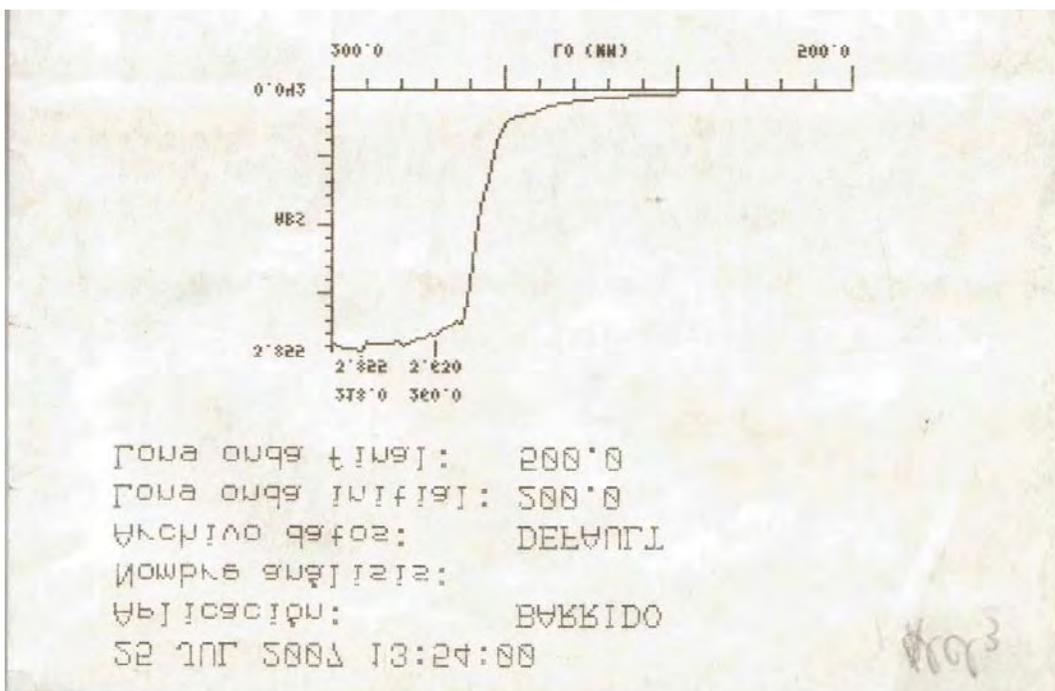
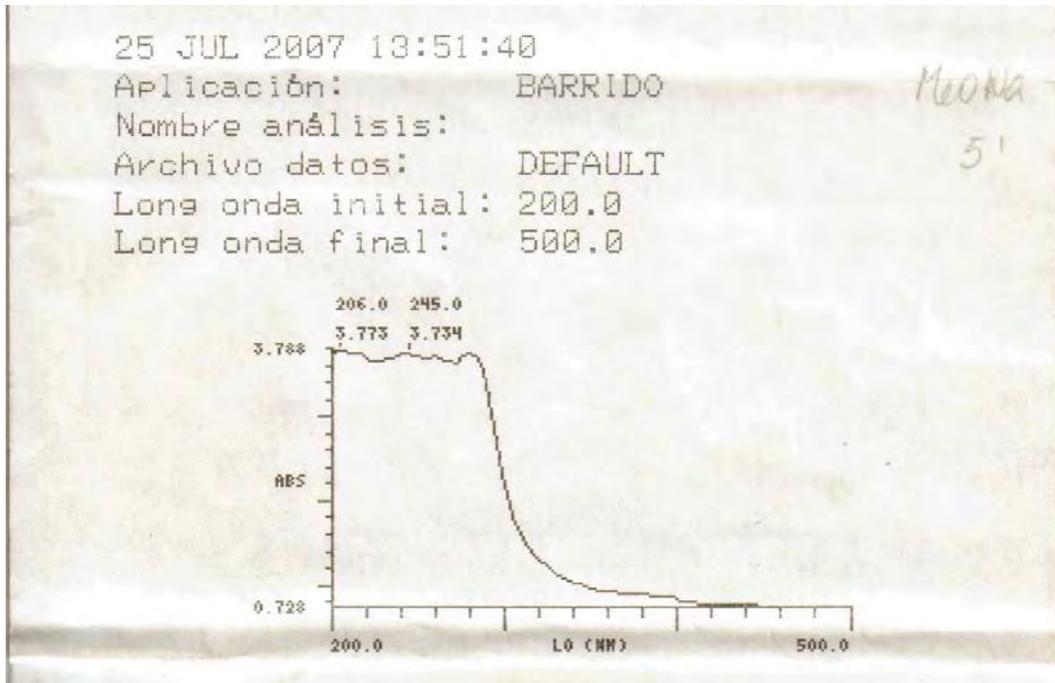
**LECTURA N° 7 - 8 AL ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO**



**LECTURA N° 9 – 10 AL ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO**

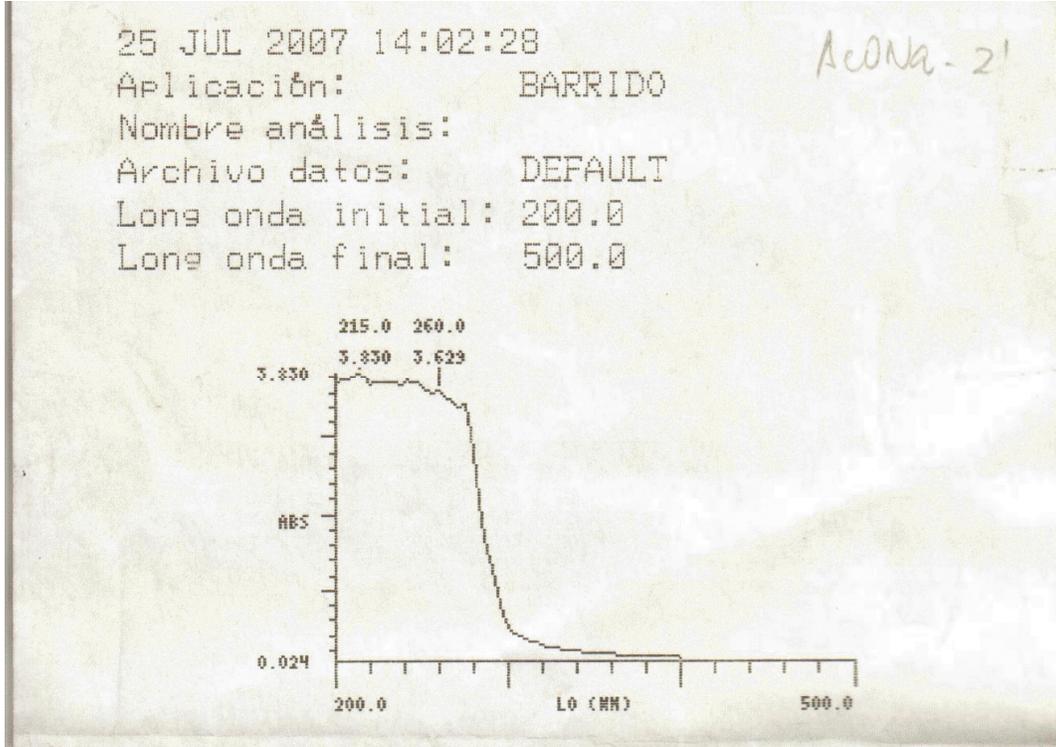
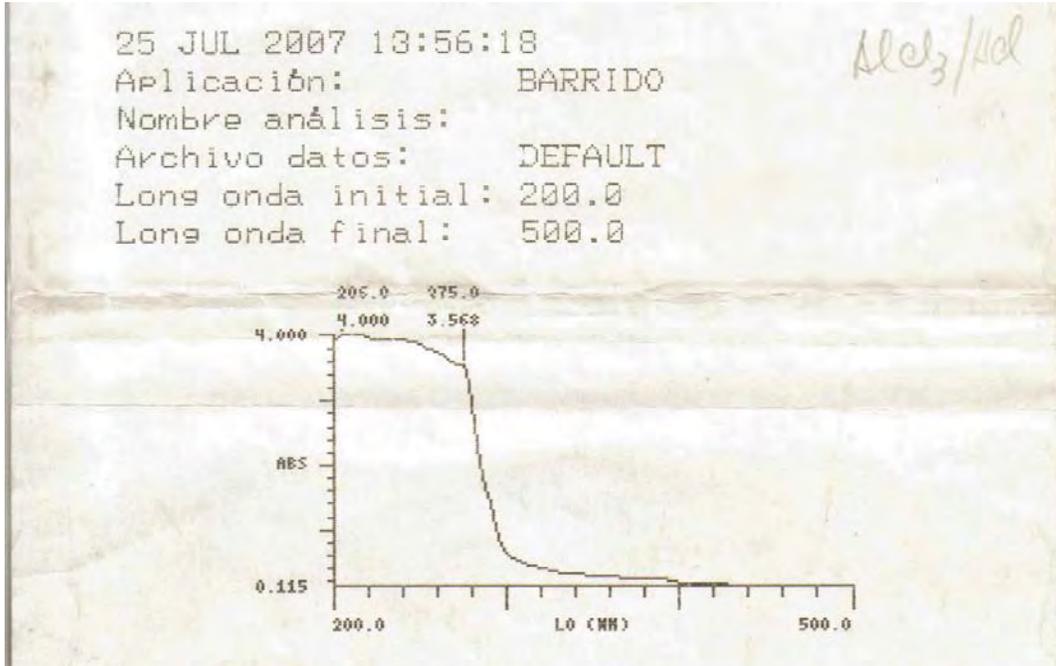


LECTURA N° 11 - 12 AL ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO

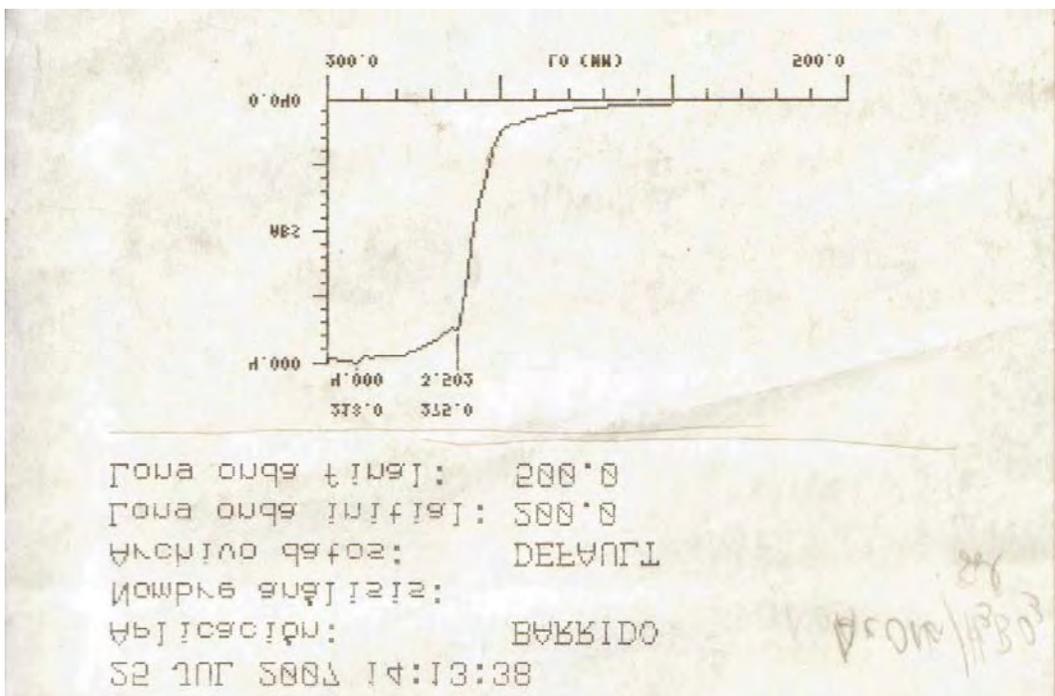
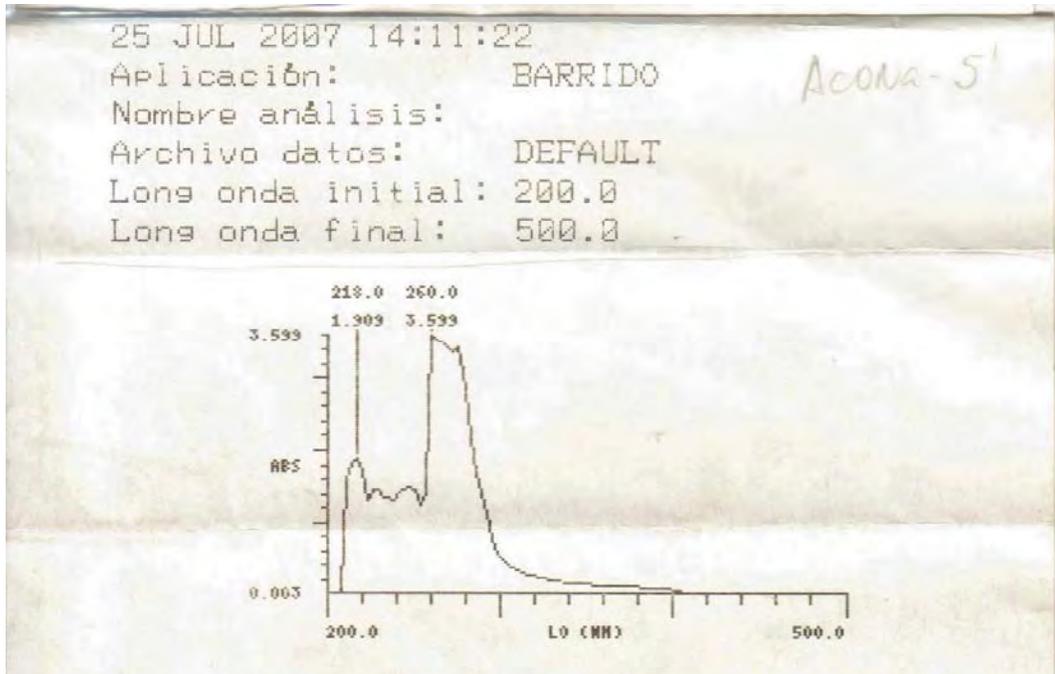


LECTURA N° 13 - 14 AL ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

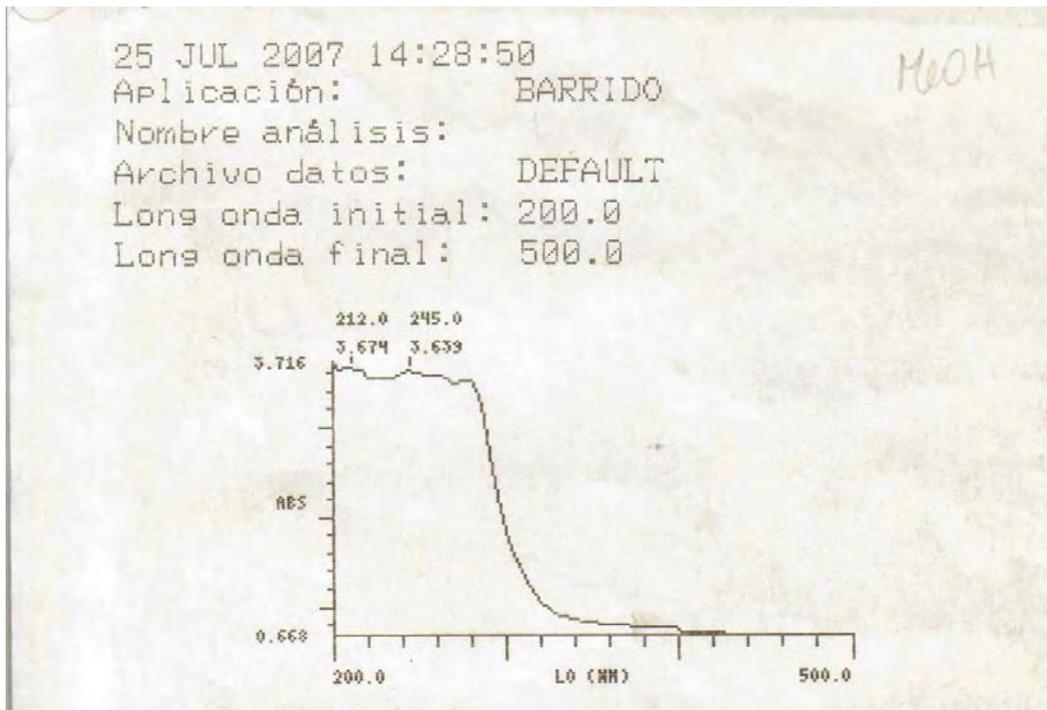
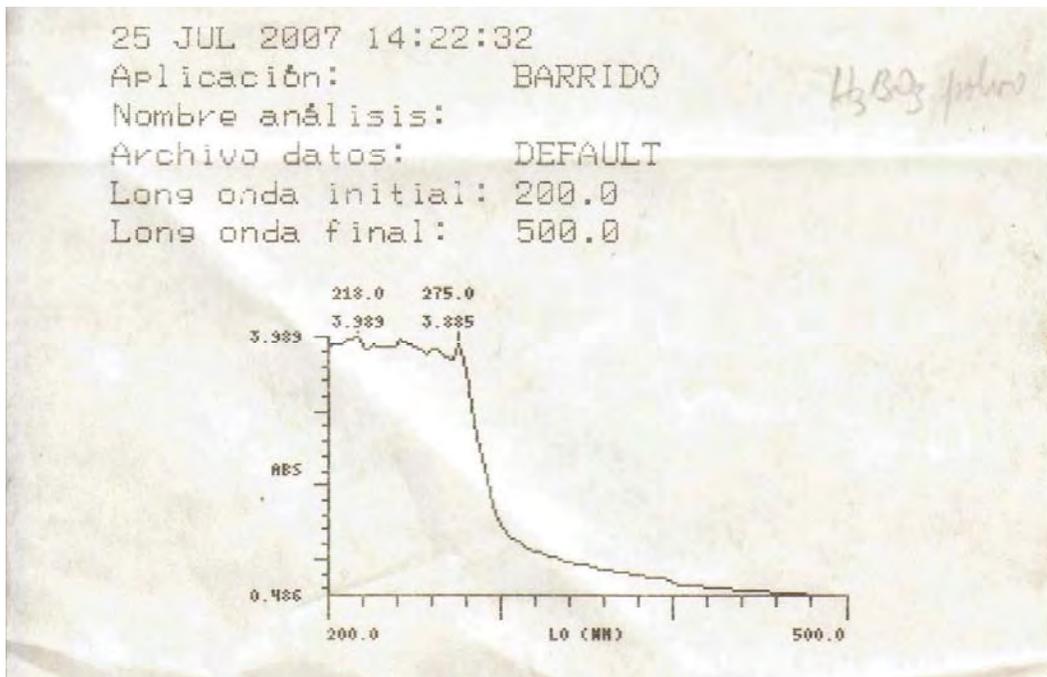
DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO



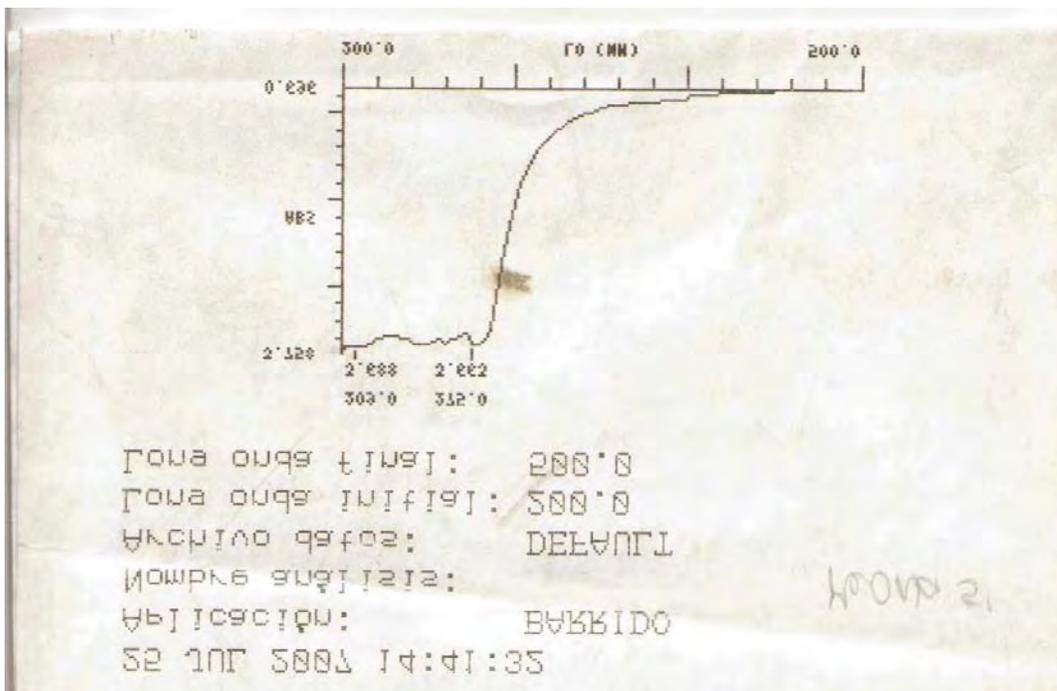
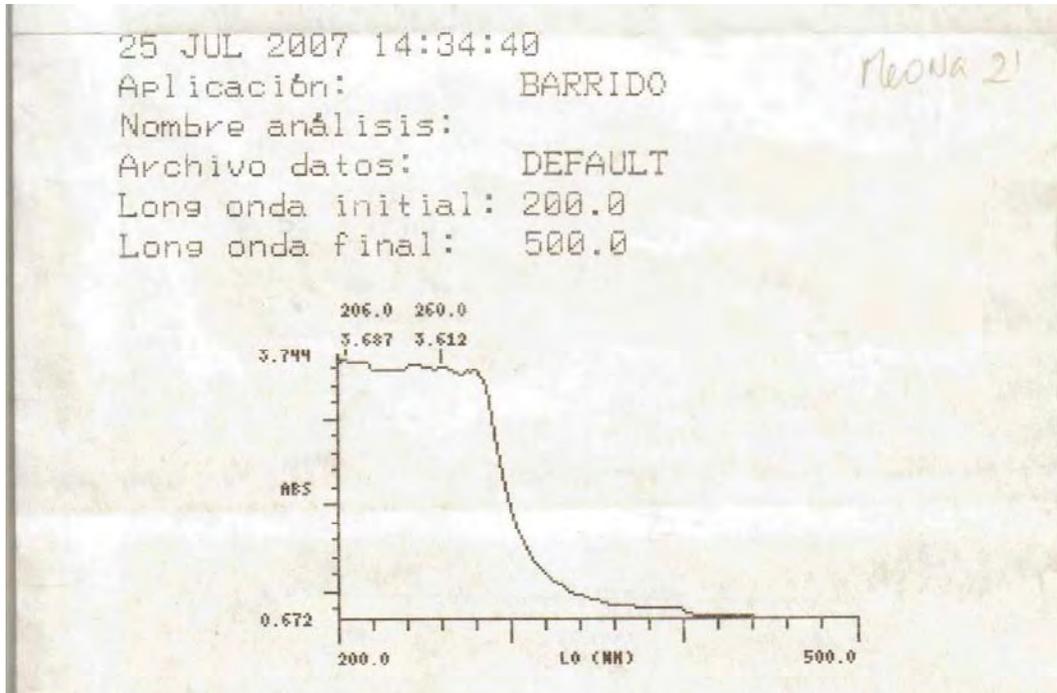
**LECTURA N° 15 – 16 AL ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO**



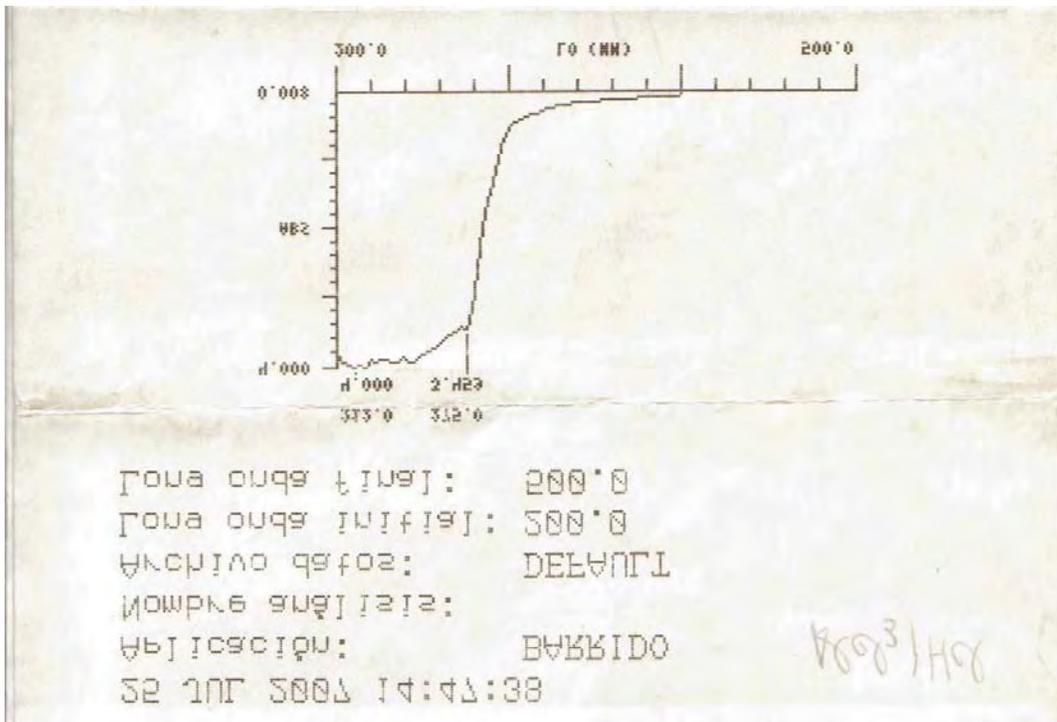
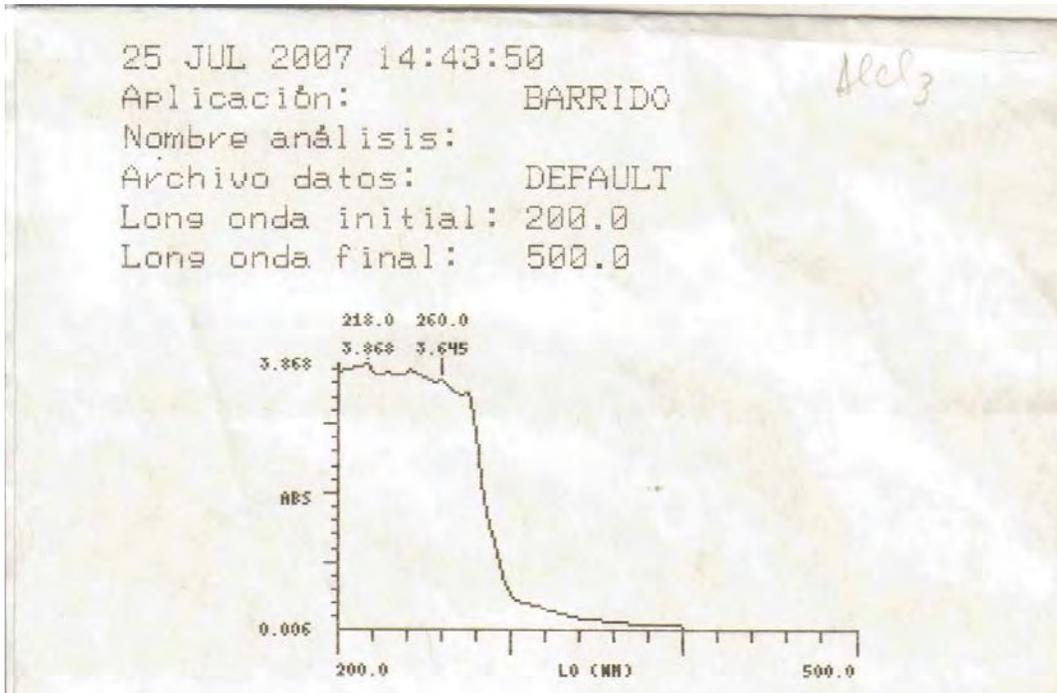
LECTURA N° 17 – 18 AL ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO



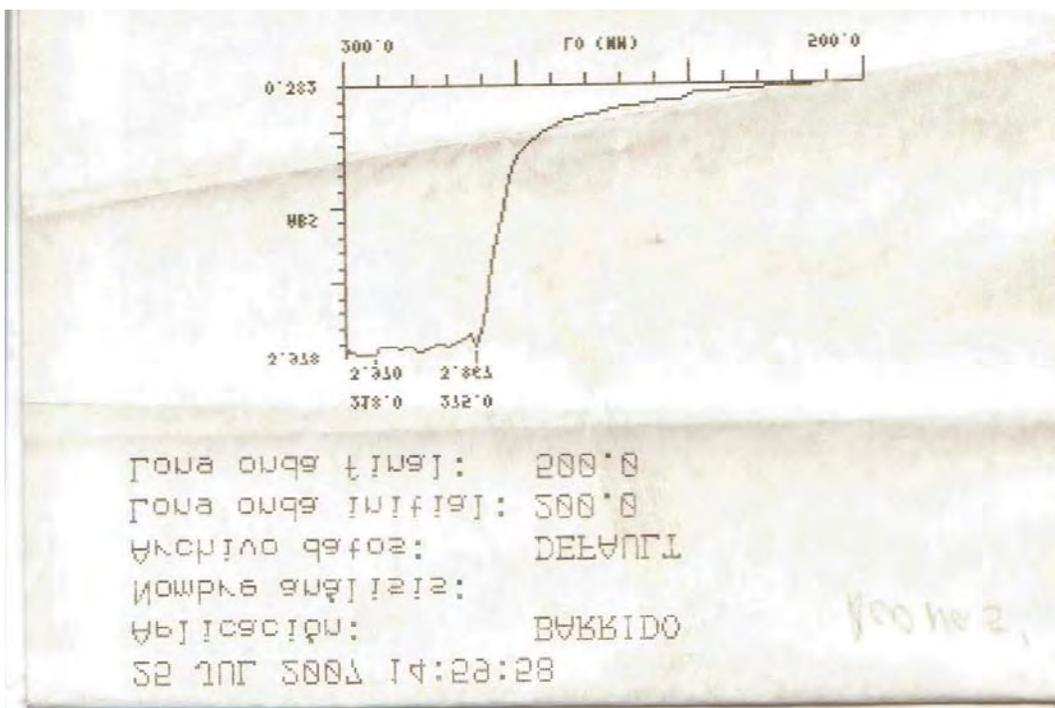
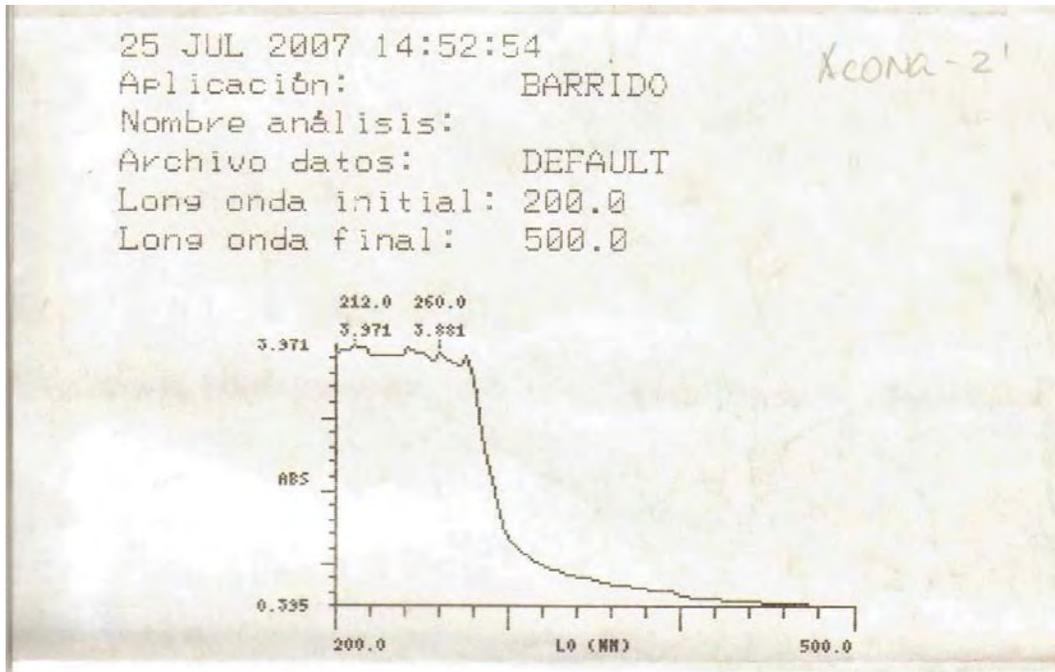
**LECTURA N° 19 – 20 AL ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO**



LECTURA N° 21 – 22 AL ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO
 DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO

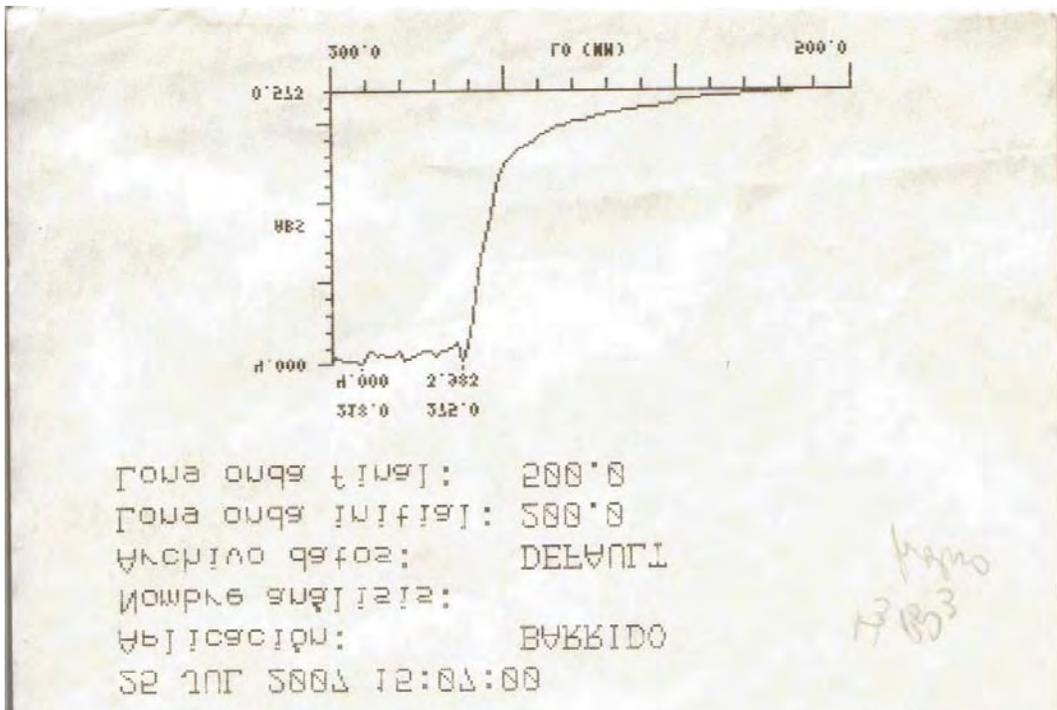
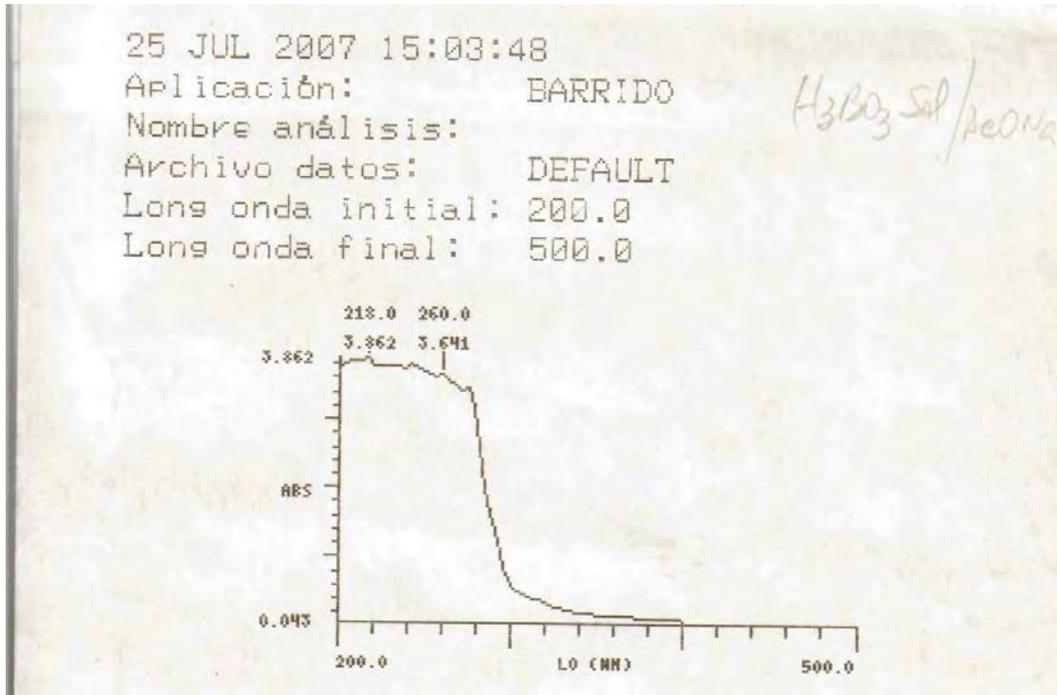


**LECTURA AL N° 23 – 24 ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO**



LECTURA N° 25 - 26 AL ESPECTROFOTOMETRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO



DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO 1

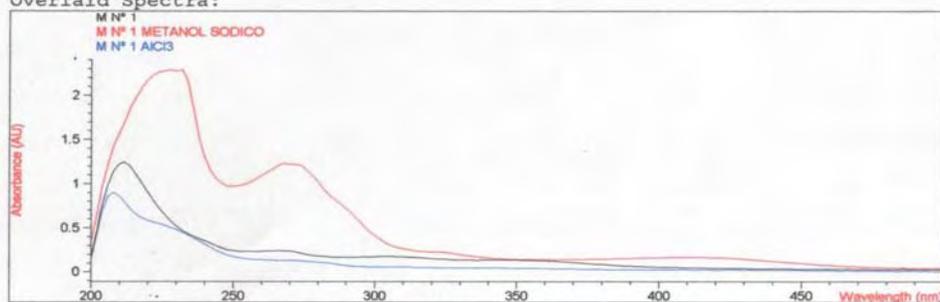
=====

Fixed Wavelength Report Date 24/08/2007 Time 17:13:26 Page 1 of 1
ENSAYO DE SENNA RETICULATA - MUESTRA N°6

=====

Method file : <untitled>
Information : CONTROL DE CALIDAD (F. MENA)
Data File : <untitled>

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<366nm>	#	Name	Abs<366nm>
1	M N° 1	0.11699	3	M N° 1 ALC13	3.7170E-2
2	M N° 1 METANOL S	0.14261			

Report generated by : D.QUIROZ

Signature:

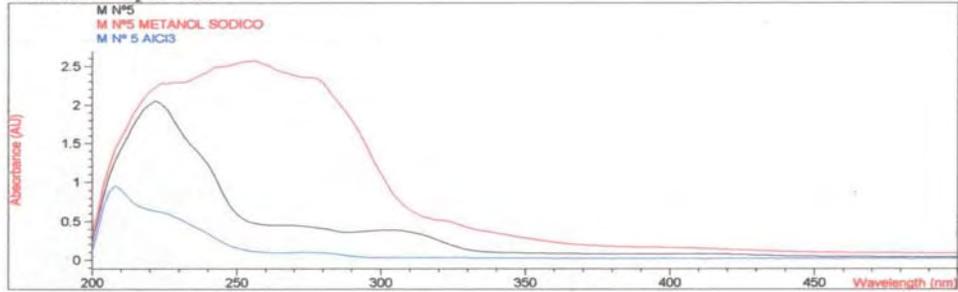
=====
*** End Fixed Wavelength Report ***
=====

DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO 5

Fixed Wavelength Report Date 24/08/2007 Time 17:20:55 Page 1 of 1
ENSAYO DE SENNA RETICULATA - MUESTRA N°6

Method file : <untitled>
Information : CONTROL DE CALIDAD (F. MENA)
Data File : C:\HPCHEM~1\1\DATA\MNUMERO5.SD Created : 1/8/07
16:36:33

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<366nm>	#	Name	Abs<366nm>
1	M N°5	8.1848E-2	3	M N° 5 AlCl3	2.1851E-2
2	M N°5 METANOL SO	0.20732			

Report generated by : D.QUIROZ

Signature:

*** End Fixed Wavelength Report ***

DESPLAZAMIENTO BATOCRÓMICO 7

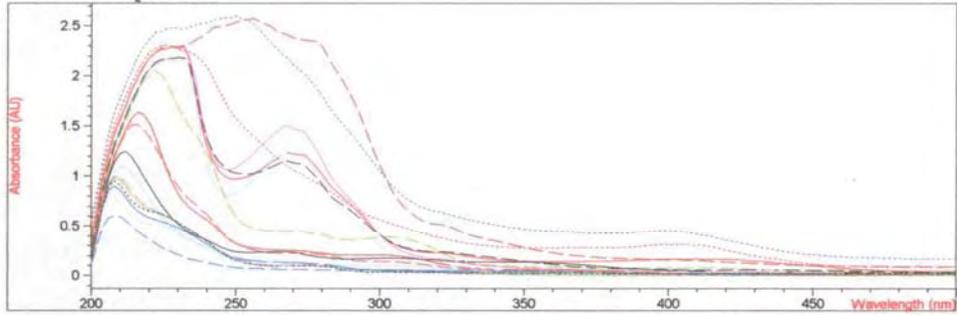
=====

Fixed Wavelength Report Date 24/08/2007 Time 17:24:41 Page 1 of 1
 ENSAYO DE SENNA RETICULATA - MUESTRA N°6

=====

Method file : <untitled>
 Information : CONTROL DE CALIDAD (F. MENA)
 Data File : <untitled>

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<366nm>	#	Name	Abs<366nm>
1	M N° 1	0.11699	10	M N°4	2.1149E-2
2	M N°1 METANOL SO	0.14261	11	M N°4 METANOL SO	4.4754E-2
3	M N°1 AlCl3	3.7170E-2	12	M N°4 AlCl3	2.1347E-2
4	M N°2	2.5253E-2	13	M N°5	8.1848E-2
5	M N°2 METANOL SO	6.1371E-2	14	M N°5 METANOL SO	0.20732
6	M N°2 AlCl3	5.5542E-3	15	M N°5 AlCl3	2.1851E-2
7	M N°3	5.5618E-2	16	M N°6	0.28059
8	M N°3 METANOL SO	9.6466E-2	17	M N°6 Metanol So	0.43927
9	M N°3 AlCl3	3.9703E-2	18	M N°6 AlCl3	1.8890E-2

Report generated by : D.QUIROZ

Signature:

*** End Fixed Wavelength Report ***

ANEXO IV

FOTO N° 5
SEMBRADO DE PLACAS

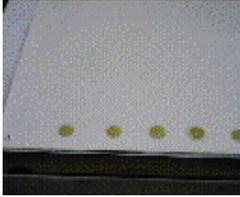


FOTO N° 6
SEMBRADO DE PLACAS



FOTO N° 7
PLACA ACTIVADA



FOTO N° 8
CORRIDA DE PLACA

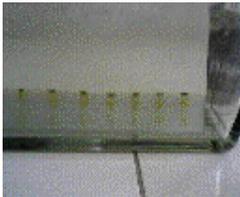


FOTO N° 9
CORRIDA DE PLACA

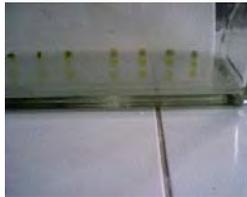


FOTO N° 10
CORRIDA DE PLACA



FOTO N° 11
CORRIDA DE PLACA



FOTO N° 12
SEPARACIÓN METABOLITOS



FOTO 13
SEPARACIÓN METABOLITOS



FOTO N° 14
REVELADO U.V.

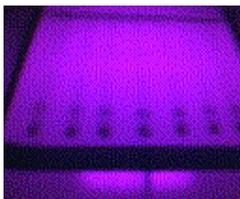


FOTO N° 15
REVELADO U.V.

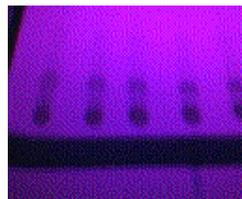


FOTO N° 16
RASPADO DE PLACA



FOTO N° 17
SEPARAR C / FRACCIÓN



FOTO N° 18
SEPARAR C / FRACCIÓN



FOTO N° 19
LECTURA AL ESPECTRO



FOTO N° 20
EXTRACTO ETANÓLICO



FOTO N° 21
RATONES RAZA SWISS



FOTO N° 22
Tto. CICATRIZANTE



FOTO N° 23
Tto. CICATRIZANTE



FOTO N° 24
Tto. CICATRIZANTE



FOTO N° 25
Tto CICATRIZANTE



FOTO N° 26
APLICA CREMA C/ EXTRACTO



FOTO N° 27
USO DE DINAMOMETRO



FOTO N° 28
DINAMOMETRO



FOTO N° 29
Tto. ANTIINFLAMATORIO



FOTO N° 30
Tto. OREJA DE RATÓN



FOTO N° 31
PORCIÓN DE OREJA



FOTO N° 32
Tto. ANTIINFLAMATORIO



FOTO N° 33
Tto. OREJA DE RATÓN



FOTO N° 34
TRATAMIENTO

