

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica

DETERMINACIÓN DE LA ACCIÓN CICATRIZANTE DE LAS
HOJAS DE *Stevia rebaudina* Bertoni EN HERIDAS
CUTÁNEAS REALIZADAS A RATONES DE
EXPERIMENTACIÓN. TACNA 2014

TESIS

Presentada por:

Bach. Franklin Hanz Tonconi Larico

Para optar el Título Profesional de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

TACNA - PERÚ

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica

DETERMINACIÓN DE LA ACCIÓN CICATRIZANTE DE LAS HOJAS DE
Stevia rebaudiana Bertonii EN HERIDAS CUTÁNEAS REALIZADAS A
RATONES DE EXPERIMENTACIÓN. TACNA – 2014

TESIS

Presentado por:

Bach. FRANKLIN HANZ TONCONI LARICO

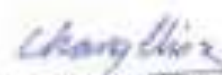
Para optar el Título Profesional de:
QUÍMICO – FARMACÉUTICO



Dr. Ricardo Ernesto Ortiz Fauchoux
Presidente



Q.F. Juan Carlos Efraim Cervantes Zegarra
Miembro



Q.F. Juan José Changllo Roas
Miembro



Q.F. Yemlé Berrios Espejo
Asesor

DEDICATORIA

A Dios porque en cada instante de mi vida se encuentra presente
brindándome la oportunidad de ser cada día mejor.

A mis padres David y Nelly, porque con su gran amor, confianza y ejemplo
me han ayudado a culminar mi carrera profesional.

A mi princesa Ccori Mahal, la razón de mi existencia, el motor y motivo en
mi vida.

A Myriam la luz de mis ojos, por todo el apoyo que me has dado para
continuar y seguir en este camino.

A mis hermanos Yuri y Fernando por su cariño y solidaridad.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial al Médico Anatómo – Patólogo Felix Garnica Alata, del Departamento de Patología y Anatomía Patológica del Hospital Regional Manuel Nuñez Butrón, por su valiosa y paciente asesoría así como por el tiempo brindado en la lectura para el estudio histológico.

Al Sr. Nicolas Rodriguez Caceres, mi asesor técnico en la preparación de los tejidos histológicos, gracias por su tiempo.

Al personal del Departamento de Patología y Anatomía Patológica del mismo Hospital: Lic. Nelly Flores Alejo y a la Médico Anatómo – Patólogo Elizabeth Gómez Arrieta.

A la Mgr. Yemile Berríos Espejo, asesora principal de este trabajo de investigación.

A mis jefas del trabajo Q. F. Carla Alvarez Rodriguez y Q. F. Ana Alvarez Rodriguez, por ser de ellas la idea original del presente trabajo de investigación.

A mi amiga Carolina Delgado Flores, por su apoyo incondicional en los trámites, desde, la presentación del proyecto hasta la culminación del informe final.

Y a todos aquellos que han creído en mí y me han apoyado.

ÍNDICE

RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	
PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO	3
1.1. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA	3
1.2. ENUNCIADO DEL PROBLEMA O FORMULACIÓN	5
1.3. JUSTIFICACION	6
1.4. OBJETIVOS	8
1.4.1. Objetivo General	8
1.4.2. Objetivos Específicos	8
1.5. HIPOTESIS	9
1.6. DETERMINACIÓN DE VARIABLES	9
1.6.1. Variable Independiente	9
1.6.2. Variable Dependiente	9
1.7. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES E	
INDICADORES	10
CAPITULO II	
MARCO TEORICO	11
2.1. ANTECEDENTES	11
2.2. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	12

2.2.1. Generalidades	12
2.2.2. Origen y Distribución Geográfica	14
2.2.3. Condiciones del hábitat natural donde la especie ha sido cultivada exitosamente	16
a) Variables climáticas	16
b) Variables edáficas	16
c) Variables topográficas	17
2.2.4. Descripción Botánica	17
a) Raíces	17
b) Tallos	17
c) Hojas	17
d) Flores	17
e) Frutos	18
f) Semillas	18
2.2.5. Estructura de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	18
2.2.6. Recolección de la <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	19
a) Cosecha	19
b) Secado	19
c) Almacenamiento	20
2.2.7. Composición Química de la <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	20
2.2.8. Propiedades de la <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	24

2.2.9. Otras propiedades	28
2.2.10. Estudio Fitoquímico	28
2.3. HERIDAS Y CICATRIZACIÓN	30
2.3.1. La piel: Generalidades	30
2.3.1.1. Estructura de la piel	30
a) Epidermis	30
b) Dermis	32
c) Hipodermis	33
d) Anexos cutáneos	33
2.3.1.2. Funciones de la piel	34
2.3.2. Heridas: Conceptos Básicos	34
2.3.2.1. Mecanismo	35
a) Fricción	35
b) Percusión	35
c) Comprensión	36
d) Tracción	36
2.3.2.2. Clasificación de heridas	36
a) Heridas incisas	36
b) Heridas contusas	36
c) Heridas punzantes	37
d) Heridas por arrancamiento	37
e) Heridas por mordedura	37

f) Heridas por arma de fuego	37
g) Heridas abrasivas	38
2.3.2.3. Profundidad de la herida	38
2.3.2.4. Estudio clínico	39
2.3.2.5. Estudio histológico	41
a) Histología Conjuntiva	41
b) Técnicas histológicas	41
2.3.2.6. Tratamientos	42
a) Si la herida es aguda	43
b) Si la herida es crónica	44
c) Si la herida compromete tejidos	45
2.3.2.7. Complicaciones de las heridas	44
a) Infección de la herida	46
b) Tétanos	46
c) Hematoma o ceroma de la herida	47
d) Dehiscencia de la herida	47
2.3.3. La cicatrización: Conceptos Básicos	47
2.3.3.1. Fases o periodos del proceso de cicatrización de las heridas	49
a) Fase inflamatoria	49
b) Fase proliferativa	53
c) Fase de remodelación tisular	57

2.3.3.2. Factores de crecimiento y principales citocinas	59
2.3.3.3. Tipos de cicatrización	
a) Cicatrización por primera intención	62
b) Cicatrización por segunda intención	62
c) Cicatrización por tercera intención	63
2.3.3.4. Factores que influyen en la cicatrización	64
a) Factores Generales	64
b) Factores Locales	66
CAPITULO III	
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	69
3.1. LUGAR DE ESTUDIO.	69
3.1.1. Estudio Químico	69
3.1.2. Estudio Farmacológico	69
3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA.	70
3.2.1. Población	70
3.2.2. Muestra	70
3.3. TIPO DE ESTUDIO.	70
3.4. UNIDADES DE ESTUDIO.	73
3.4.1. Biológico.	73
3.5. MATERIALES DE LABORATORIO.	71
3.5.1. Estudio Químico	71

a) Materiales de vidrio.	71
b) Otros materiales.	72
c) Reactivos.	72
d) Equipos	73
3.5.2. Estudio farmacológico.	73
a) Materiales	73
b) Equipos	74
3.6. METODOLOGIA.	74
3.6.1. Estudio Químico	74
3.6.1.1. <i>Stevia Rebaudiana</i> Bertoni	74
a) Recolección	74
b) Secado	74
c) Molienda y tamizado	75
3.6.1.2. Análisis Fitoquímico Preliminar.	75
a) Identificación de triterpenos y esteroides	76
b) Identificación de flavonoides	76
c) Identificación de taninos	76
d) Identificación de alcaloides	76
e) Identificación de saponinas	77
3.6.1.3. Elaboración del fitofármaco de aplicación	
tópica	77
3.6.2. Estudio Farmacológico	79

3.6.2.1. Etapas para la determinación del efecto	
cicatrizante	79
a) Distribución de la muestra	79
b) Ambientación o acondicionamiento	79
c) Depilación	80
d) Incisión	81
e) Aplicación del ungüento de <i>Stevia</i>	
<i>rebaudiana</i> Bertoni	81
3.6.2.2. Evaluación macroscópica: Determinación	
del tiempo de cicatrización de las lesiones	
cutáneas provocadas a los ratones	82
3.6.2.3. Evaluación microscópica: Determinación del	
efecto cicatrizante por el método del corte	
histológico	83
CAPITULO IV	
RESULTADOS	86
CAPITULO V	
DISCUSION	106
CONCLUSIONES	113
RECOMENDACIONES	115
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	116
ANEXOS	

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 01	Clasificación Sistemática de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	14
Cuadro N° 02	Componentes químicos de las hojas de la <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	22
Cuadro N° 03	Aminoácidos, vitaminas y ácidos grasos de hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	23
Cuadro N° 04	Principales factores de crecimiento que intervienen en el proceso de reparación del tejido epitelial	60
Cuadro N° 05	Principales citocinas que intervienen en el proceso de reparación del tejido epitelial.	61
Cuadro N° 06	Resultados del Análisis Fitoquímico Preliminar	88
Cuadro N° 07	Evaluación macroscópica durante el proceso de cicatrización en el Grupo N° 01 (Grupo Experimental: Ungüento de Stevia al 8 %)	91
Cuadro N° 08	Evaluación macroscópica durante el proceso de cicatrización en el Grupo N° 02 (Grupo Experimental: Ungüento de Stevia al 10 %)	91
Cuadro N° 09	Evaluación macroscópica durante el proceso de cicatrización en el Grupo N° 03 (Grupo Experimental: Ungüento de Stevia al 12 %)	92

Cuadro N° 10	Evaluación macroscópica durante el proceso de cicatrización en el Grupo N° 04 (Control Negativo: Vaselina + Lanolina)	92
Cuadro N° 11	Evaluación macroscópica durante el proceso de cicatrización en el Grupo N° 05 (Control positivo: Dermaclín®)	93
Cuadro N° 12	Evaluación macroscópica durante el proceso de cicatrización en el Grupo N° 06 (Blanco: Sin tratamiento)	93
Cuadro N° 13	Comparación en los tiempos de cicatrización total de los diferentes grupos de tratamiento	94
Cuadro N° 14	Prueba de Normalidad (Prueba Kolmogorov – Smirnov)	95
Cuadro N° 15	Prueba de Homogeneidad (Test de Levene)	96
Cuadro N° 16	Análisis Anova	97
Cuadro N° 17	Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo al 95 %	98
Cuadro N° 18	Prueba de Tukey: Clasificación de los grupos	100
Cuadro N° 19	Histología de las formulaciones en control experimental, control negativo, control positivo y el blanco a los 20 días de tratamiento	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Gráfico N° 01	Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo al 95 %	99
Gráfico N° 02	Tiempo de cicatrización	101

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo N° 01 *Stevia rebaudiana* Bertoni
- Anexo N° 02 Marcha fitoquímica preliminar
- Anexo N° 03 Estructuras de la piel
- Anexo N° 04 Fases o periodos del proceso de cicatrización de las heridas.
- Anexo N° 05 Tipos de cicatrización
- Anexo N° 06 Procedimiento experimental para la marcha fitoquímica preliminar
- Anexo N° 07 Procedimiento experimental para la elaboración del ungüento a base de *Stevia rebaudiana* Bertoni
- Anexo N° 08 Procedimiento experimental para el estudio farmacológico
- Anexo N° 09 Evaluación macroscópica de los ratones
- Anexo N° 10 Procedimiento experimental para la evaluación microscópica (cortes histológicos)
- Anexo N° 11 Evaluación de los cortes histológicos mediante la coloración de hematoxilina – eosina y tricromico de masson

RESUMEN

OBJETIVO: El objetivo fue determinar el efecto cicatrizante de un fitofármaco tópico a base de las hojas de Stevia en lesiones cutáneas a ratones de experimentación.

MATERIAL Y MÉTODO: Primero se reconoció cualitativamente los metabolitos secundarios de las hojas de Stevia con una marcha fitoquímica. Segundo, se formuló una forma farmacéutica tópica con las hojas de Stevia. Tercero, se intervinieron 36 ratones, estos se dividieron en 6 grupos para aplicar el fitofármaco tópico a base de Stevia al 8%, 10% y 12%; la base del preparado (vaselina + lanolina); un medicamento de marca y un grupo control. Cuarto, se evaluó la acción cicatrizante mediante la técnica macroscópica tomando en cuenta los criterios de cicatrización y la técnica microscópica mediante el estudio histológico con dos tinciones: Hematoxilina-Eosina y Tricromico de Masson.

RESULTADOS: La Prueba de Tukey caracteriza el mejor tiempo de cicatrización para el grupo con Stevia al 10%, siguiendo el grupo con Stevia al 12%; mientras que el grupo con Stevia al 8% presento igual tiempo de cicatrización con el grupo positivo. Además el tratamiento con Vaselina + Lanolina y el grupo sin tratamiento asumirían el mayor tiempo de cicatrización. Los resultados fueron corroborados con el estudio histológico.

CONCLUSIONES: El fitofármaco tópico elaborado con las hojas de Stevia al 10% presenta buena actividad cicatrizante.

PALABRAS CLAVES: *Stevia rebaudiana* Bertoni, Efecto cicatrizante, Estudio histológico.

ABSTRACT

OBJECTIVE: The objective was to determine the effect of a topical healing based Stevia leaves in cutaneous lesions phytodrug experimental mice.

MATERIAL AND METHOD: First qualitatively recognized secondary metabolites from the leaves of Stevia with a phytochemical march. Second, a topical dosage form with leaves of Stevia was formulated. Third, 36 mice were involved, these were divided into 6 groups to apply topical Stevia phytodrug 8%, 10% and 12%; the basis of the preparation (Vaseline + lanolin); a brand and a control group. Fourth, the healing action by macroscopic technique was evaluated taking into account the criteria of healing and microscopic technique by histological study with two stains: hematoxylin-eosin and Masson's trichrome.

RESULTS: The Tukey test characterizes the best healing time for the group with Stevia 10%, following the group with Stevia 12%; while the group with Stevia equal to 8% showed healing time with the positive group. Further treatment with Vaseline + Lanolin and the untreated group would take as much time healing. The results were corroborated by histological study.

CONCLUSIONS: Topical phytodrug made from the leaves of Stevia 10% has good healing activity.

KEYWORDS: *Stevia rebaudiana* Bertoni, healing effect, Histological study.

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 que disponían los antiguos galenos.⁽⁶⁾ En nuestro país el uso de estas plantas 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.⁽⁷⁾

La Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) es un pequeño arbusto dioico que tiene importantes propiedades medicinales: ideal para ayudar a perder peso, ya que reduce la sensación de hambre y facilita la absorción de las grasas, fundamental para los diabéticos, puesto que regula los niveles de glucosa en sangre, pero a la vez existe presunción que los principales componentes de las hojas de Stevia determinan su gran acción terapéutica en la piel lesionada a través de los taninos y flavonoides, que hace que tengan marcada acción cicatrizante, además contiene monoterpenos, diterpenos labdámicos, triterpenos y sesquiterpenos, que confieren un efecto antibacteriano, antiinflamatorio y antiséptico.

En los últimos años se ha observado 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 la aplicación 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.

Existe diversa evidencia sobre plantas que presentan un buen efecto cicatrizante, por este motivo y teniendo en cuenta la información tradicional sobre el uso de las hojas de Stevia como una alternativa curativa para heridas con difícil cicatrización, se decidió realizar la evaluación del efecto cicatrizante de estas hojas para lo cual se propusieron objetivos claros que se dan a conocer más adelante.

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

1.1. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA.

En todos los pueblos existe una biodiversidad de plantas cicatrizantes que aceleran a la recuperación de los tejidos, estas plantas medicinales de origen natural son de fácil acceso, aplicación y manejo, así como de bajo costo. Sin embargo, carecen de estudios científicos que permitan reconocer la eficacia de su acción cicatrizante.⁽³⁾

La Stevia es una de estas plantas medicinales, considerada por los científicos como edulcorante natural que contiene muchos beneficios terapéuticos en el organismo; y por la medicina tradicional como una planta mágica, ya que posee propiedades cicatrizantes, desinfectantes, antioxidantes, antibacterianos y antimicóticos, algo muy útil en medicina científica para tratar las enfermedades de la piel.⁽³⁾ Existe presunción que los principales componentes de las hojas de Stevia que determinan su gran acción terapéutica en la piel lesionada son los taninos y flavonoides, que hace que tengan marcada acción astringente y los monoterpenos, diterpenos labdámicos, triterpenos y sesquiterpenos, confieren un efecto antibacteriano, antiinflamatorio y antiséptico.⁽¹⁵⁾

La escasa información que existe a cerca de las bondades que tiene la Stevia como cicatrizante nos enseña que la aplicación se realiza en forma de emplasto o de infusión, mas lo que se pretende es diseñar un fitofármaco con las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni para su uso tópico.

Por todo lo anterior y teniendo en cuenta la información sobre el uso y componentes de las hojas de Stevia, es que nace el propósito de la presente investigación, que se enfocara en realizar la evaluación de la acción cicatrizante de las hojas de Stevia en un fitofármaco de uso tópico, esto como una alternativa curativa para heridas con difícil cicatrización y a manera de colaborar con la población científica interesada sobre los posibles efectos cicatrizantes que puede tener la Stevia.

1.2. ENUNCIADO DEL PROBLEMA O FORMULACIÓN

1.2.1. Pregunta central:

- ¿Cuál será el efecto cicatrizante de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni contenidos en fitofármaco tópico y aplicados en lesiones cutáneas a ratones de experimentación?

1.2.2. Preguntas secundarias:

- ¿Qué principios activos se encontraran en las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni mediante el análisis fitoquímico cualitativo?
- ¿Cuál será la forma farmacéutica que se diseñara con las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, para su aplicación tópica?
- ¿Cuál será el resultado de la evaluación mediante la técnica macroscópica (criterios de cicatrización) durante el tiempo que dure la cicatrización de las lesiones cutáneas?
- ¿Cuál será el resultado de la acción cicatrizante mediante la evaluación con la técnica microscópica (corte histológico)?
- ¿Qué relación existe entre las tres concentraciones del grupo experimental con el grupo positivo?

1.3. JUSTIFICACION.

Actualmente en el Perú podemos encontrar variedad de plantas con propiedades cicatrizantes que ayudan a la reparación de heridas; sin embargo diversas investigaciones han buscado plantas que ofrezcan una cicatrización estética. La Stevia, edulcorante natural introducido hace años al Perú ha cobrado notoriedad por nuestro país y la región de Tacna, pues posee muchos beneficios terapéuticos que se le atribuye según los estudios científicos, pero a su vez existe una insuficiente información científica sobre la acción cicatrizante que permita lograr su validación y el mejor uso de la planta con el fin de proponer un tratamiento de fácil aplicación y de bajo costo al alcance de la población.

Las enfermedades dermatológicas varían ampliamente con la situación geográfica y probablemente son influenciadas por factores étnicos y ambientales. Además son causa importante de morbilidad, pérdida económica y exclusión social. En los países en desarrollo, las enfermedades dermatológicas constituyen un importante problema de salud pública, principalmente las de causa infecciosa.⁽¹⁷⁾ La *Stevia rebaudiana* Bertoni podría llegar a ser una de las alternativas naturales para tratar las enfermedades dermatológicas frente a una gran variedad de productos farmacéuticos cicatrizantes de origen

sintético elaborados por la industria farmacéutica las cuales pueden lograr a tener un elevado costo y ocasionar efectos secundarios.

En nuestra región se conoce a la Stevia como un edulcorante, mas no como una planta que podría poseer una acción cicatrizante y al no tener un conocimiento científico que valide esta acción nace el gran interés de investigar dicha actividad y aportar un conocimiento a la ciencia y a la población Tacneña una nueva alternativa económica que ayude a una eficiente y rápida cicatrización.

1.4. OBJETIVOS.

1.4.1. Objetivo General.

- Determinar la acción cicatrizante de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni en lesiones cutáneas realizadas a ratones de experimentación.

1.4.2. Objetivos Específicos.

- Determinar los principales principios activos de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni mediante un análisis fitoquímico cualitativo.
- Elaborar una forma farmacéutica a base de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, a diferentes concentraciones, para la aplicación tópica.
- Evaluar la acción cicatrización de las lesiones cutáneas mediante la técnica macroscópica (criterios de cicatrización).
- Evaluar la acción cicatrizante de las lesiones cutáneas mediante la técnica microscópica (corte histológico).
- Comparar la acción cicatrizante para las tres concentraciones del control experimental en comparación con el control positivo.

1.5. HIPOTESIS.

Las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni tiene la propiedad de acelerar el proceso de la cicatrización de lesiones cutáneas producidas en ratones.

1.6. DETERMINACIÓN DE VARIABLES.

1.6.1. Variable Independiente.

Grado de lesiones cutáneas en la piel.

1.6.2. Variable Dependiente.

Hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

1.7. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES E INDICADORES.

VARIABLE	DIMENSIÓN	INDICADORES
<p>Independiente</p> <p><i>Lesiones cutáneas en la piel</i></p>	Grado de lesión	<p>Macroscópico:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sangrado y cambio de color - Agregación y degranulación - Formación de costra - Retracción de la costra - Exfoliación de todo el perímetro de la costra - Desprendimiento de la costra <p>Microscópico:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estudio del corte histológico
<p>Dependientes</p> <p><i>Ungüento de Stevia al 8 %</i></p> <p><i>Ungüento de Stevia al 10 %</i></p> <p><i>Ungüento de Stevia al 12 %</i></p>	<p>Tiempo de aplicación</p> <p>Tiempo de aplicación</p> <p>Tiempo de aplicación</p>	<p>Desprendimiento</p> <p>Desprendimiento</p> <p>Desprendimiento</p>

Fuente: Elaboración propia

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES.

En el Perú no existen antecedentes relacionados con el efecto cicatrizante de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, sin embargo revisando en la literatura se encontró que en la India realizaron un trabajo de investigación relacionado con el efecto cicatrizante; el autor de la investigación es Kuntal Das quien en su estudio: “*Wound healing potential of aqueous crude extract of Stevia rebaudiana in mice*” (Potencial de curación de heridas del extracto crudo acuoso de *Stevia rebaudiana* en ratones), evaluó el efecto del extracto de hojas de Stevia en la curación de heridas. Para ello administró por vía oral en dosis graduadas de 150, 250 y 500 mg/kg de peso corporal, evaluando el potencial de cicatrización de la herida durante catorce días y por vía tópica en el modelo de herida durante diez días, respectivamente; comparó los resultados con el uso de yodo-povidona (un antiséptico comercial) y observo que a los quince días las heridas tratadas con Stevia disminuyeron significativamente en comparación con las tratadas con yodo-povidona, además el efecto cicatrizante aumentó proporcionalmente a la concentración de Stevia suministrada.⁽⁴⁾

Existe muchos estudios sobre la acción terapéutica mas no sobre la acción cicatrizante de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, esto nos permite que se abran nuevos horizontes que es de interés para la humanidad.

2.2. *Stevia rebaudiana* Bertoni.

2.2.1. Generalidades.

El Ka'a He'ê, (hierva dulce) conocida como *Stevia rebaudiana* Bertoni, es una especie nativa de la Zona Norte de la Región Oriental del Paraguay y es utilizada durante siglos por los nativos guaraníes de Paraguay como edulcorante natural para sus comidas y bebidas. La Stevia debe su nombre al botánico y médico español Pedro Jaime Esteve, quien fue su descubridor, el naturalista suizo Moisés Santiago Bertoni fue el primero en describir la especie científicamente; posteriormente, el químico paraguayo Ovidio Rebaudi publicó en 1900 el primer análisis químico de la planta, descubriendo mediante este análisis un glucósido edulcorante capaz de endulzar más veces que el azúcar refinado, pero sin los efectos contraproducentes que ésta produce en el organismo humano.⁽⁸⁾

En forma de hoja molida es entre 20 y 35 veces más dulce que el azúcar. El líquido claro y transparente obtenido por

disolución de los esteviósidos es 40 veces más dulce que el azúcar. El líquido concentrado negro verdoso obtenido por cocción es 70 veces más dulce que el azúcar. El polvo blanco o esteviósido es superior a 300 veces el dulzor del azúcar.⁽⁸⁾

Existen más de 300 variedades de Stevia en la selva Paraguayo-Brasileña, pero la *Stevia rebaudiana* Bertoni es la única con propiedades endulzantes gracias a su principio activo, denominado “esteviósido” en el año 1921 por la Unión Internacional de Química.⁽⁹⁾ En cuanto a la Stevia rebaudiana, se cuenta con más de 144 variedades aproximadamente a nivel mundial, destacando a Morita dos por su mayor rendimiento de hoja seca y mejor contenido químico que otras variedades,⁽¹⁰⁾ no obstante para la presente investigación se tomará en cuenta únicamente la variedad nativa de *Stevia rebaudiana* Bertoni, como se observa en el Anexo N° 01, la cual no ha sido modificada genéticamente y por lo tanto cuenta con todas sus propiedades naturales.

CUADRO N° 01

Clasificación Sistemática de *Stevia rebaudiana* Bertoni

Reino	Vegetal
Subreino	Tracheobionta (plantas vasculares)
División	Magnoliophyta (fanerógama angiosperma)
Subdivisión	Spermatophyta (plantas de la semilla)
Clase	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
Subclase	Asteridae
Serie	Multiaristae
Tribu	Eupatorieas
Orden	Campanulares (asterales)
Familia	Compuestas (Asteraceae de Monochlamydeae, comositaseas)
Género	Stevia
Especie	rebaudiana Bertoni
Nombre científico	<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni ó Eupatorium rabadianum Bertoni ó Rebaudianum de Eupatorium
Nombre común	Hierba dulce

Fuente: La hierba dulce. Elaborado: T. Martinez P.⁽⁸⁾

2.2.2. Origen y distribución geográfica.

La *Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta originaria del Sudeste de Paraguay, de la parte selvática subtropical de Alto Paraná. Por siglos las tribus Guaraníes de Paraguay y Brasil usaron diferentes especies de *Stevia* y, principalmente, *Stevia rebaudiana*; ellos la llamaron ka'a he'ê o yerba dulce.

Los principales productores de Stevia a nivel mundial son Japón, China, Corea, Taiwán, Tailandia, Indonesia, Laos, Malasia y Filipinas; todos estos países representan el 95 % de la producción mundial. Cabe destacar que Japón es el país con mayor cantidad de fábricas procesadoras y extractoras de esteviósido. En América es cultivada principalmente en Paraguay, Brasil, Argentina, Colombia, Perú y cultivos muy pequeños en Ecuador.⁽¹⁰⁾

Origen de la *Stevia rebaudiana* Bertoni en el Perú.

Esta planta fue introducida al Perú hace una década y actualmente se ha incorporado en el portafolio de cultivos en pequeñas extensiones en Cajamarca, Amazonas, San Martín Ucayali y Apurímac de manera orgánica.⁽¹¹⁾

En el 2010, la comunidad de Palestina Baja, del distrito de Kimbiri; provincia de La Convención en Cusco, cultiva *Stevia rebaudiana* Bertoni de manera tradicional.⁽¹²⁾

Actualmente, en nuestro país existen tres empresas peruanas que la producen: Stevia Coronel SAC, Stevia Perú SAC y Steviaperú; estas producen las variedades criollas de Paraguay, China y Japón.⁽¹³⁾

La *Stevia rebaudiana* Bertoni no se presenta como un cultivo que desplace a cultivos tradicionales como el café, maíz, etc., sino como un rubro complementario en la diversificación productiva y una alternativa económica para el minifundio permitiendo un ingreso adicional a los agricultores.⁽¹¹⁾

2.2.3. Condiciones del hábitat natural donde la especie ha sido cultivada exitosamente.

a) Variables climáticas: La *Stevia rebaudiana* Bertoni en su estado natural, crece en la región subtropical, semihúmeda de América, con precipitaciones que oscilan entre 1,400 a 1,800 mm., distribuidos durante todo el año, temperaturas que van desde los 24 a 28° C y humedad relativa de 75 % a 85 %. Esta planta requiere días largos y alta intensidad solar (heliofanía).⁽¹⁰⁾

b) Variables edáficas: Los suelos óptimos para el cultivo de la *Stevia rebaudiana* Bertoni, son aquellos con pH 6,5 - 7, de baja o nula salinidad, con mediano contenido de materia orgánica, de textura franco arenosa a franco, y con buena permeabilidad y drenaje. Esta planta no tolera suelos con exceso de humedad ni los de alto contenido de materia

orgánica, principalmente por problemas fúngicos que pueden causar grandes pérdidas económicas.⁽¹⁰⁾

c) Variables topográficas: Se produce naturalmente en las regiones subtropicales hasta 700 m.s.n.m de altitud. En los trópicos se puede cultivar en altitudes de hasta 1,500 m.s.n.m.⁽¹⁴⁾

2.2.4. Descripción botánica.

La *Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta con tallo anual, subleñosa, levemente pilosa en las extremidades, se ramifica formando múltiples brotes con tendencia a inclinarse.⁽⁸⁾

La *Stevia rebaudiana* Bertoni presenta la siguiente morfología:

a) Raíces: Tiene un rizoma vigoroso y un sistema radicular superficial.⁽¹⁴⁾ La raíz es perenne, fibrosa, filiforme y abundante formando cepa.⁽⁸⁾

b) Tallos: Son semi-leñosos, pero débiles.⁽¹⁴⁾

c) Hojas: Sus hojas, de color verde brillante, son elípticas y dentadas, de tamaño variable, entre 3 y 5 cm de largo y de 1,5 a 2 cm de ancho.⁽³⁾

d) Flores: Son pequeñas, perfectas y blancas, nacen en pequeños corimbos de dos a seis flores.⁽¹⁴⁾ Las flores de lóbulos blancos se hallan dispuestas en pequeños capítulos

terminales o axilares, agrupados en panículas corimbosas sueltas.⁽⁸⁾

e) Frutos: El fruto es típico de la familia de las compuestas: aquenio delgado y plumoso en el extremo.⁽⁸⁾

f) Semillas: Las semillas son pequeñas y el peso de mil semillas de *Stevia* oscila por lo general entre 0,15 - 0,30 g.⁽¹⁴⁾

2.2.5. Estructura de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni encierran glucósidos cuyo poder endulzante, una vez purificados, se sitúa entre 250 y 300 veces su equivalente en azúcar. Es demostrado que estos compuestos son sintetizados en los cloroplastos, en cambio, el modo en el que la síntesis interviene no es conocido con precisión.⁽¹⁶⁾

Dentro de los elementos nutricionales que normalmente exige la hoja, el potasio (K) ocupa el primer lugar, porque cumple una función muy importante, favoreciendo el rendimiento de hoja seca. No necesita muchos fertilizantes ya que en exceso favorecen el crecimiento de las hojas pero no su poder endulzante.⁽⁹⁾

2.2.6. Recolección de la *Stevia rebaudiana* Bertoni.

a) **Cosecha:** Se realiza cuando presente como máximo un 5 % de botones florales, haciendo un corte entre los 6 y 8 cm del suelo para que permanezcan en la planta de dos a tres pares de hojas. El mayor rendimiento del cultivo se presenta en los tres primeros años y, si las condiciones ambientales y de mercado son favorables, se realiza hasta cuatro cosechas al año; conforme pasa este tiempo conviene que sean dos.⁽¹⁰⁾

Las ramas frescas recién cosechadas deberán recogerse en canastas plásticas, sin presionarse ni agitarse, nunca ensacar.⁽¹⁶⁾

b) **Secado:** De esta labor depende la calidad producto final; las hojas deben secarse hasta el punto de facilitar su manipulación. En el proceso de secado debe evitarse la exposición directa al sol, ya que esta situación puede alterar las propiedades químicas de las hojas; si las condiciones de intensidad solar son bajas y la humedad relativa es alta, se hace necesaria la construcción de galpones rústicos de secado o un secadero artificial, con un sistema de ventilación y de calentamiento, lo que ayudará tener un

secado uniforme; este último método es el más recomendable.⁽¹⁰⁾

c) Almacenamiento: El envasado de las hojas secas seleccionadas de Stevia, debe realizarse en un ambiente totalmente limpio, procediendo de la siguiente manera: ⁽¹⁹⁾

- Raspar las ramas previamente secas y de esta forma caen fácilmente la mayor parte de ellas, si se ha hecho un buen secado. Con la mano, retirar las hojas que queden adheridas a las ramas, si es necesario. ⁽¹⁹⁾
- Luego prensar la hoja para armar pacas de aproximadamente 50 x 50 x 50 cm. Con un máximo de 50 kilogramos de peso.
- Finalmente envolver las pacas en papel, preferiblemente parafinado, para evitar el intercambio de humedad y sellar las pacas con cinta adhesiva. ⁽¹⁹⁾

2.2.7. Composición química de la *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Los principales componentes de las hojas de Stevia son: triterpenos, monoterpenos, esteroides, taninos, flavonoides, diterpenos labdámicos, sesquiterpenos y aceites volátiles;⁽³⁾ además de fitonutrientes como magnesio, manganeso, fosforo,

potasio, proteína, sodio, aluminio, ácido ascórbico, beta caroteno, calcio, hierro.⁽¹⁶⁾

Los compuestos más representados han sido denominados en la literatura científica como: Esteviósido (más abundante); Rebaudiósido A y E (menos abundantes pero más endulzantes que el esteviósido, y el rebaudiósido A es el más abundante de rebaudiósido), Dulcosido A.⁽¹⁶⁾

A continuación se menciona un compendio de los componentes químicos que contiene la *Stevia rebaudiana* Bertoni.

CUADRO N° 02

Componentes químicos de las hojas de la *Stevia rebaudiana* Bertoni

Compound class	Constituent	% (w/w) Yield
<i>Diterpenoid</i> <i>ent</i> -Kaurene	Dulcoside A	0.03
	Rebaudioside A	1.43
	Rebaudioside B	0.44
	Rebaudioside C (= dulcoside B)	0.4
	Rebaudioside D	0.03
	Rebaudioside E	0.03
	Steviolbioside	0.04
	Stevioside	2.18
Labdane	Austroinulin	0.06
	6- <i>O</i> -Acetylaustroinulin	0.15
	Jhanol	0.006
	Sterebin A	0.001
	Sterebin B	0.0009
	Sterebin C	0.0003
	Sterebin D	0.0004
	Sterebin E	0.002
	Sterebin F	0.003
	Sterebin G	0.0002
Flavonoid	Sterebin H	0.0002
	Apigenin 4'- <i>O</i> -glucoside	0.01
	Kaempferol 3- <i>O</i> -rhamnoside	0.008
	Luteolin 7- <i>O</i> -glucoside	0.009
Sterol	5,7,3'-Trihydroxy 3,6,4'-trimethoxyflavone	0.01
	Stigmasterol	Trace
Triterpenoid	Stigmasterol β - <i>D</i> - glucoside	Trace
	β - Amyrin acetate	Trace
	Lupeol	Trace
Other organic components	Lupeol esters	Trace
	Chlorophyll A	0.00041
	Chlorophyll A	0.00027
	Carotenoids	0.00007
	Total pigments	0.00075
	Tannins	7.8

Fuente: Stevioside: Technology, Applications and Health. Sirshendu De, Sourav Mondal y Suvrajit Banerjee.⁽¹⁹⁾

CUADRO N° 03

Aminoácidos, vitaminas y ácidos grasos de hojas de *Stevia*

rebaudiana Bertoni

Amino acids			
Essential amino acids		Non-essential amino acids	
Amino acid	Amount % (w/w)	Amino acid	Amount % (w/w)
Arginin	0.45	Aspartate	0.37
Lysine	0.7	Serine	0.46
Histidine	1.13	Glutamic	0.43
Phenylalanine	0.77	Proline	0.17
Leucine	0.98	Glycine	0.25
Methionine	1.45	Alanine	0.56
Valine	0.64	Cystine	0.4
Therionine	1.13	Tyrosine	1.08
Isolucine	0.42		
Minerals		Fatty acids composition	
Element	Mineral content (mg/g)	Fatty acids	Amount (% w/w)
Potassium	0.211	Palmitic acid (C16)	0.2751
Calcium	0.177	Palmitoleic acid (C16-1)	0.0127
Sodium	0.149	Stearic acid (C18)	0.0118
Magnesium	0.032	Oleic acid (C18-1)	0.0436
Manganese	0.029	Linoleic acid (C18-2)	0.124
Iron	0.059	Linolenic acid (C18-3)	0.2159
Zinc	0.013		
Water-soluble vitamins			
Vitamin	Content (mg/g)		
Vitamin C	0.15		
Vitamin B2	0.0043		
Vitamin B6	0.0		
Folic acid	0.522		
Niacin	0.0		
Thiamin	0.0		

Fuente: Stevioside: Technology, Applications and Health. Sirshendu De, Sourav Mondal y Suvrajit Banerjee.⁽¹⁹⁾

2.2.8. Propiedades de la *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Se enumera las propiedades que se atribuyen a esta planta unas basadas en serios estudios científicos, otras basadas en la tradición y la experiencia:

Propiedades basadas en estudios científicos.^(8,20)

- En estudios recientes se ha demostrado que dificulta el crecimiento y reproducción de algunas bacterias responsables de las caries.

En EE.UU., desde 1,990, se han hecho al menos tres estudios universitarios en este sentido sobre el esteviósido.

En estos estudios se ha tratado de la compatibilidad de esteviósido con el fluoruro, de las propiedades del esteviósido para inhibir el crecimiento de la placa dental, y en relación con la reducción de la caries, habiendo dado todos ellos resultados favorables para la salud bucal.

- El trabajo de tesis doctoral del Dr. Carlos A. Oviedo Idoyoga “Efecto del kaá-heé sobre la glucemia”, dejó demostrado su poder hipoglucemiante. El hecho de ser un edulcorante de origen vegetal sin calorías y sin efectos secundarios coloca a esta planta como sustituto de los edulcorantes sintéticos que si tienen efectos secundarios cuando se consumen en grandes cantidades.

- En el VI Congreso de Farmacología, celebrado en Buenos Aires en 1976, también se presentaron dos trabajos relativos a los efectos sobre el control de la obesidad y sobre su acción en el control del ritmo cardiaco.
- Es un hipotensor suave que baja la presión arterial cuando está demasiado alta. Tiene efecto vasodilatador, diurético y cardiotónico (regula la presión y los latidos del corazón). Estudios demostraron que una sola dosis de extracto líquido produjo una disminución del 9.5 % de la presión arterial sistólica, actividad que podría fortalecer el corazón y el sistema cardiovascular. Otros estudios permitieron descubrir que el uso de Stevia durante 30 días, daba como resultado la disminución de la presión sistólica.
- Es un diurético de acción leve y mejora las funciones gastrointestinales.
- Reduce la ansiedad por la comida y, así, el cuerpo almacena menos grasas.
- La Stevia disminuye también el deseo por tomar dulces y grasas, que suele desembocar en el aumento de peso corporal y está relacionado con la ansiedad.
- Colabora en la desintoxicación del organismo a causa del tabaco y el alcohol. Para aprovechar este beneficio, se

puede preparar un té que reduce el deseo hacia estos dos tóxicos.

- Previene e inhibe la reproducción de bacterias y organismos infecciosos y mejorar la resistencia frente a resfríos y gripes. Los estudios que se realizaron para comprobar su actividad antibiótica demostraron su capacidad de combatir la bacterias *Escherichia coli*, *Stafilococcus aureus*, y *Corynebacterium difteriae*, así como también su poder contra el hongo *Cándida albicans* productor frecuente de vaginitis en la mujer.
- Es adecuada para bajar el nivel el nivel de acidez de la sangre y de la orina, y para problemas de acidez de estómago. Análisis de laboratorio han demostrado, que la Stevia es extraordinariamente rica en hierro, manganeso y cobalto. No contiene cafeína y posee efectos antioxidantes comparables al conocido té verde.
- La Stevia natural, sin refinar, contiene más de 100 fitonutrientes y aceites volátiles identificados. Esto era bien conocido por los nativos guaraníes que, desde los tiempos pre-colombinos, la usaban para endulzar sus medicamentos y bebidas o simplemente masticaban sus hojas para disfrutar el dulce sabor.

- Diversas investigaciones realizadas en referencia al excesivo consumo de azúcar refinada en los niños, asocian éste a problemas de hiperactividad, cambios repentinos de humor, problemas de conducta e irritabilidad, además de los conocidos problemas dentales. El uso de la hierba dulce ayudaría a bajar los niveles de azúcar refinada.

Propiedades populares.⁽⁸⁾

Otras aplicaciones tradicionales (sobre todo en América Latina) incluyen las siguientes:

- Contrarresta la fatiga, facilita la digestión y las funciones gastrointestinales, regula los niveles de glucosa en la sangre, nutre el hígado, el páncreas y el bazo.
- En aplicaciones externas se usa para el tratamiento de la piel con manchas y granos. En EE.UU. se ha estado vendiendo en forma de jarabe como una buena loción para el tratamiento de la piel, para la que es muy recomendable. La experiencia ha demostrado que se puede utilizar como loción para el rostro, logrando suavizar la piel y combatir las arrugas. Igualmente hace que los cortes en la piel cicatricen rápidamente.

2.2.9. Otras propiedades.⁽³⁾

Otras disciplinas conocedoras desde hace siglos incluyen los siguientes:

- En agricultura, la Stevia se emplea como activador de cultivos, ya que ayuda a obtener frutos más grandes y más dulces, y para mejorar la calidad del césped en jardinería o en campos de golf. Asimismo, los residuos de Stevia fermentada se usan para recuperar terrenos afectados por el abuso de productos químicos, estériles o con dioxinas y se logra una notable recuperación en pocos años.
- El mundo de la cosmética emplea la Stevia para elaborar cremas y productos para el cuerpo, como jabones y lociones. Las cremas elaboradas a base de extracto de Stevia son rejuvenecedoras y antiaging. Es un excelente desinfectante y antioxidante, y elimina las bacterias y los hongos, algo muy útil en medicina para tratar las enfermedades de la piel.
- La Stevia también es beneficiosa para los animales, ya sean mascotas, animales de granja o caballos de carreras.

2.2.10. Estudio fitoquímico.⁽²¹⁾

El estudio fitoquímico tiene como finalidad aislar e identificar los diferentes tipos de compuestos que biosintetiza

la planta (los que podrán tener o no alguna actividad o toxicidad), y recibe el nombre de *screening fitoquímico*, *tamizaje fitoquímico*, *marcha fitoquímica* o *estudio fitoquímico sistemático*.

El estudio basado en una marcha fitoquímica consiste en efectuar una extracción (del material previamente colectado, secado y molido) que permita obtener la mayor parte de los constituyentes químicos (extracto total o crudo o bruto). Por ello se debe utilizar un solvente universal que solubilice (y cosolubilice) la mayoría de los compuestos, siendo los más utilizados el metanol y el etanol. Posteriormente el extracto total se fracciona mediante un cambio de pH y partición con solvente de menor polaridad (generalmente cloroformo), obteniéndose una serie de fracciones sobre las que se realizan ensayos que permitirán obtener datos sobre los grupos fitoquímicos presentes.

En el Anexo N° 02 se representa un esquema para la detección de alcaloides, saponinas, taninos, flavonoides entre otros.

2.3. HERIDAS Y CICATRIZACIÓN.

2.3.1. La piel: Generalidades.

La piel es el órgano más grande del cuerpo sin la cual la vida es imposible, combinado con sus estructuras accesorias como pelos, glándulas, etc., ocupa el 20 % del peso del cuerpo. Su principal función es protegerlo del ambiente ya que constituye una barrera protectora contra microorganismos, rayos ultra violeta, pérdida de fluidos, estrés de fuerzas mecánicas y al mismo tiempo sirve como principal órgano sensitivo o de comunicación hacia el exterior, ya que recoge información a través de una extensa red de neuronas y terminales nerviosas que aportan información sobre presión, vibración, dolor y temperatura; con ello los peligros externos se detectan y pueden emprenderse acciones para evitarlos y minimizarlos.⁽²²⁾

2.3.1.1. Estructura de la piel.

La piel está constituida por tres capas:

- a) Epidermis:** La epidermis es una capa celular, sin nervios, sentada en una membrana basal y muestra estratificación vertical. Es un epitelio versátil cuyas células se multiplican, diferencian y

renuevan cada 28 días. Está formada por melanocitos no pigmentados, linfocitos, células de Langerhans que funcionan como células dendríticas e inmunes, de Merkel que actúan como receptores del tacto y como principal célula de ésta capa los queratinocitos.⁽²³⁾

Los queratinocitos productores de queratina, están en diversos estadios de maduración conformando cinco estratos: estrato germinativo donde hay células en constante división que remplazan a las superficiales; estrato espinoso con queratinocitos recién divididos con espinas proyectadas; estrato granuloso, por su aspecto granular ya que están comenzando un proceso de transformación gradual cambiando células redondas y nucleadas en escamas planas y ricas en queratina; estrato lúcido, capa clara de células conteniendo eleidina que se convierte en queratina en células muertas las cuales se mueven al último estrato más superficial que recubre el cuerpo denominado estrato córneo. Las funciones de la epidermis son la impermeabilidad

relativa que provee protección contra daño del medio ambiente y contra daños mecánicos como traumatismos (Anexo N° 03).^(22,23)

b) Dermis: La dermis es un tejido eminentemente fibroso, donde se encuentran los anexos cutáneos como los folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas. Es una capa de tejido conectivo irregular, contiene proteínas dérmicas como fibras de colágeno, elastina, reticulita, fibronectina así como varios Glicosaminoglicanos y ácido hialurónico que conforman la matriz; estas proteínas y carbohidratos son secretadas por la célula principal de la dermis, los fibroblastos. La elastina le aporta elasticidad, la colágena su fuerza de tensión y la matriz provee un medio semi-líquido, que permite la orientación del tejido conectivo y las células, la difusión de los nutrientes y O₂. Así mismo es el segundo andamio para la migración celular, de nutrientes y de requerimientos para la reparación de heridas. Sus funciones son protectoras e inmunológicas, es la segunda línea de defensa mecánica contra

traumatismos, es el sostén de la piel y es fundamental para la termorregulación y lubricación (Anexo N° 03).^(22,23)

c) Hipodermis o Tejido Subcutáneo: Bajo la dermis se encuentra el tejido hipodérmico, es una capa de sostén o tejido graso subcutáneo que conecta todo lo que está sobre y bajo la dermis con el músculo. Contiene macrófagos, fibroblastos y células cebadas, así como nervios, vasos linfáticos y sanguíneos que irrigan la piel (Anexo N° 03).⁽²²⁾

d) Anexos cutáneos: Los anexos cutáneos forman parte del tegumento y su mayor volumen se encuentra alojado dentro de la dermis y tejido celular subcutáneo. Atraviesan prácticamente todo el espesor de la piel y eliminan el producto de su actividad celular hacia el exterior a través de la epidermis. Son los siguientes elementos: Pelo, glándula sudorípara apocrina (axila, areola de la glándula mamaria, región pubiana y conducto auditivo externo), glándula sebácea, glándula

sudorípara ecrina (presente en todo el cuerpo) y uñas (Anexo N° 03).⁽²⁴⁾

2.3.1.2. Funciones de la piel.⁽²⁴⁾

- **Social:** Nos informa si nos vemos sanos, enfermos acalorados, define nuestra edad, etc.
- **Fisiológico:** Permite darle la forma a nuestro cuerpo y evita la pérdida de fluidos.
- **Protección:** Este gran manto nos mantiene aislado del medio ambiente exterior, es decir, de los microorganismos, la polución y traumatismos.
- **Producción de proteínas y vitaminas:** La piel produce proteínas que reparan y reemplazan a las proteínas mas antiguas que se destruyen. También en la piel y gracias a la radiación solar se produce a vitamina D₃, vital en el proceso de fijación de calcio en los huesos.

2.3.2. Herida: Conceptos Básicos.

- Es el área donde queda interrumpida la continuidad anatómica celular entendiéndose por una solución de

continuidad las cubiertas externas del cuerpo, de revestimiento mucoso o de la superficie de los órganos.⁽²⁶⁾

- Una herida se puede definir como una interrupción de estructuras anatómicas y funcionales normales a consecuencia de un trauma.⁽²⁷⁾ Existen dos tipos:

Herida aguda: Herida que sigue un proceso de reparación ordenado que restaura la integridad anatómica y funcional. Cicatrizan generalmente en 1 – 2 semanas.⁽²⁸⁾

Herida crónica: Heridas que siguen un proceso de reparación que no restaura la integridad anatómica y funcional.⁽²⁹⁾ La causa es multifactorial. Persisten por meses o años.⁽²⁸⁾

2.3.2.1. Mecanismo.^(30,31)

El agente causante podrá actuar por:

a) Fricción: Cuando el agente etiológico posee un borde cortante, el deslizamiento de este sobre la superficie cutánea provocará una solución de continuidad con penetración fácil en los tejidos.

b) Percusión: Para que se produzcan las heridas deben tenerse en cuenta: el plano de resistencia, la fuerza viva, la naturaleza del agente causante.

- c) Compresión:** Los tejidos son sometidos a una presión continua que puede durar pocos minutos u horas. Ejemplo de compresión rápida: La presión de un miembro inferior por la ruedas de un carro en movimiento. Ejemplo de compresión prolongada: La caída de una columna de cemento sobre el miembro superior.
- d) Tracción:** El agente traumático actúa arrancado un área de tejidos orgánicos. Ejemplo: La aprehensión de los cabellos por la polea de una máquina.

2.3.2.2. Clasificación de Heridas.^(32,33 y 31)

- a) Heridas incisas:** Una incisión (corte) suele producirse por un elemento cortante. En ellas predomina la longitud sobre las otras dimensiones; posee bordes limpios, lisos y suelen sangrar mucho, estas lesiones pueden afectar las tres capas de piel y más.
- b) Heridas contusas:** Producidas por objetos de superficie roma, poseen bordes contundidos y aplastados. Tienen como característica la

irregularidad de sus bordes, la piel puede estar magullada y desflecada, de aspecto equimótico, habiendo pérdida de calor. En general son contaminadas y requieren tratamiento cuidadoso.

c) Heridas punzantes: Una punción es producida por un elemento que se clava en la piel, pudiendo salir o no de la misma. Son producidas por objetos alargados y puntiagudos. Es bastante probable que se lesionen las estructuras internas si la lesión fue muy profunda.

d) Heridas por arrancamiento: Son producidas por tracción violenta sobre tejidos; son irregulares y con bordes despegados.

e) Heridas por mordedura: Son producidas por a dentadura de una persona o animal, de especial importancia por el riesgo de infección que conlleva y la convierte en heridas potencialmente muy peligrosas.

f) Heridas por arma de fuego: El orificio de entrada es menor que el de salida; es irregular y de bordes revertidos.

g) Heridas abrasivas: Una abrasión (raspón) es producida por una fricción con superficies ásperas donde se lesiona la epidermis y parte de la dermis. El sangrado de estas lesiones es característico y se denomina “afrutillado” (sangrado capilar).

2.3.2.3. Profundidad de la herida.^(34,35)

La dermis estará intacta si, al examinar una herida, se puede identificar las marcas normales de la piel como las huellas dactilares. Una lesión que afecte parcialmente el grosor de la piel mostrará una dermis rosada y uniformemente pálida. La lesión dérmica más profunda mostrara islotes de grasa amarillenta que penetrarán en la trama dérmica. En heridas de profundidad total, se verán áreas continuas de glóbulos de grasa sin dermis subyacente. El sangrado de una herida superficial se produce a partir de múltiples bocas puntiformes.

En las heridas dérmicas más profundas, se ven puntos de sangrado de mayor tamaño y más separado. Las heridas de profundidad total y

penetrante pueden mostrar un sangrado arterial pulsátil o un sangrado continuo de origen venoso.

2.3.2.4. Estudio clínico.

La primera medida será valorar la gravedad de la lesión y sus potenciales complicaciones, así como las posibles lesiones asociadas (vascular, ósea, tendinosa o nerviosa).⁽³³⁾ El examen clínico de una herida reciente revelará cuatro elementos fundamentales:⁽³¹⁾

- *Dolor*: Tiene como causas el traumatismo y la exposición de las terminaciones sensitivas al aire.
- *Solución de continuidad*: La solución de continuidad de la piel podrá ser lineal, curvilínea, estrellada, superficial o profunda, ancha o estrecha.
- *Hemorragia*: El sangrado de la herida a través de sus bordes está en función de la lesión vascular producida y el tipo de herida, siendo que las incisivas sangran más que las contusas. En las incisivas los vasos son seccionados, en las contusas se

produce la compresión y laceración por el agente vulnerante.

- *Separación de sus bordes:* Está depende principalmente de la elasticidad de los tejidos afectados por la solución de continuidad.

Características de la herida.⁽³⁰⁾

La inspección de la herida se hará con buena iluminación y con las mayores medidas de asepsia posibles:

- Hemorragia, localización, forma, extensión y longitud de la herida.
- Bordes de la herida, limpios o contusos.
- Profundidad, a que estructuras afectan.
- Grado de suciedad, cuerpos extraños.
- Grado de contaminación, por el tipo del agente traumático y el tiempo transcurrido desde la lesión hasta el tratamiento.

El límite de tiempo para realizar una sutura primaria es de 6 horas. Un tiempo superior a 6 horas obliga a cicatrización por segunda intención, salvo en zonas muy vascularizadas como cara y

cuero cabelludo en que se puede retrasar hasta 12 ó 24 horas.

2.3.2.5. Estudio Histológico.

a) Histología Conjuntiva:⁽⁵²⁾ El tejido conjuntivo o conectivo, es conocido también como “tejido de sostén”, porque soporta y relaciona a otros tejidos, estructuras y órganos. Es el “esqueleto” del organismo.

El tejido conjuntivo está constituido por células como fibroblastos, adipocito, pericito, macrófagos, neutrófilos, entre otros y la matriz extracelular que contiene una sustancia “amorfa”, básica o fundamental y fibras.

b) Técnica Histológica:^(53,54) Estas técnicas tienen como fin conservar la relación estructural entre los diferentes tipos celulares y su medio, y al mismo tiempo realizar cortes muy finos de los tejidos, que permitan su análisis microscópico. Estos cortes deben permitir el paso de luz, y evitar la superposición visual de sus componentes.

Dado que el grosor de un corte a veces es menor que el diámetro de muchas células, lo que vuelve al tejido extraordinariamente frágil, es necesario adherirlo a una lámina de vidrio para manipularlo con facilidad.

El producto final, es decir, la preparación montada se conoce como **corte histológico**, y suele conferírsele una coloración para el estudio de las células.

2.3.2.6. Tratamientos. ^(36,24,37 y 38)

El manejo inicial de las heridas está dirigido a prevenir la infección, por ejemplo, lavando la herida con un antiséptico y cubriendo la herida con un vendaje seco que no contenga bacterias. Desde que la biología de la curación de heridas se conoce mejor, se han desarrollado muchas estrategias para intentar manipular el proceso curativo de las heridas. Estos van desde la reciente tecnología para vendajes (por ejemplo los alginatos, espumas, hidrocoloides, hidrogeles, vendas de colágeno y los productos de reposición de la piel) hasta el uso de técnicas más

complejas y experimentales (por ejemplo agentes farmacológicos, factores de crecimiento tópicos, láseres, oxígeno hiperbáricos y estímulos eléctricos).

Ante una herida que desde el primer momento decidimos derivar a un centro quirúrgico, hemos de tomar las siguientes medidas: cohibir la hemorragia, lavar la herida con suero salino fisiológico, colocar un apósito estéril, elevar e inmovilizar la zona afectada, iniciar antibioterapia.⁽³³⁾

Opciones actuales de tratamiento.^(39,40)

a) Si la herida es aguda:

- Sutura: Costura de los bordes de una herida con hilo, cuando es leve.
- Adhesivos tópicos: Se ha popularizado cerrar los tejidos con estos productos, entre ellos el 2 octil-cianoacrilato; líquido que al juntar los bordes de la herida, los conserva unidos mientras cicatrizan.
- Vendoteles: Cintas parecidas a las adhesivas, pero más delgadas y con igual resistencia, que no irritan la piel.

- Películas de poliuretano: Cintas transparentes con adhesivo, que ayudan a mantener los bordes de las heridas juntos y posibilitan verlas más estrechamente; son hipoalergénicas e impermeables al agua y las bacterias; permiten que salga el dióxido de carbono y favorecen la penetración del oxígeno.

b) Si la herida es crónica:

- Apósitos o gasas: Impregnados de medicamentos, pueden permanecer en la herida por más de 24 horas e incluso contener carbón activado y plata, en caso de heridas infectadas; otros son de arginato de calcio, cuyas fibras se hinchan al contacto con la sangre o la secreción de la herida y originan un material gelatinoso que atrapa bacterias y resto celulares.
- Parches: Su función es favorecer la cicatrización desde el fondo hasta la superficie y de los bordes de la herida hacia el centro, con ayuda de hidrogeles, hidrocoloides e hidropolímeros, conocidos agentes medicinales

que permiten mantener la zona bien hidratada, sin necesidad de limpieza diaria ni molestias.

- Aplicación de piel cultivada, sintética, animal o humana: Se utiliza en diferentes padecimientos, tales como quemaduras y úlceras venosas y diabéticas; sin embargo, todavía se encuentran en fase de investigación clínica, por sus posibles efectos secundarios a largo plazo.
- Luz polarizada: Procedimiento utilizado desde hace años como fototerapia para aliviar o curar diversas afecciones, pues al aplicarse luz sobre los tejidos dañados, se estimulan las células afectadas de la zona y se modifica la electricidad propia de la membrana celular, lo cual normaliza el funcionamiento de las enzimas celulares cutáneas.

c) Si la herida compromete tejidos:

- Injertos: Se usan para cerrar cualquier defecto en áreas no muy profundas de la piel, tomando de esta última una parte y colocándola en otra.

- Colgajo: Se emplea cuando hay tejidos de importancia que pueden estar expuestos, como el hueso, los tendones o los cartílagos (tejido elástico menos duro que el hueso); en este tratamiento se desplazara piel, generalmente acompañada de tejido subcutáneo, pero sin perder su propia circulación sanguínea e irrigación.

2.3.2.7. Complicaciones de las heridas.⁽³³⁾

- a) Infección de la herida:** Habitualmente, la infección de la herida se detecta a los 3 – 5 días de la sutura, la piel esta roja, fluctúa y duele. Los gérmenes implicados suelen ser estafilococos y estreptococos; frecuentemente la causa es el déficit en las medidas de asepsia. Infección de tejidos blandos por gérmenes formadores de gas: hay importante afectación sistémica, se detecta crepitación local.
- b) Tétanos:** Existe el riesgo de tétanos en toda lesión abierta, desde pequeñas erosiones hasta

traumatismos graves incluyendo mordeduras y fracturas abiertas.

c) Hematoma o seroma de la herida: Se trata de una tumoración con fluctuación sin fiebre, en la que la acumulación puede ser serosa o hemática; retrasa la curación de la herida.

d) Dehiscencia de la herida: Si es superficial y la herida no está infectada se pueden aproximar los bordes con cinta adhesiva (Steri-Strip); si está infectada se deja abierta para que cierre por segunda o tercera intención.

2.3.3. La cicatrización: Conceptos Básicos.

Cualquier injuria sobre un tejido produce una respuesta en el organismo con el fin de paliar el daño sufrido e intentar reparar la funcionalidad del mismo, aunque en la mayoría de las veces no hay retorno al *status quo* previo a la lesión.⁽⁴¹⁾

La cicatrización comprende una serie de procesos encaminados a reparar el daño. La reparación de una herida es un proceso dinámico que requiere la participación de diversos mecanismos que actúan de forma sinérgica e interactiva.⁽³⁶⁾

El proceso de cicatrización es un proceso de reparación ordenado con una secuencia de eventos biológicos establecidos, dentro de un tiempo determinado, que intenta devolver la integridad anatómica, funcional y estética de los tejidos lesionados dejando una cicatriz. Existen cuatro tipos de cicatrización:⁽⁴²⁾

- **Cicatrización ideal:** Aquella que devuelve la normalidad anatómica, funcional y apariencia, sin cicatriz externa.
- **Cicatrización aceptable:** Aquella que deja cicatriz, pero que devuelve la continuidad Anatómica y funcional.
- **Cicatrización mínima:** Aquella que deja cicatriz y devuelve la integridad anatómica sin lograr buenos resultados funcionales y que por lo tanto, recurre con frecuencia.
- **Cicatrización ausente:** Aquella en la cual no se logra restaurar la integridad anatómica a pesar de todas las terapias disponibles (ulceras incurables).⁽⁴²⁾

Cicatriz: Es la masa de tejido conjuntivo esencialmente fibroso revestido por la epidermis neoformada que ocupa una antigua solución de continuidad producida por el traumatismo.⁽³¹⁾ Si se destruyen las células hasta la capa basal, de la dermis o epidermis sucede una reparación con formación de cicatriz.⁽⁴³⁾

2.3.3.1. Fases o periodos del proceso de cicatrización de las heridas.

Para restablecer la integridad del área lesionada se cuentan con diversos procesos de acción simultánea conocidos como fases de la reparación cutánea. Son tres fases generales que a su vez se subdividen, las cuales se presentan en una forma secuencial. Cada fase abarca un periodo de tiempo específico, tiene elementos celulares y agentes extracelulares que las caracterizan. Estas fases son: inflamatoria (hemostasis e inflamación); proliferativa (proliferación, migración, epitelización y angiogénesis), y la de remodelación tisular (síntesis de colágeno, matriz, contracción y remodelación).⁽⁴⁴⁾

a) Fase inflamatoria: La primera fase en el evento de cicatrización es la inflamatoria. Esta se inicia inmediatamente después de que se generó la lesión y tiene una duración entre 24 a 48 horas. Puede ser dividida en dos eventos uno vascular (que incluye los mecanismos de hemostasis) y otro celular (que implica la llegada y participación de leucocitos al área lesionada).

La hemostasis sirve como paso fundamental para el inicio de los procesos de reparación ya que la primera acción que toma el cuerpo es detener el sangrado y para ello necesita de la formación del coágulo primario que taponan los vasos sanguíneos lesionados. Este coágulo está formado principalmente de una malla de fibrina, plaquetas y factores de coagulación con células endoteliales; estos elementos predominantemente plaquetas, desencadenan la respuesta inflamatoria por la liberación de vasodilatadores, la quimiotaxis y la activación de la cascada de complemento.⁽⁴⁶⁾

El proceso de inflamación se da 24 horas posteriores de haberse producido la lesión, debido al incremento en la permeabilidad vascular, hemostasis y vasodilatación inducidos por moléculas mediadoras como prostaglandina e histamina que a su vez inducen la formación de espacios entre las células endoteliales de los capilares, por donde se escapa plasma, generando el edema. Asimismo, los leucocitos

que llegan a la lesión, se unen con albúmina y globulinas para formar la matriz provisional.⁽⁴⁷⁾

El aumento de la permeabilidad favorece la migración de neutrófilos y monocitos al sitio de la lesión. Los neutrófilos son las primeras células en llegar, su papel es eliminar los cuerpos extraños mediante la acción de enzimas hidrolíticas (lisozimas) y radicales de oxígeno. Además producen citosinas proinflamatorias como el TNF- α (del inglés Tumor Necrosis Factor- α) e IL-1 (del inglés Interleucine-1). Después de 72 horas, los monocitos al migrar al espacio extravascular, son transformados en macrófagos por factores séricos y fibronectina. Por lo que, los neutrófilos son reducidos en número y son reemplazados por macrófagos.⁽⁴⁴⁾

Los macrófagos son muy importantes en la cicatrización, ya que fagocitan bacterias y tejido muerto, además, liberan diversas citocinas y factores de crecimiento que favorecen el inicio de la formación del tejido de granulación, por lo que son la primera fuente de citocinas que actúan de

manera parácrina activando y reclutando a otras células; participan en la regulación de la quimiotaxis de los fibroblastos, la proliferación y la síntesis de colágeno. Por lo que juegan un papel fundamental en la transición entre inflamación y reparación.^(44,46)

La última célula de la inflamación en aparecer es el linfocito, el cual produce factores esenciales para la cicatrización como, el factor de crecimiento epidermal de unión a heparina (HB-EGF, del inglés Heparine Binding-Epidermal Growth Factor) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β , del inglés Transforming Growth Factor- β).

Luego de cinco a siete días, sólo pocas células del evento de inflamación están presentes en heridas con cicatrización normal y los fibroblastos llegan a ser la célula predominante. Después de la muerte de los neutrófilos, hay liberación de enzimas proteolíticas y radicales libres de O₂ que con productos finales del

complemento forman el complejo citotóxico de ataque de membrana (Anexo N° 04).⁽⁴⁶⁾

b) Fase Proliferativa: Los procesos involucrados en esta fase son: la proliferación de fibroblastos, reepitelización, angiogénesis y la fibroplasia, que ocurren dos a cuatro días después de generada la lesión. Estos procesos necesitan de energía, síntesis proteica y anabolismo, ya que la matriz extracelular provisional comienza a ser remplazada por tejido de granulación. Esto se inicia gracias a la invasión de capilares al sitio lesionado.⁽⁴⁴⁾

La reepitelización se da unas horas posteriores a la lesión, debido a la pérdida de la epidermis; para ello se requiere de la migración, proliferación y diferenciación de los queratinocitos adyacentes y la restauración de la membrana basal conectada con la dermis. Los cambios en el pH, la hipoxia, el bajo nivel de calcio y el daño de lípidos, péptidos y proteínas favorecen dicho proceso.

La migración de los queratinocitos se da a través de la matriz provisional (compuesta por colágenos I y V, fibronectina, vitronectina, tenascina y fibrina), por los receptores de integrinas, los factores de crecimiento y las metaloproteinasas de matriz (MMP, del inglés Matrix Metalloproteinase) (enzimas de una gran familia de proteínas dependientes del Zinc) producidas por los queratinocitos. Inicialmente forman una sola capa que posteriormente solo se divide para generar una epidermis estratificada. La proliferación es favorecida por FGF (del inglés Fibroblast Growth Factor) y el TGF- β . El restablecimiento de la membrana basal entre dermis y epidermis es esencial para la integridad y función de la piel.^(46,48)

Otro de los procesos es la angiogénesis, dicho evento es un requerimiento absoluto para la cicatrización, se activa aproximadamente al segundo día después de haberse causado la herida. Para ello las células endoteliales comienzan a migrar a lo largo de la matriz

provisional, por lo que expresan integrinas y MMP-1, 2, 9 y 19 que favorecen la migración endotelial, la formación de túbulos y de nuevos capilares; debido a que degradan la membrana basal.

Los nuevos vasos participan en la formación del tejido de granulación, ya que proveen nutrición y oxígeno al tejido en crecimiento. Las citocinas liberadas por los macrófagos estimulan la angiogénesis, al igual que la hipoxia tisular y el ácido láctico. Factores como el FGF, TGF- β y angiopoyetinas participan en la angiogénesis. Principalmente el factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (del inglés Vascular Endothelial Growth Factor) ya que induce la migración de las células endoteliales y la expresión de receptores de integrinas; es producido por fibroblastos, células endoteliales, etc.⁽⁴⁴⁾

Otro evento que ocurre en la fase proliferativa es la fibroplasia; en donde hay migración, proliferación y producción de nuevo colágeno y otras proteínas de matriz por acción de los fibroblastos, con el objetivo de formar el tejido

de granulación. La migración comienza hacia el cuarto día; es estimulada por PDGF (del inglés Platelet-derived Growth Factor), TGF- β , factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF, del inglés Connective Tissue Growth Factor) y cisteína 61 (Cyr61).

En cuanto a la proliferación de los fibroblastos, ésta comienza en el borde de la herida, en donde los primeros vienen de tejidos adyacentes y posteriormente proliferan gracias a factores de crecimiento liberados por las plaquetas y macrófagos. Este proceso depende de un buen aporte de O₂ y las condiciones ácidas en el centro de la herida, y es afectado por mala perfusión, pocos nutrientes, disminución en la actividad anabólica y los corticoides.⁽⁴⁸⁾

Durante la formación del tejido de granulación los fibroblastos se transforman fenotípicamente en miofibroblastos adquiriendo filamentos de actina en su citoplasma. Dichas células son predominantes en este proceso por su habilidad para contraerse. Esta contracción,

semejante a la muscular, es mediada por PGF1 (del inglés Platelet Growth Factor) 5-hidroxitriptamina, angiotensina, vasopresina, bradiquinina, epinefrina y norepinefrina. Con esta contracción es liberado colágeno y proteoglicanos, asegurando un nuevo tejido en el lugar afectado. La contracción de la herida inicia poco tiempo después de la lesión con un pico a las dos semanas. Se requiere la interacción célula-célula y célula-matriz, en donde los miofibroblastos extienden pseudópodos y las bandas de actina se ligan a la fibronectina extracelular unida al colágeno fibrilar, arrastran las fibras de colágeno a la célula y producen entonces la contracción con la matriz extracelular. El grado de contracción va a depender de la profundidad de la herida, es decir, las capa afectadas (Anexo N° 04).^(46,47)

c) Fase de remodelación tisular: La remodelación tisular consiste en el depósito de matriz permanente y los subsecuentes cambios con el tiempo. Ocurre durante todo el proceso de

reparación. Una vez formado el coágulo de fibrina, se reemplaza por tejido de granulación rico en colágeno tipo III y subsecuentemente por colágeno tipo I. Una de las características de la remodelación es el cambio de la composición de la matriz extracelular. Esta fase se caracteriza por lo tanto, por la síntesis proteica con formación de colágeno y matriz, a partir de los fibroblastos activados.

La remodelación comienza a las tres semanas y dura meses, incluso años hasta que la dermis retorna gradualmente al fenotipo existente previo a la lesión, con predominio de colágeno tipo I, ya que cuando la herida se cierra inicia la degradación por MMP (Metaloproteínas de la Matriz Extracelular) en donde su balance es crítico para el proceso de remodelación.⁽⁴⁷⁾

La producción de colágeno por los fibroblastos inicia 3 a 5 días después de la lesión tisular, es máxima en las primeras dos semanas. Esta producción es estimulada por el factor de crecimiento estimulante de fibroblastos (FEGF,

del inglés Fibroblast Stimulate Growth Factor), PDGF, TGF- β , FGF-2, CTGF, Cyr61 y esfingosina 1 fosfato (S1P), entre otros. El colágeno sintetizando primero adquiere su estructura terciaria, se libera en forma de procolágeno y es exportado a la matriz extracelular (MEC).^(44,48)

En tanto que el aumento en la fuerza ténsil continúa, pasa de 40 % (observada al mes) a 70 % (observada al año), sin embargo, a pesar de todos estos eventos de reparación la piel nunca se recupera en su totalidad (Anexo N° 04).^(44,46)

2.3.3.2. Factores de crecimiento y principales citocinas.

Los factores de crecimiento son polipéptidos (proteínas) generalmente de un peso molecular entre 4000 y 60000 daltons encontrados en mínimas concentraciones que imparten un mensaje bioquímico a una célula blanco a través de un receptor celular específico. Son los principales moduladores de la reparación tisular, regeneración y cicatrización.⁽²⁹⁾

CUADRO N° 04

Principales factores de crecimiento que intervienen en el proceso de reparación del tejido epitelial.

LIGANDO	RECEPTOR	ACTIVIDAD DURANTE EL PROCESO DE REPARACIÓN DEL TEJIDO EPITELIAL
Factor de crecimiento epidermal (EGF)	EGFR/ErbB1	<ul style="list-style-type: none"> - Incrementa la secreción de colagenasa en fibroblastos - Proliferación y movilidad de células pleiotrópicas
Factor de crecimiento de transformación β (TGF β)	TGF- β RI y II, endogлина	<p>TGFβ_1 y TGFβ_2</p> <ul style="list-style-type: none"> - Motilidad de las células epidérmicas - Quimiotaxis de macrófagos y fibroblastos - Síntesis de matriz extracelular - Remodelación <p>TGFβ_3</p> <ul style="list-style-type: none"> - Reducción de la formación de cicatriz - Neovascularización - Incremento del tejido granular y colágeno
Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)	FGFR I, II, III y IV	<ul style="list-style-type: none"> - Induce angiogénesis - Epitelización hacia fibroblastos y proliferación y migración de queratinocitos - Induce el crecimiento celular endotelial y migración - Induce la remodelación del colágeno y previene la contracción de las heridas
Factor de crecimiento de queratinocitos (KGF)	KGFR	<ul style="list-style-type: none"> - Regula la proliferación y maduración de los queratinocitos - Posiblemente sobre regula la secreción epitelial de otros GF
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	PDGFR γ y PDGFR β	<ul style="list-style-type: none"> - Quimiotaxis de fibroblastos y macrófagos - Induce la síntesis de colágeno y de proteoglicanos - Induce degradación de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y citotoxicidad
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	sFLT-1, VEGFR-1/ft-1 y VEGFR-2/KDR/flk-1, VEGFR-3/ft-4, heparánsulfato y proteoglicanos	<ul style="list-style-type: none"> - Induce angiogénesis

Fuente: HIDALGO AO. Determinación del efecto cicatrizante del extracto acuotánico de la planta *Bacopa procumbens* en la línea celular 3T3 de fibroblastos de ratón. ⁽⁴⁹⁾

Asimismo, para que pueda realizarse el proceso de cicatrización es necesaria la presencia de citocinas y moléculas involucradas en los diferentes

procesos. Estas moléculas se sintetizan, liberan y se activan por diferentes tipos celulares.⁽⁴⁹⁾

CUADRO N° 05

Principales citocinas que intervienen en el proceso de reparación del tejido epitelial.

LIGANDO	RECEPTOR	ACTIVIDAD DURANTE EL PROCESO DE REPARACIÓN DEL TEJIDO EPITELIAL
Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α)	TNFRSF1A (TNF-R1)	<ul style="list-style-type: none"> - Molécula pro-inflamatoria - Regula e induce la síntesis de colágeno - Induce degradación de leucocitos polimorfonucleares (PMN), marginación y citotoxicidad - Hemostasis
Interferón-gamma (IFN- γ)	IFN- γ R	<ul style="list-style-type: none"> - Producción de linfocitos T - Induce la remodelación del tejido y reduce la contracción de la herida. - Induce a los leucocitos polimorfonucleares (PMN), y la activación y citotoxicidad de los macrófagos - Induce actividad de la colagenasa
Interleucina-1 (IL-1)	IL-1R	<ul style="list-style-type: none"> - Inducción de la quimiotaxis de queratinocitos, neutrófilos y fibroblastos - Activación de los neutrófilos - Induce síntesis y degradación de colágeno - Induce la expresión de citocinas pro-inflamatorias en células endoteliales - Distribución de queratinocitos y cicatrización en heridas infectadas
Interleucina-2 (IL-2)	IL-2(R, IL-2(R y IL-2(R	<ul style="list-style-type: none"> - Actúa como GF de células T - Regula el metabolismo y la infiltración de fibroblastos - Efecto en pacientes inmunocomprometidos
Interleucina-4 (IL-4)	IL-4R y IL-2(R	<ul style="list-style-type: none"> - Expresada por linfocitos T y basófilos - Suprime la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF-α, IL-1 y IL-6) - Induce la proliferación de fibroblastos - Promueve la síntesis de proteoglicanos y colágeno
Interleucina-6 (IL-6)	IL-6R	<ul style="list-style-type: none"> - Propiedades pro y anti-inflamatorias - Expresión en efectos locales y daño sistémico (en presencia de TNF-α) - Induce la proliferación de fibroblastos - Induce la síntesis de proteínas en fase aguda hepática y mieloide
Interleucina-8 (IL-8)	CXCR1, CXCR2	<ul style="list-style-type: none"> - Activación y quimiotaxis de los neutrófilos - Secretada por macrófagos y fibroblastos - Incrementa quimiotaxis de leucocitos - Induce la expresión de proteínas en células endoteliales - Maduración y marginación de los queratinocitos
Interleucina-10 (IL-10)	IL-10R α y IL-2R(β)	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibe la activación e infiltración de los macrófagos - Inhibe la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF-α, IL-1 y IL-6)

Fuente: HIDALGO AO. Determinación del efecto cicatrizante del extracto acuotánico de la planta Bacopa procumbens en la línea celular 3T3 de fibroblastos de ratón. ⁽⁴⁹⁾

2.3.3.3. Tipos de cicatrización:

a) Cicatrización por primera intención: Es una forma de cicatrización primaria que se observa en las heridas operatorias y las heridas incisas.⁽⁴²⁾ La reparación de estas heridas suele ser necesaria en menos de 6 a 8 horas desde el momento de producirse en la mayoría de las regiones del cuerpo. Las heridas en zonas muy vascularizadas, como la cara o cuero cabelludo, pueden suturarse en las 24 horas siguientes a su producción.⁽³⁸⁾

La reparación ocurre sin complicaciones y requiere de la formación de solo una pequeña cantidad de tejido nuevo. En este tipo de cicatrización el cierre por aproximación de cada una de los planos es lo ideal.⁽⁵⁰⁾ Este proceso requiere de las siguientes condiciones: Ausencia de infección de la herida, hemostasia perfecta, afrontamiento correcto de sus bordes, ajuste por planos anatómicos de la herida durante la sutura (Anexo N° 05).⁽³¹⁾

b) Cicatrización por Segunda Intención: Esta ocurre en forma lenta a expensas de un tejido de

granulación bien definido, y el cirujano puede requerir tratar el exceso de granulación que se destaca en los márgenes de la herida, retardando la epitelización, la mayor parte de las heridas y quemaduras infectadas cicatrizan en esta forma dejando como vestigio una cicatriz larga, retraída y antiestética.^(31,26) La herida es dejada abierta para que cierren en forma espontánea. Se mantiene en la fase inflamatoria hasta que cierre totalmente. Los procesos involucrados son la contracción y epitelización (Anexo N° 05).⁽⁴²⁾

c) Cicatrización por Tercera Intención: Así denominada cuando reunimos las dos superficies de una herida, en fase de granulación, con una sutura secundaria. Conocida también como cierre diferido o primario tardío. Este es un método de reparación seguro para aquellas heridas contaminadas, sucias, infectadas y traumatizadas con grave pérdida de tejido y alto riesgo de infección. Este método consiste en dejarlas abiertas inicialmente, para que al cabo de cuatro días en adelante, que se observe tejido de

granulación limpio, sean cerradas mediante intervención quirúrgica.⁽²⁹⁾

Es menos probable que se infecte la herida mientras está abierta, que la herida que ha sido cerrada tiene máxima susceptibilidad a la infección durante los primeros 4 días. La herida por injertos cutáneos es también un ejemplo de cicatrización por tercera intención.⁽⁵¹⁾

Útil después de pasado el riesgo de infección en heridas contaminadas (cultivo negativo). El proceso no se altera y la fuerza tensil obtenida al final es la misma que con el cierre primario (Anexo N° 05).⁽⁴²⁾

2.3.3.4. Factores que influyen en la cicatrización.⁽⁴⁹⁾

Existen factores generales y locales que influyen en la cicatrización:

a) Factores Generales:

- **Edad y raza:** A mayor edad, disminuye a circulación y la formación de colágeno, lo que produce enlentecimiento del proceso de cicatrización. En la raza negra existe una alta

predisposición a cicatrización anormal con queloides.

- **Nutrición:** En personas con proteinemia baja, oligoelementos (Ca, Mg, ZnO) y vitaminas A, C y E bajas, el proceso de cicatrización se enlentece por la escasa síntesis de colágeno.
- **Enfermedades sistémicas:** Algunas de ellas, como diabetes, aterosclerosis, hipertiroidismo o hipotiroidismo, cáncer y patologías renales provocan disminución en la producción de colágeno. Cada enfermedad tiene su mecanismo mediante el cual altera el proceso de cicatrización y generalmente es multifactorial.
- **Fármacos:** Numerosas drogas tienen efectos teóricos o reales sobre el proceso de la cicatrización. Un ejemplo es la mejor cicatrización de úlceras crurales con el empleo de difenilhidantoína que inhibe la producción de colagenasa o su secreción. El esfuerzo médico por lograr una más rápida, o por lo menos adecuada cicatrización, ha inducido a

emplear numerosísimas sustancias en la superficie de las heridas, la mayor parte para aminorar el impacto de la proliferación bacteriana y sus efectos deletéreos.

- **Irradiación:** Las altas dosis de radiación en especial durante los tres primeros días del proceso de cicatrización, retrasan notablemente la ganancia de resistencia.

b) Factores Locales:

- **Infección:** Es la más importante porque produce disminución de la formación de colágeno, aumento de su síntesis y destrucción del tejido de granulación.
- **Temperatura ambiental:** Esta demostrado que un descenso de la temperatura produce una disminución en la capacidad cicatrizante y un retardo de la misma. Esto en realidad sólo tiene valor en las heridas superficiales, ya que en las profundas, la temperatura corporal mantiene buena vasodilatación en todos los individuos. En la práctica, pues, debe evitarse que el paciente se exponga al frío durante los

10 primeros días después de una cirugía dermatológica.

- **Humedad:** Las heridas cubiertas cicatrizan más rápido que aquellas que se dejan destapadas y se les permite secarse. La migración de células epidérmicas es más rápida cuando están en un medio húmedo.
- **Suministro sanguíneo:** Mantener una circulación adecuada es vital para el aporte de nutrientes y oxígeno necesarios para una buena cicatrización.
- **Oxígeno:** El oxígeno es importante para la cicatrización, sin él se produce destrucción celular. La tensión normal de O₂ es de unos 40mmHg y la resistencia contra las bacterias y proliferación de fibroblastos requieren que sea mayor de 30mmHg. No solo es importante el oxígeno aportado por la sangre, sino el ambiental.
- **Calor:** Se debe mantener una temperatura fisiológica para evitar la vasoconstricción o la vasodilatación perjudiciales a la cicatrización.

- **Curaciones repetidas:** La repetición de las curaciones a pequeños intervalos puede perjudicar la cicatrización por la remoción de los elementos celulares por la propia grasa.
- **Agentes corrosivos:** El uso indiscriminado de ciertos antisépticos que pueden dañar los tejidos, retrasa lógicamente la cicatrización.

CAPITULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. LUGAR DE ESTUDIO.

3.1.1. Estudio Químico:

- Recolección y secado: La recolección y el secado se realizó en la Comunidad de Palestina Baja, del distrito de Kimbiri; provincia de La Convención, en Cusco, en el mes de junio del 2014.
- Molienda, tamizaje, estudio fitoquímico: Se realizó en la Facultad de Ciencias de la Salud – Escuela Académica Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann – Tacna, en el mes de julio del 2014.
- Elaboración del ungüento: Se realizó en la Facultad de Ciencias de la Salud – Escuela Académica Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann – Tacna, en el mes de agosto del 2014.

3.1.2. Estudio Farmacológico:

- Ambientación, depilación, incisión y aplicación del ungüento: Se realizó en inmediaciones del Departamento de Patología

y Anatomía Patológica del Hospital Regional Manuel Nuñez Butrón – Puno, entre los meses de agosto – setiembre del 2014.

- Determinación del efecto cicatrizante por el método del corte histológico: Se realizó en el Departamento de Patología Clínica y Anatomía Patológica del Hospital Regional Manuel Nuñez Butrón – Puno, entre los meses de octubre – noviembre del 2014.

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA.

3.2.1. Población:

Ratones albinos de la especie *Mus musculus* de aproximadamente 3 meses de edad, procedentes del Bioterio del Instituto Nacional de Salud (INS) – Lima.

3.2.2. Muestra:

El tamaño de muestra para el presente estudio fue de 36 especímenes.

3.3. TIPO DE ESTUDIO.

Esta investigación es un estudio experimental, comparativo, prospectivo y longitudinal.

3.4. UNIDADES DE ESTUDIO.

3.4.1. Biológico.

- Polvo de hojas obtenido de *Stevia rebaudiana* Bertoni
- Animales de experimentación: Ratones albinos de la especie *Mus musculus*.
- Tejidos obtenidos de la biopsia de la piel de los ratones albinos en tratamiento para el control.

3.5. MATERIALES DE LABORATORIO.

3.5.1. Estudio Químico.

a) Materiales de vidrio:

- Matraz Erlenmeyer 500ml
- Termómetro
- Tubos de ensayo
- Vaso de precipitación de 100ml y 500ml
- Embudo simple
- Barrilla de vidrio
- Pera de decantación de 500ml
- Pipetas de 1, y 10ml
- Probetas 50 y 100ml
- Refrigerante
- Luna de reloj

b) Otros materiales:

- Pinzas para tubos
- Papel filtro
- Algodón
- Guantes y mascarilla
- Espátulas
- Mechero Bunsen
- Trípode
- Soporte Universal
- Tapón de jebes
- Bombilla de succión
- Manguera para el refrigerante
- Gradillas
- Mortero
- Frasco esteril

c) Reactivos:

- Agua destilada
- Cloroformo (CHCl_3)
- Metanol
- Etanol
- Ácido Sulfúrico cc (H_2SO_4)
- Ácido Clorhídrico cc (HCl)
- Reactivo de Dragendorff

- Reactivo de Mayer
- Cloruro Férrico 5 % (FeCl₃)
- Magnesio
- Vaselina
- Lanolina

d) Equipos:

- Molino de cuchillas
- Tamiz de acero con apertura de 106µm
- Balanza analítica
- Cocina

3.5.2. Estudio farmacológico.

a) Materiales:

- Pentobarbital sódico (Halatal[®])
- Polifenoles cuaternarios derivados de los bioflavonoides cítricos (Dermaclín[®])
- Yodopovidona 10 %
- Mezcla de colorantes Hematoxilina-Eosina
- Mezcla de colorantes Tricromico de Masson.
- Bisturí N^o 15, pizas, guantes, jeringas tuberculinas, gasas.

- Formaldehído (10 %), agua destilada, parafina, xilol, albúmina, glicerina, bálsamo de Canadá, láminas portaobjetos, cubreobjetos y pinzas.

b) Equipos:

- Microscopio Binocular Carl Zeiss Primo Star.
- Sistema de video-microscopía con conexión a PC.
- Micrótopo (con cuchillas de acero, produce cortes de 5 a 10 micrómetros de espesor).

3.6. METODOLOGIA.

3.6.1. Estudio Químico:

3.6.1.1. *Stevia Rebaudiana* Bertoni.

a) Recolección: Las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni fueron recolectadas en el mes de junio del 2014 en la comunidad de Palestina Baja, del distrito de Kimbiri; provincia de La Convención, en Cusco.

La recolección de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni se realizaron en sobres de papel con la asepsia que se requiere.

b) Secado: Después de la recolección se empleó la desecación artificial, esto consistía en construir

túneles de secado de tal modo que contenía a las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Los túneles permitían que controlamos la temperatura y la humedad ambiental durante una semana.

c) Molienda y tamizado: La molienda se hizo con las hojas secas de *Stevia rebaudiana* Bertoni introduciendo en un molino de cuchillas, obteniéndose el polvo de Stevia.

El tamizado del polvo se realizó con un tamiz de acero con apertura de 106µm.

3.6.1.2. Análisis Fitoquímico Preliminar.

La extracción de los metabolitos secundarios se realizó por el método de *Digestión a Reflujo*.

Se pesó 20g del polvo de *Stevia rebaudiana* Bertoni, se colocaron en el balón que forma parte del equipo de reflujo, se le agregó 100ml de metanol y se procedió a refluir por un periodo de 2 horas. Seguidamente se filtró el extracto por papel de filtro.

Con el extracto ya filtrado se procedió a analizar cualitativamente los metabolitos secundarios:

a) Identificación de Triterpenos y Esteroides: En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto metanólico y se añadió gotas de anhídrido acético, se agitó y seguidamente se agregó 3ml de ácido acético y ácido sulfúrico.

b) Identificación de Flavonoides: En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto metanólico, se agregó un pequeño trozo de magnesio y unas gotas de ácido clorhídrico concentrado luego se agitó suavemente.

c) Identificación de Taninos: Se tomó 1ml del extracto etanólico, en un tubo de ensayo, se le añadió 0,5ml de solución de tricloruro férrico al 5 %, y se agitó suavemente.

d) Identificación de Alcaloides:

Reacción de Dragendorff.

En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto metanólico, y se aciduló con 0,5ml de ácido clorhídrico y se le añadió unas gotas de reactivo de Dragendorff y se agito suavemente.

Reacción de Mayer.

En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto metanólico, se aciduló con 0,5ml de ácido clorhídrico diluido y se le agregó unas gotas del reactivo de Mayer y se agitó suavemente.

e) Identificación de Saponinas: En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto metanólico y 9ml de agua para luego agitar fuertemente.

3.6.1.3. Elaboración del fitofármaco de aplicación tópica:

Para el experimento se elaboró ungüentos en tres concentraciones:

8g de polvo de *Stevia rebaudiana* Bertoni en 50g de vaselina + 50g de lanolina = 8 %P/P

10g de polvo de *Stevia rebaudiana* Bertoni en 50g de vaselina + 50g de lanolina = 10 %P/P

12g de polvo de *Stevia rebaudiana* Bertoni en 50g de vaselina + 50g de lanolina = 12 %P/P

Se pesó 8g de polvo (tamizado con apertura de 106µm) de *Stevia rebaudiana* Bertoni, 50g de vaselina y 50g de lanolina. En un vaso precipitado se procedió la mezcla entre vaselina y lanolina a una temperatura de 80°C, luego de este procedimiento se

esperó que disminuya la temperatura a 50°C para agregar los 8g de polvo de *Stevia rebaudiana* Bertoni, se mezcló con la ayuda de una varilla de vidrio para obtener una unguento de forma uniforme. El mismo procedimiento se realizó para las concentraciones restantes.

Se realizaron dos controles de calidad:

Características organolépticas: Se observó de primera impresión la calidad del producto, y luego a intervalos de tiempo (24 horas, 5, 10, 15 y 20 días) con la finalidad de examinar: homogeneidad, textura suave, consistencia, color y olor agradable.

Estabilidad térmica: Se determinó la estabilidad física de las preparaciones a diferentes temperaturas (30°C, 50°C y 80°C) mediante la observación macroscópica de fenómenos de floculación a diversos tiempos (24 horas, 5, 10, 15 y 20 días).

3.6.2. Estudio Farmacológico.

3.6.2.1. Etapas para la determinación del efecto cicatrizante.

a) **Distribución de la muestra:** El estudio farmacológico del efecto cicatrizante se realizó en ratones albinos de ambos sexos de la especie *Mus musculus*, de 3 meses de edad, con 20g – 30g de peso cada una.

Se distribuyeron aleatoriamente en seis grupos:

	Grupo Nº 01	Grupo Nº 02	Grupo Nº 03	Grupo Nº 04	Grupo Nº 05	Grupo Nº 06
Método	Grupo Experimental			Control Negativo	Control Positivo	Blanco
	<i>Ungüento de Stevia: 8 %</i>	<i>Ungüento de Stevia: 10 %</i>	<i>Ungüento de Stevia: 12 %</i>	<i>Vaselina + Lanolina</i>	<i>Dermaclín</i>	<i>Sin tto.</i>
<i>Macroscópico y Microscópico</i>	6	6	6	6	6	6
TOTAL	36 ratones albinos					

b) **Ambientación o acondicionamiento:** Los 36 ratones albinos de ambos sexos fueron distribuidos aleatoriamente al azar en 6 grupos de 6 ratones cada grupo y colocados uno por jaula. Se mantuvieron en observación por un periodo de una semana (7 días), verificándose la condición óptima de los ratones para el estudio. A dichos animales se les mantuvo en un ambiente ventilado

apropiadamente, en jaulas individuales, con alimento balanceado y agua a voluntad, por un periodo de 7 días previos al inicio de la experiencia. Se procuró un ciclo de luz/oscuridad de 12 cada uno por día.

c) Depilación: Después de una semana de ambientarse los ratones al lugar de trabajo, se procedió a depilarlos con crema depilatoria Depile® en el primer tercio dorsal anterior en un área aproximada de 2cm², se anestesió con Halatal® (pentobarbital sódico) por vía subcutánea (tercio inferior del lomo) a una concentración de 50mg/Kg de peso. La depilación se realizó 5 minutos después aplicar la anestesia, con la previa humectación de agua tibia en la zona a depilar, luego se agrega la crema depilatoria Depile® la cual permaneció 3 minutos para ejercer su efecto. Finalmente con la ayuda de gasas húmedas se retiró la crema. Posterior a la depilación, los ratones se colocaron en sus respectivas jaulas teniendo estos libre acceso a bebida y comida. La depilación se realizó 24 horas

antes del procedimiento quirúrgico a fin de descartar cualquier reacción alérgica a la crema depilatoria.

d) Incisión: Después de 24 horas de la depilación, se procedió a anestésiar a los ratones administrándoles una dosis de 50mg/Kg de Halatal® (pentobarbital sódico) vía subcutánea (tercio inferior del lomo). Se colocó al ratón sobre la mesa de trabajo, desinfectando el área depilada con yodopovidona 10 % y marcando 2 puntos equidistantes en 1cm y perpendicular al eje transversal del ratón (zona de corte). Se realizó el corte sobre la zona indicada (cicatriz de primera intención).

e) Aplicación del ungüento de *Stevia rebaudiana*

Bertoni:

Obtenido el corte se aplicó la ungüento en forma tópica, la primera dosis del tratamiento sobre la incisión se realizó con la ayuda de un guante, logrando obtener una distribución homogénea sobre la incisión. Se aplicaron los ungüentos de *Stevia rebaudiana* Bertoni en las tres

concentraciones (8 %, 10 % y 12 %) a los respectivos grupos experimentales; mientras que a los grupos control, se les aplicó la base del ungüento (vaselina + lanolina) y el medicamento de marca, el grupo denominado blanco no recibió tratamiento. Se repitió el tratamiento cada 12 horas en un lapso de 20 días.

3.6.2.2. Evaluación macroscópica: Determinación del tiempo de cicatrización de las lesiones cutáneas provocadas a los ratones.

Para la evaluación macroscópica de las heridas se utilizaron 36 ratones, el tiempo de observación desde la apertura de la herida hasta el cierre de la misma fue de 20 días.

Las heridas se observaron y evaluaron diariamente. Se consideró tomar como criterio de evaluación, el tiempo requerido por cada animal desde el momento de la cirugía, hasta el último día en que se podrá percibir una solución de continuidad en el lugar donde se realizó la herida a simple vista.

Se usó una escala numérica de valoración, mediante la suma del tiempo que dura tal fenómeno, a saber:

1. Tiempo que se observó sangrado y cambio de color.
2. Tiempo hasta la aparición de una capa delgada tromboplaquetaria.
3. Tiempo hasta la formación de costra.
4. Tiempo hasta la retracción de la costra.
5. Tiempo hasta la exfoliación de todo el perímetro de la costra.
6. Desprendimiento de la costra.

3.6.2.3. Evaluación microscópica: Determinación del efecto cicatrizante por el método del corte histológico.

Para la evaluación microscópica de las heridas se utilizaron 36 ratones, el tiempo de observación desde la apertura de la herida hasta el cierre de la misma fue de 20 días.

Los ratones fueron previamente sacrificados con una dosis de 100mg/Kg de Halatal® (pentobarbital

sódico) vía intraperitoneal, las muestras de tejidos con cicatrices experimentales fueron obtenidos inmediatamente a la muerte de los animales, seleccionando un área de 1,5cm de ancho por 2cm de largo, estos tejidos fueron ubicados en gasas por separado, previamente cortados y amarrados con un pábilo por fuera, seguidamente se depositaron en una solución de formol al 10 % por 24 horas, pasado este tiempo se procede a lavar en agua corriente de 15 a 30 minutos, luego viene la deshidratación con soluciones de concentraciones crecientes de etanol (50°, 70°, 80°, 96° y 100°), y la aclaración del tejido (se vuelve transparente) con xilol, después, para poder hacer los cortes se realiza la infiltración o inclusión en parafina, formándose un bloque solidó, la etapa siguiente es el corte que se realiza en un micrótopo obteniendo un corte de 5 µm de espesor, a continuación se hace el montaje en una lámina portaobjetos cubierta con material adherente (albúmina de huevo), luego se retira la parafina restante con xileno, después se realizó la tinción con Hematoxilina-Eosina y Tricromico de Masson,

después se rehidrata con soluciones de concentraciones decrecientes de etanol, de modo que pueda fijarse con un medio de montaje como el bálsamo de Canadá, que tiene índice de refracción similar al vidrio, se cubre con un cubreobjetos y se sella con esmalte transparente.

Teniendo los cortes histológicos fijos en placas portaobjetos, se realizó las observaciones en el microscopio.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. ESTUDIO QUÍMICO.

4.1.1. *Stevia rebaudiana* Bertoni.

En los procesos de recolección y secado, de la *Stevia rebaudiana* Bertoni se obtuvieron hojas secas de color verde oscuro, de olor sui géneris y un sabor dulce. En el tamizado se obtuvo el polvo con un tamaño de 106 μ m por partícula.

4.1.2. Análisis Fitoquímico Preliminar.

Se llevó a cabo un análisis fitoquímico cualitativo del extracto metanólico de la *Stevia rebaudiana* Bertoni, determinándose la presencia de los siguientes metabolitos secundarios:

Saponinas: Dieron positiva a la prueba de la espuma persistente, así como también en la reacción de Liebermann-Burchard, en la cual se evidenció la presencia de saponinas esteroidales por la formación de la coloración azul oscuro. (Anexo N° 06)

Taninos: Mediante el tricloruro férrico se presencié una coloración azul y se corroboró la presencia de taninos gálicos. (Anexo N° 06)

Flavonoides: La reacción de Shinoda dio positivo, esto debido a la aparición de la coloración púrpura oscura, con lo que se confirmó la presencia de flavonoides. (Anexo N° 06)

Alcaloides: La reacción de Mayer dio positivo encontrándose un precipitado de color amarillo – crema, mientras que para la reacción de Dragendorff el precipitado fue de color anaranjado. (Anexo N° 06)

En el Cuadro N° 07 se pueden observar los resultados obtenidos en el análisis fitoquímico preliminar del extracto metanólico.

CUADRO N° 06

Resultados del Análisis Fitoquímico Preliminar

Componentes	Reactivo de Identificación	Forma de Reconocimiento	Extracto Metanólico
Saponinas Triterpenoidales	Rx. Liebermann-Burchard	Purpura	++
	Prueba de la espuma	Espuma	++
Taninos gálicos	Rx. con Cloruro Férrico	Coloración azul	+++
Flavonoides	Rx. Shinoda	Coloración roja	+++
Alcaloides	Rx. de Dragendorff	Precipitado naranja	+
	Rx. de Mayer	Precipitado crema	+

-: ausencia, +: escasa cantidad, ++: moderada cantidad, +++: abundante cantidad

Fuente: Elaboración propia. (Anexo N° 06).

4.1.3. Características de la forma farmacéutica tópica:

En la elaboración de una forma farmacéutica que contenga al polvo de *Stevia rebaudiana* Bertoni se elaboró un ungüento con buenas características según los controles de calidad realizados:

Características organolépticas: A primera impresión, a las 24 horas, 5, 10, 15 y 20 días se observó buena homogeneidad, textura suave, consistencia para su extensión en la piel

(uniformidad), color verde característico de polvo de Stevia y olor agradable. (Anexo N° 07)

Estabilidad térmica: En este control de calidad se observó buena estabilidad física, al no encontrar floculación de partículas por parte de las hojas de Stevia en la base para el ungüento sometidas a temperaturas de 30°C, 50°C y 80°C y asegurándose que no exista la aglomeración de partículas en diversos tiempos: 24 horas, 5, 10, 15 y 20 días. (Anexo N° 07)

4.2. ESTUDIO FARMACOLÓGICO: DETERMINACIÓN DEL EFECTO CICATRIZANTE.

4.2.1. Etapas para la determinación del efecto cicatrizante.

Para la realización del estudio se intervinieron 36 ratones con una herida incisa que comprometió epidermis, dermis e hipodermis; se utilizaron ungüentos elaborados con Stevia al 8 %, 10 % y 12 %, base del ungüento y un medicamento comercial para la aplicación de los ratones intervenidos.

Una vez aplicado los ungüentos se observó como resultado un proceso de cicatrización por primera intención para esto fue evaluado *in vivo* la acción cicatrizante de la *Stevia rebaudiana* Bertoni. (Anexo N° 08)

4.2.2. Evaluación macroscópica: Determinación del efecto cicatrizante de las lesiones cutáneas provocadas a los ratones.

Los resultados para la evaluación macroscópica durante los 20 días se detallan a continuación.

Criterios de evaluación en el proceso de cicatrización para los diferentes tratamientos y el blanco:

A: Sangrado y cambio de color

B: Agregación y degranulación

C: Formación de costra

D: Retracción de la costra

E: Exfoliación de todo el perímetro de la costra

F: Desprendimiento de costra

CUADRO N° 07

**Evaluación macroscópica durante el proceso de cicatrización en el
Grupo N° 01 (Grupo Experimental: Ungüento de Stevia al 8 %)**

Días N° ratones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	A	A	B	B	C	C	C	D	D	D	D	E	E	F		
2	A	B	B	B	C	C	C	C	D	D	D	E	E	F		
3	A	A	B	B	B	C	C	C	D	D	D	E	E	E	F	
4	A	B	B	B	B	C	C	C	C	D	D	D	E	E	F	
5	A	A	B	B	C	C	C	D	D	D	D	E	E	F		
6	A	B	B	B	B	C	C	C	D	D	D	E	E	F		

Fuente: Elaboración propia (Anexo N° 09).

CUADRO N° 08

**Evaluación macroscópica durante el proceso de cicatrización en el
Grupo N° 02 (Grupo Experimental: Ungüento de Stevia al 10 %)**

Días N° ratones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	A	B	C	C	D	D	D	E	E	E	E	F				
2	A	B	B	C	C	C	D	D	D	E	E	F	F			
3	A	B	B	C	C	C	D	D	D	E	E	E	F			
4	A	B	B	C	C	C	D	D	D	E	E	F				
5	A	B	C	C	C	D	D	D	E	E	E	F				
6	A	B	B	C	C	C	D	D	D	E	E	E	F			

Fuente: Elaboración propia (Anexo N° 09).

CUADRO N° 09

**Evaluación macroscópica durante el proceso de cicatrización en el
Grupo N° 03 (Grupo Experimental: Ungüento de Stevia al 12 %)**

<i>Días</i> <i>N° ratones</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	A	B	B	B	C	C	C	D	D	D	E	E	F			
2	A	A	B	B	B	C	C	C	D	D	D	E	E	F		
3	A	B	B	B	C	C	C	D	D	D	E	E	E	F		
4	A	B	B	B	C	C	D	D	D	E	E	F	F			
5	A	B	B	B	C	C	C	D	D	D	E	E	F			
6	A	B	B	B	B	C	C	D	D	D	E	E	F	F		

Fuente: Elaboración propia (Anexo N° 09).

CUADRO N° 10

**Evaluación macroscópica durante el proceso de cicatrización en el
Grupo N° 04 (Control Negativo: Vaselina + Lanolina)**

<i>Días</i> <i>N° ratones</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	A	A	A	B	B	B	C	C	C	D	D	D	D	E	E	F	F
2	A	A	B	B	B	B	B	C	C	D	D	D	E	E	F		
3	A	A	A	B	B	B	C	C	C	C	D	D	D	E	E	F	
4	A	A	B	B	B	C	C	C	D	D	D	D	E	E	E	F	F
5	A	A	A	B	B	B	C	C	C	D	D	D	D	E	E	F	
6	A	A	B	B	B	C	C	C	C	D	D	D	E	E	F		

Fuente: Elaboración propia (Anexo N° 09).

CUADRO N° 11

**Evaluación macroscópica durante el proceso de cicatrización en el
Grupo N° 05 (Control positivo: Dermaclín®)**

Días N° ratones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	A	B	B	B	B	C	C	D	D	D	E	E	E	F	F	
2	A	B	B	B	C	C	C	D	D	D	D	E	E	E	F	
3	A	B	B	C	C	C	D	D	D	D	D	E	E	F		
4	A	B	B	C	C	C	D	D	D	D	E	E	E	F		
5	A	B	B	B	B	C	C	D	D	D	E	E	E	F		
6	A	B	B	C	C	C	D	D	D	D	E	E	E	F		

Fuente: Elaboración propia (Anexo N° 09).

CUADRO N° 12

**Evaluación macroscópica durante el proceso de cicatrización en el
Grupo N° 06 (Blanco: Sin tratamiento)**

Días N° ratones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	A	B	B	B	B	C	C	C	D	D	D	E	E	E	F	F
2	A	B	B	B	B	C	C	C	D	D	D	E	E	F	F	
3	A	B	B	B	C	C	C	D	D	D	D	E	E	E	F	
4	A	B	B	B	C	C	C	D	D	D	E	E	E	F		
5	A	A	B	B	B	C	C	C	D	D	D	E	E	E	F	
6	A	B	B	B	C	C	C	D	D	D	D	E	E	E	E	F

Fuente: Elaboración propia (Anexo N° 09).

CUADRO N° 13

Comparación en los tiempos de cicatrización total de los diferentes grupos de tratamiento

<i>Nº de ratones</i>	<i>Ung. de Stevia al 8 %</i>	<i>Ung. de Stevia al 10 %</i>	<i>Ung. de Stevia al 12 %</i>	<i>Vaselina + Lanolina</i>	<i>Dermaclín®</i>	<i>Sin tratamiento</i>
1	14	12	13	17	15	16
2	14	13	14	15	15	15
3	15	13	14	16	14	15
4	15	12	13	17	14	14
5	14	12	13	16	14	15
6	14	13	14	15	14	16
Promedio	14,333	12,5	13,5	16	14,333	15,167
Mediana	14	12,5	13,5	16	14	15

Fuente: Elaboración propia

En el Cuadro N° 14 se puede observar los resultados del comportamiento del proceso de cicatrización de heridas, resultando que el ungüento de Stevia al 10 % favorece mucho más la cicatrización seguida del ungüento al 12 %, estos resultados se corroboran con la evaluación histológica.

4.2.3. Prueba de Hipótesis:

Antes de aplicar la prueba de ANOVA, se verificó la normalidad y la homocedasticidad de los datos, con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Homogeneidad (Test de Levene).

CUADRO N° 14

PRUEBA DE NORMALIDAD

(Prueba de Kolmogorov-Smirnov)

H₀: La distribución del tiempo de cicatrización de los grupos en estudio es normal

H₁: La distribución del tiempo de cicatrización de los grupos en estudio no es normal

		Tiempo de cicatrización
N		36
Parámetros normales(a,b)	Media	14,31
	Desviación típica	1,283
Diferencias más extremas	Absoluta	0,177
	Positiva	0,177
	Negativa	-,156
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,065
Sig. asintót. (bilateral)		0,207

Fuente: Elaboración propia

Decisión:

Si $p > 0,05$; se acepta la H₀

Si $p < 0,05$; rechaza la H₀, se aprueba H₁

Resultado:

Tenemos que $1,065 > 0,05$; por lo que, aceptamos la hipótesis nula. Dado que aceptamos H₀, podemos decir que la distribución del tiempo de cicatrización de los grupos en estudio es normal.

CUADRO N° 15
PRUEBA DE HOMOGENEIDAD
(Test de Levene)

H₀: El tiempo de cicatrización de los grupos en estudio no es diferente

H₁: El tiempo de cicatrización de los grupos en estudio es diferente

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
0,482	5	30	0,787

Fuente: Elaboración propia

Decisión:

Si $p > 0,05$; se acepta la H₀

Si $p < 0,05$; rechaza la H₀, se aprueba H₁

Resultado:

Tenemos que $0,482 > 0,05$; por lo que, aceptamos la hipótesis nula. Dado que aceptamos H₀, podemos decir que el tiempo de cicatrización de los grupos en estudio es homogéneo.

Existiendo evidencia estadística para decir que los datos de las muestras se distribuyen de manera normal y homogénea, se puede proceder a analizar los datos con estadística paramétrica.

CUADRO N° 16

ANÁLISIS ANOVA

H₀: No existe diferencia significativa entre los grupos

H₁: Si existe diferencia significativa entre los grupos

ANOVA table

<i>Source</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Treatment	45.14	5	9.028	21.67	3.87E-09
Error	12.50	30	0.417		
Total	57.64	35			

Decisión:

Si $p > 0,05$; se acepta la H₀

Si $p < 0,05$; no rechaza la H₀, se aprueba H₁

Resultado:

En el Cuadro N° 15 se realizó un análisis de varianza para un factor, con la finalidad de poder determinar estadísticamente si existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos (tiempo de cicatrización) de los grupos 01, 02, 03, 04, 05 y 06, resultando la probabilidad $3,87 \times 10^{-9}$ menor a 0,05 por lo tanto se rechaza la H₀ y se aprueba la existencia de diferencia significativa entre los grupos de estudio, con una probabilidad del 95 %.

CUADRO N° 17

**ANALISIS DE LAS DIFERENCIAS ENTRE LAS CATEGORIAS CON UN
INTERVALO AL 95 %**

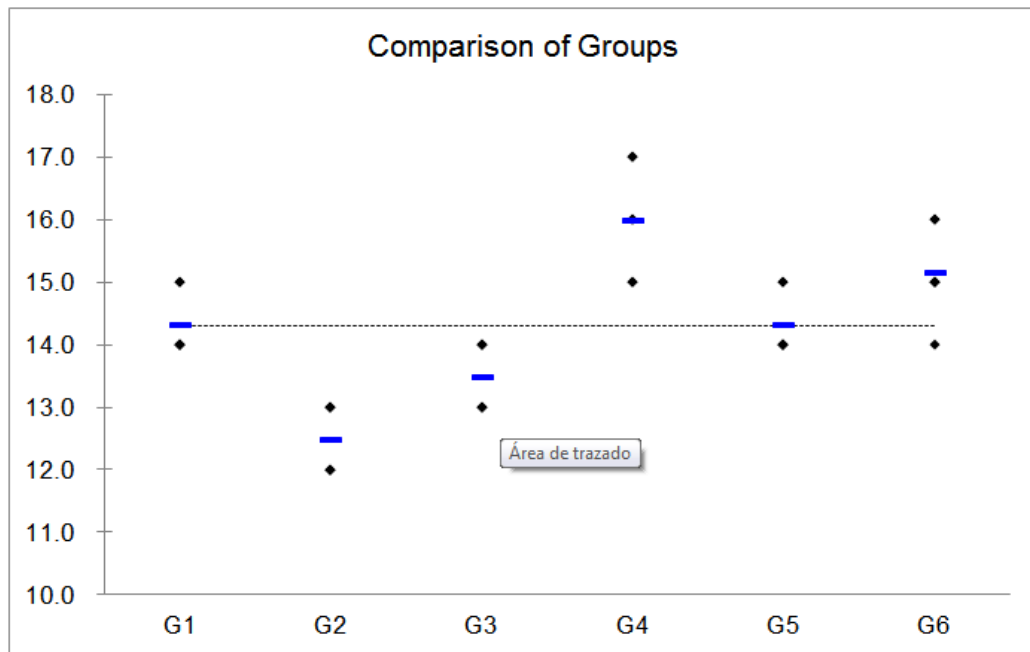
		G2	G3	G1	G5	G6	G4
		12.5	13.5	14.3	14.3	15.2	16.0
G2	12.5						
G3	13.5	.0117					
G1	14.3	2.93E-05	.0329				
G5	14.3	2.93E-05	.0329	1.0000			
G6	15.2	5.83E-08	.0001	.0329	.0329		
G4	16.0	1.93E-10	1.96E-07	.0001	.0001	.0329	

En la Cuadro N° 16, se presentan los resultados de la prueba de tukey, evaluando la diferencia entre dos grupos, obteniendo que:

- G1 no presento diferencia significativa con G5
- G2 presenta diferencia significativa con el G1, G3, G4, G5 y G6;
- G3 presento diferencia significativa con G1, G4, G5 y G6;
- G1 presento diferencia significativa con G4 y G6;
- G5 presento diferencia significativa con G4 y G6;
- G6 presento diferencia significativa con G4.

GRAFICO 01

ANALISIS DE LAS DIFERENCIAS ENTRE LAS CATEGORIAS CON UN INTERVALO AL 95 %



El Grafico Nº 01 demuestra que el tiempo de cicatrización del G2 (tratamiento con ungüento de Stevia al 10 %) es superior a todos los grupos, seguido del G3 (tratamiento con ungüento de Stevia al 12 %); mientras que G1 (tratamiento con ungüento de Stevia al 8 %) estadísticamente presenta igual tiempo de cicatrización que el G5 (tratamiento con Dermaclín®). Además el G4 (Vaselina + Lanolina) y G6 (Sin tratamiento) asumirían el mayor tiempo para lograr el efecto cicatrizante.

CUADRO N° 18

PRUEBA DE TUKEY

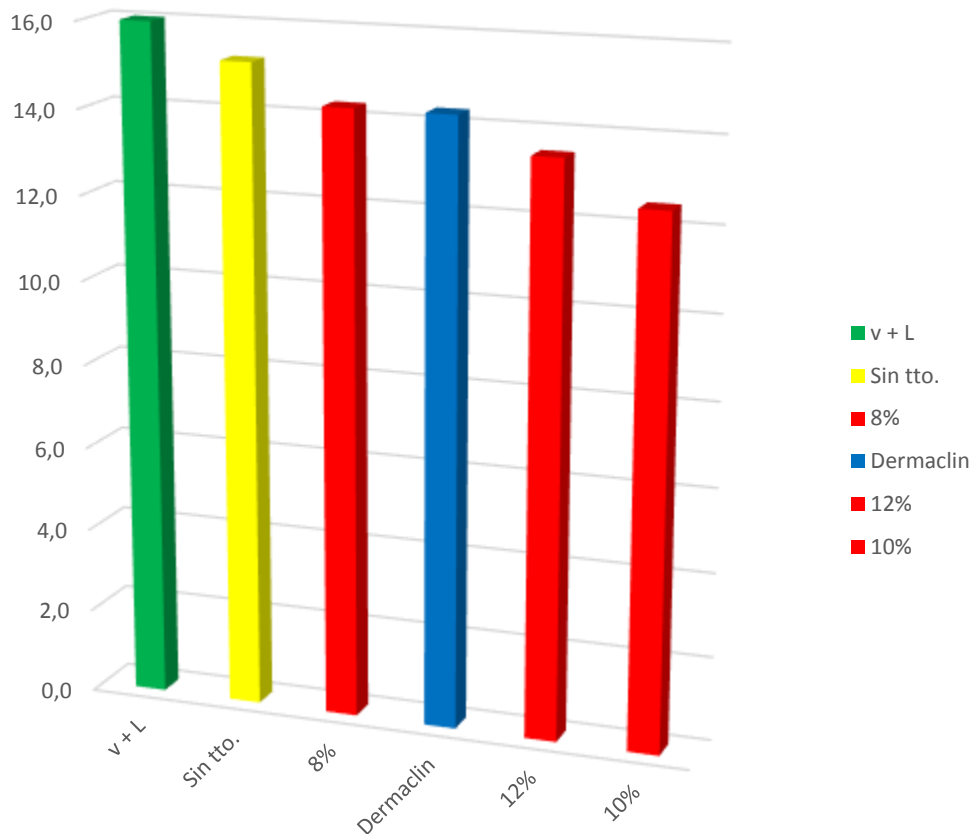
CLASIFICACION DE LOS GRUPOS

<i>Categorías</i>	<i>Medias</i>	<i>Grupos</i>
G4	16.0	A
G6	15.2	B
G1	14.3	C
G5	14.3	C
G3	13.5	D
G2	12.5	E

En el Cuadro N° 17, clasificamos a los grupos según el tiempo de cicatrización, observando que el Grupo 4 (Vaselina + Lanolina) demostró mayor tiempo de cicatrización, seguido del Grupo 6 (Sin tratamiento), en 3^{er} lugar el Grupo 1 (Ungüento de Stevia al 8 %) y Grupo 5 (Dermaclín®), en 4^{to} lugar el Grupo 3 (Ungüento de Stevia al 12 %) y 5^{to} lugar el Grupo 2 (Ungüento de Stevia al 10 %).

Esto nos indica que el Grupo 2 presenta acción cicatrizante con mayor rapidez.

GRAFICO Nº 02
TIEMPO DE CICATRIZACIÓN



En el Gráfico Nº 02, se presenta la clasificación de los grupos por la prueba de tukey, evaluando el tiempo de cicatrización; observando que los Grupos 2 y 3 (Ungüento de Stevia al 10 % y 12 %) presentaron el menor tiempo de cicatrización a comparación del Grupo 1 (Ungüento de Stevia al 8%), Grupo 5 (Dermaclín®), Grupo 4 (Sin tratamiento) y Grupo 6 (Vaselina + Lanolina).

4.2.4. Evaluación microscópica: Determinación del efecto cicatrizante por el método del corte histológico.

En la evaluación microscópica se utilizó dos tipos de coloraciones: Hematoxilina – Eosina y Tricromico de Masson (Anexo N° 10).

Corte histológico de cicatriz experimental tratado con ungüento de *Stevia rebaudiana* Bertoni al 8 %: Se observa solución de continuidad poco perceptible, formación de queratina con núcleos incluidos en la misma (paraqueratosis), tejido de granulación compuesto por vasos sanguíneos en neoformación (angiogénesis). No existe proceso de inflamación; moderada cantidad de fibroblastos, tejido muscular y colágeno con buena organización (Anexo N° 11).

Corte histológico de cicatriz experimental tratada con ungüento de *Stevia rebaudiana* Bertoni al 10 %: Se observa tejido epitelial en la que la queratina, epidermis, dermis y tejido muscular están formando una estructura normal que inclusive no se observa solución de continuidad. No existe proceso de inflamación; abundante tejido de granulación, fibroblastos (células alargadas con núcleos pequeños y oscuros), y fibras de colágeno (azuladas) a los lados del defecto. Se observa

vasos en su totalidad en estado maduro, por lo que ya no existe angiogénesis (Anexo N° 11).

Corte histológico de cicatriz experimental tratada con ungüento de *Stevia rebaudiana* Bertoni al 12 %: Se observa solución de continuidad poco perceptible con una epitelización incompleta y folículos pilosos en el escaso espacio de continuidad. No existe inflamación; moderada cantidad de fibroblastos y fibras colágenas (Anexo N° 11).

Corte histológico de cicatriz experimental tratada con Vaselina + Lanolina: Se observa solución de continuidad con retraso en la formación de folículos pilosos por lo que el tejido colágeno está aumentado al igual que los fibroblastos que impiden que se desarrollen los folículos pilosos (pelo). El exceso de colágeno y exceso de fibroblastos en la zona de cicatrización generará el aspecto de una alopecia y queloide. No presenta inflamación, como tampoco existe angiogénesis (Anexo N° 11).

Corte histológico de cicatriz experimental tratada con Dermaclin®: Se observa solución de continuidad con una sobre proliferación de tejido muscular por lo que se podría interpretar como una piel sobre elevada. No existe inflamación,

moderada cantidad de fibroblastos y fibras colágenas, con angiogénesis aun presente (Anexo N° 11).

Corte histológico de cicatriz experimental sin tratamiento:

Se observa epitelización con escaso fibroblastos y tejido colágeno, haciéndola débil en comparación a los demás tejidos (Anexo N° 11).

CUADRO N° 19

Histología de las formulaciones en control experimental, control negativo, control positivo y el blanco a los 20 días de tratamiento

<i>Formulación</i>	<i>Epidermis (H-E)</i>	<i>Inflamación (H-E)</i>	<i>Fibroblastos (H-E)</i>	<i>Fibras Colágenas (T. de M.)</i>	<i>Neoformación de vasos (H-E)</i>	
Ungüento de Stevia al 8 %	1	En regeneración	Ausencia	++	++	Moderada
	2	En regeneración	Ausencia	++	++	Moderada
	3	En regeneración	Ausencia	++	++	Escasa
	4	En regeneración	Ausencia	++	+	Escasa
	5	En regeneración	Ausencia	++	++	Moderada
	6	En regeneración	Ausencia	++	++	Moderada
Ungüento de Stevia al 10 %	1	Hiperplásica	Ausencia	++	++	Completa
	2	Hiperplásica	Ausencia	+++	+++	Completa
	3	Hiperplásica	Ausencia	+++	+++	Completa
	4	En regeneración	Ausencia	++	++	Completa
	5	Hiperplásica	Ausencia	+++	+++	Completa
	6	Hiperplásica	Ausencia	+++	+++	Completa
Ungüento de Stevia al 12 %	1	En regeneración	Ausencia	++	++	Moderada
	2	En regeneración	Ausencia	++	++	Moderada
	3	En regeneración	Ausencia	++	++	Moderada
	4	En regeneración	Ausencia	++	++	Escasa
	5	En regeneración	Ausencia	+	+	Moderada
	6	En regeneración	Ausencia	+	+	Escasa
Vaselina + Lanolina	1	Adelgazada	Escasa	+	+	Escasa
	2	Adelgazada	Escasa	+	+	Escasa
	3	Adelgazada	Escasa	+++	+++	Escasa
	4	Adelgazada	Escasa	+++	+++	Escasa
	5	Adelgazada	Escasa	++	++	Escasa
	6	Adelgazada	Escasa	++	++	Escasa
Dermaclín®	1	En regeneración	Ausencia	++	++	Moderada
	2	En regeneración	Ausencia	++	+	Moderada
	3	En regeneración	Ausencia	++	++	Moderada
	4	En regeneración	Ausencia	++	++	Moderada
	5	En regeneración	Ausencia	++	++	Moderada
	6	En regeneración	Ausencia	+	+	Moderada
Sin tratamiento	1	Adelgazada	Escasa	+	+	Escasa
	2	Adelgazada	Escasa	+	+	Escasa
	3	Adelgazada	Escasa	+	+	Escasa
	4	Adelgazada	Escasa	-	-	Escasa
	5	Adelgazada	Escasa	-	-	Escasa
	6	Adelgazada	Escasa	+	+	Escasa

-: ausencia, +: escasa cantidad, ++: moderada cantidad, +++: abundante cantidad

Fuente: Elaboración propia

CAPITULO V

DISCUSION

La cicatrización es un proceso muy complejo y dinámico que involucra la participación de diversos eventos celulares y bioquímicos para llevar la reparación del tejido lesionado. Entre los eventos celulares involucrados que realizan los fibroblastos, principal célula de la reparación, está la migración, la proliferación, la adhesión y la diferenciación fenotípica, entre otros. La cicatrización es un proceso que ocurre normalmente en los diferentes órganos y tejidos, sin embargo debido a diferentes factores principalmente infecciones, isquemia, hipoxia, anormalidades metabólicas como diabetes, inmunosupresión y condiciones como malnutrición, edad, daño al tejido, entre otros, la cicatrización no se lleva de manera adecuada, prolongándose el tiempo de cierre y causando complicaciones tan severas como la pérdida de extremidades e incluso la muerte. Debido a esto, personas que presentan alguna de estas complicaciones requieren el uso de agentes que faciliten la cicatrización. Sin embargo a pesar de que actualmente hay una gran variedad de tratamientos que ayudan a la cicatrización, los productos más utilizados son la sulfadiazina de plata (agente tópico antibacteriano en caso de quemaduras) y los corticoesteroides, los cuales se ha visto que tienen efectos secundarios importantes.⁽⁴⁹⁾

Debido a ello diversos grupos de científicos alrededor del mundo se han dado la tarea de investigar nuevos productos que ayuden a la cicatrización de las heridas, esto mediante pruebas ya sea *in vitro* y/o *in vivo*. Y dado que las plantas son una fuente enorme de moléculas con principios activos frente a diferentes patógenos, células, padecimientos, etc., éstas se han estudiado como fuente de agentes terapéuticos debido a sus efectos benéficos que han demostrado tener. Entre estos encontramos a la cicatrización de heridas, en donde se ha visto que actúan en una o más etapas de dicho proceso. Entre las moléculas que se han identificado de diferentes plantas que participan en el evento de cicatrización están los metabolitos secundarios pertenecientes a las familias de los taninos, flavonoides, saponinas, triterpenos, naftoquinonas, alcaloides y biomoléculas, lo que hace que en la medicina tradicional sean ampliamente utilizadas.⁽⁴⁹⁾

Debido a lo anteriormente descrito en este estudio se evaluó la acción cicatrizante de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, para lo cual, primero se realizó un análisis fitoquímico con la técnica de digestión a reflujo, para identificar cualitativamente las principales familias de metabolitos presentes en las fracciones obtenidas del extracto metanólico de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, utilizando reactivos de identificación. Los resultados que se obtuvieron demuestran la presencia de flavonoides, saponinas triterpenoidales, taninos gálicos y alcaloides principalmente

Es sabido que los *flavonoides* evitan la liberación de prostaglandinas, histamina, evitan la migración de elementos formes (neutrófilos y otros) que están relacionados con la cascada de la inflamación, además estabilizan la membrana celular capturando a los radicales libres presentes evitando daño celular y activando el sistema de complejo bioquímico para la regeneración del tejido.⁽⁵⁵⁾

Por otra parte Sharat *et al.*⁽⁴⁹⁾ en el 2010 demostró la actividad cicatrizante de la *saponina triterpénica*, aislada del extracto metanólico de *Bacopa monnieri*. Mediante tres tipos de heridas (excisión, incisión y el espacio muerto) realizadas en ratas Wistar y tratados con una concentración de 100 y 200 mg/ml y como control positivo a la framisetina, evaluaron diferentes eventos de la cicatrización y observaron una actividad cicatrizante significativa en los grupos de ratas tratadas tanto con el extracto. Ya que la reepitelización fue más rápida con una alta tasa de retracción de la herida, esto fue corroborado con un análisis histológico en donde se observó un incremento en el entrecruzamiento de las fibras de colágeno y la ausencia de los monocitos, comparados con el control.

Por su parte los taninos podría estar relacionado a su capacidad para inactivar adhesinas microbianas, enzimas, proteínas transportadoras en la célula, formar complejos con la pared celular, etc. Además se sabe que estos componentes vegetales están en condiciones de ligar las proteínas de la piel y de la mucosa, transformándolas en sustancias insolubles,

quitando así la base de cultivo a las bacterias que han colonizado la piel y la mucosa herida.⁽⁵⁶⁾

Existe un metabolito secundario que no se pudo identificar por falta de reactivos, pero está comprobado la existencia dentro de la composición química de la *Stevia rebaudiana* Bertoni. Este metabolito es el lupeol que fue investigado por Harris *et al.*⁽⁴⁵⁾ en el 2008; quien aisló el extracto de las hojas de *Paniculatus celastrus* con éter de petróleo y evaluó el efecto cicatrizante a una concentración de 8 mg/ml de sodio al 0,2% en gel de alginato, en tres tipos de heridas (excisión, incisión y espacio muerto) en ratas Wistar. Encontrando que en los grupos tratado con lupeol tuvieron una actividad cicatrizante significativamente mayor (17,83 +/-0,48 días) que con el control positivo (18.33 +/-0,42 días), la reepitelización fue más rápida con una alta tasa de retracción de la herida y el peso del tejido de granulación incrementó, así como el de colágeno y la ausencia de los monocitos, indicando su efecto sobre la cicatrización.

Considerando la información bibliográfica entre otras revisadas y con los resultados obtenidos en la marcha fitoquímica realizada, procedimos a experimentar en animales de laboratorio.

Para lo cual se evaluó mediante técnicas "*in vivo*" el efecto de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni en la cicatrización de heridas cutáneas en ratones de experimentación.

Uno de los procesos importantes en la cicatrización es la proliferación celular de los fibroblastos, responsables de la formación del tejido de granulación, síntesis de colágeno y cierre de la herida, entre otros. Debido a esto se evaluó el efecto de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni (polvo de Stevia con un tamaño de 106 μm) a tres concentraciones 8 %, 10 % y 12 %, en base de ungüento (vaselina + lanolina) contrastando los resultados con un control positivo (Dermaclin®), control negativo (vaselina + lanolina) y el blanco que no recibió tratamiento alguno.

En la técnica macroscópica empleada para evaluar el tiempo de cicatrización de la herida, se obtuvo resultados con una marcada acción favorable para la concentración al 10 %, frente a un 8 %, 12 % y al control positivo, tal y como se muestra en el Cuadro N° 14 (Pág. 93) y Gráfico N° 02 (Pág. 98); las cuales evidenciaron una cicatrización total a los trece días para la concentración al 10 %, superior al control positivo, 8 % y 12 % que lo hicieron a los quince y catorce días respectivamente; en relación al control negativo y el blanco que lo hicieron a lo diecisiete y dieciséis días como corresponde en los resultados.

Los datos obtenidos en la técnica macroscópica se corroboraron con el estudio histológico (técnica microscópica), donde se observó que la concentración al 10% producían mayor cantidad de tejido de granulación, vasos sanguíneos formados, abundantes fibroblastos y presencia de tejido colágeno, comparado con las concentraciones 8 %, 12 % y el control

positivo, donde existía angiogénesis y moderada cantidad de fibroblastos y tejido colágeno. El control negativo (vaselina + lanolina) presentaba fibroblastos y tejido colágeno en exceso, lo cual hacía pensar que se formaría un queloide; mientras que el blanco presentaba escasa cantidad de fibroblastos y tejido colágeno por lo que la piel tendría poca resistencia a la tracción.

El cierre de las heridas cutáneas se debe a que en las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni existen moléculas que se han identificado en diferentes plantas participando activamente en el evento de cicatrización, estos son los metabolitos pertenecientes a las familias de los taninos, flavonoides, saponinas, triterpenos y alcaloides, cuyos estudios han demostrado que participan activando o incrementando la migración de los queratinocitos y fibroblastos proceso indispensable junto con la proliferación y la adhesión para llevar a cabo la formación del tejido de granulación, la síntesis de colágeno y el cierre de la herida, entre otros, responsables de reparar la herida.^(57, 58)

Estudios a nivel internacional acerca de la actividad cicatrizante de la *Stevia rebaudiana* Bertoni, solo, se encontró un trabajo realizado por Kuntal Das⁽⁴⁾ quien evaluó el efecto del extracto de hojas de Stevia en la curación de heridas, para ello administró por vía oral dosis de 150, 250 y 500 mg/kg de peso corporal y sin concentración por vía tópica, evaluando de esta forma el potencial de cicatrización. Realizando una comparación con lo

encontrado por el presente trabajo donde sí se encontró la mejor dosis tópica siendo este el de 10% (10g de polvo de Stevia en Lanolina + Vaselina) lo cual indica una concentración mayor a lo utilizado por el autor en la vía oral ya que no fue el extracto ni la vía utilizada para la aplicación.

No hay trabajos reportados en el Perú ni en la región de Tacna, respecto a la acción cicatrizante de la *Stevia rebaudiana* Bertoni en lesiones cutáneas.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio validan la propiedad cicatrizante de esta planta y su uso en la medicina tradicional para el tratamiento de heridas, demostrando la superioridad del ungüento de *Stevia rebaudiana* Bertoni al 10 % con un tiempo de cicatrización más corto, mejor conformación de los elementos cicatrizantes y por ende mejor estética.

CONCLUSIONES

1. De la marcha fitoquímica realizada sobre el extracto metanólico de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni; se determinó la presencia de flavonoides, taninos gálicos, saponinas triterpenoidales y alcaloides.
2. El ungüento elaborado a base de *Stevia rebaudiana* Bertoni presenta buena estabilidad, consistencia, inercia y agradables características organolépticas.
3. El tiempo de cicatrización de las heridas cutáneas provocadas a ratones albinos fue de diecisiete días para el control negativo (vaselina + lanolina), dieciséis días para el blanco (sin tratamiento), quince días para el control positivo (Dermaclin®) y el ungüento de Stevia al 8 %, catorce días para el ungüento de Stevia al 12 % y trece días para el ungüento de Stevia al 10 %.
4. Los resultados del estudio histológico demuestran que el ungüento de Stevia al 10% producirá mejor cicatrización por la presencia de fibroblastos y tejido colágeno en forma adecuada a diferencia de las otras muestras contrastadas. Las muestras de ungüento al 8 % y 12 % incluido el control positivo lograron producir en la piel del animal moderada cantidad de estos componentes de la piel, el control negativo (vaselina + lanolina) presenta una cantidad excesiva mientras que el blanco (sin tratamiento) escasa cantidad.

5. La evaluación comparativa para las tres concentraciones de *Stevia rebaudiana* Bertoni con la crema Dermaclin® demostró tener diferencia significativa a favor del ungüento de Stevia al 10 %, logrando tener menor tiempo de cicatrización y a la vez mayor efecto cicatrizante sobre las heridas provocadas en los ratones, mientras que el ungüento de Stevia al 12 % obtuvo el segundo mejor tiempo y efecto cicatrizante que la crema Dermaclin®, seguido del ungüento de Stevia al 8 % que resulto tener igual tiempo y efecto cicatrizante que la crema Dermaclin®.

RECOMENDACIONES

1. Se sugiere continuar con las investigaciones sobre el efecto cicatrizante de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni con la extracción de los principales metabolitos secundarios que contiene la planta para darle una forma farmacéutica adecuada.
2. Dada las características de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, además de su empleo como edulcorante y otras propiedades, se recomienda aplicarlo en heridas de la piel.
3. Efectuar estudios de toxicidad dérmica para determinar si las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni causa efectos adversos al ser aplicados en forma tópica por un tiempo prolongado.
4. Se sugiere utilizar otras técnicas para la óptima evaluación de la acción cicatrizante de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.
5. Se sugiere continuar las investigaciones sobre el efecto cicatrizante de la hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni en diferentes lesiones internas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 dermatol (Perú)*. 2010; 21 (1): 19-24
2. HERRERA CF, GÓMEZ JR, GONZÁLES RC. El cultivo de Stevia (*Stevia rebaudiana*) Bertoni en condiciones agroambientales de Nayarit, México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Centro de Investigación Regional Pacífico Centro Campo Experimental Santiago Ixcuintla. 2012; 1(19): 14 – 17.
3. Stevia: Historia, virtudes y aplicaciones de la planta dulce que lo cura todo. 3ª ed. Madrid: Obelisco; 2010.
4. KUNTAL D. Wound healing potential of aqueous crude extract of Stevia rebaudiana in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2013 marzo-abril. [acceso 17 de noviembre de 2013]; 23(2). Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2013000200021&script=sci_arttext

5. SALVADOR RR, SOTELO HM, PAUCAR ML. Estudio de la Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) como edulcorante natural y su uso en beneficio de la salud. *Scientia Agropecuaria* 2014 mayo. [acceso 19 de noviembre de 2013]; 5(3). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2077-99172014000300006&script=sci_arttext
6. GUEVARA L. Plantas medicinales. 1ª ed. Cusco: Centro de estudios regionales andinos "Bartolomé de las Casas"; 1989.
7. ARÉVALO G. Las plantas medicinales y su beneficio en la Salud. 1ª ed. Lima: Ed AIDSESEP; 1994.
8. MARTINEZ PT. La hierba dulce: Historia, usos y cultivo de la Stevia *Rebaudiana* Bertoni. 1ª ed. Albacete: Ciencias de la Salud; 2002.
9. LOPÉZ TL, PEÑA GL. Plan estratégico para la creación de una empresa dedicada a la producción y comercialización de edulcorante a base de Stevia. [Tesis para título profesional]. Cali: Pontificia Universidad Javeriana; 2004.
10. LANDÁZURI P, TIGRERO J. *Stevia rebaudiana* Bertoni: Una planta Medicinal. Boletín Técnico: Escuela Politécnica del ejército. Setiembre del 2009.

11. EDAC. Manual técnico de producción de Stevia: Adaptabilidad biológica para la introducción de la Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en seis zonas agroecológicas andinas de San Ignacio y Chota. [acceso 10 de octubre de 2013]. Disponible en: http://www.incagro.gob.pe/apc-aa-files/.../Manual_T_cnico_de_Stevia.pdf.
12. La Republica. Lima: La Republica.pe; 2002 [acceso 15 de mayo de 2013]. En el VRAE se produce la Stevia, un sustituto natural del azúcar. Disponible en: <http://www.larepublica.pe/16-03-2012/en-el-vrae-se-produce-la-stevia-un-sustituto-natural-del-azucar>.
13. Agencia Agraria de Noticias. Lima: Agrararia.pe; [acceso 15 de mayo de 2013]. La producción de Stevia pasará de 50 has a más de 20 mil has en cinco años. Disponible en: <http://www.agraria.pe/noticias/la-produccion-de-stevia-pasara-de-50-has-mas-de-20-mil-has-en-cinco-anos>
14. FAO. Editado por Ecocrop; 2004 [acceso 25 de noviembre de 2013]. Stevia rebaudiana. Disponible en: <http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=10084>.
15. CARUAJULCA BD. Efecto de la concentración de extracto de Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en las características fisicoquímicas y sensoriales de néctar de membrillo. [Tesis para título profesional]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2012.

16. MENDEZ EF, SARAVIA HR. Extracción de un edulcorante natural no calórico a escala de laboratorio a partir de "*Stevia rebaudiana* Bertoni" y su aplicación en la industria de alimentos. [Tesis para título profesional]. Buenos Aires: Universidad de el Salvador; 2012.
17. GUTIERREZ EL, GALARZA C, RAMOS W, TELLO M, ROJAS I, CHÍA H, RONCEROS G. Prevalencia de Enfermedades Dermatológicas en una comunidad rural de Ucayali, Perú. *Dermatol Perú* 2009;19(2): 104-112
18. OSORIO BC, ROJAS PA, DIAZ ND, ALFONSO PH, LOPEZ CC, BARRERA AP. *Stevia el dulce sabor de tu vida*. Bogotá; Administración Comercial y Mercadeo; 2007
19. SIRSHENDU D, MONDAL S, BANERJEE S. *Stevioside: Technology, Applications and Health*. India: John Wiley & Sons; 2013.
20. ATENCIO F. *Enciclopedia práctica de las medicinas alternativas*. 1ª ed. Buenos Aires: LEA S.A; 2005.
21. Catedra de Farmacognosia. Argentina: Universidad Nacional de Patagonia San Juan Bosco; [acceso 15 de noviembre de 2013]. Procesamiento del material vegetal para un estudio fitoquímico. Disponible en: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/farmacognosia/>
22. HUETHER E, CANCE LK. *Understanding Pathophysiology*. 2ª ed. U.S.A.: Mosby; 2000.

23. UNDERWOOD J. General and Systematic Pathology. 3ª ed. London: Churchill Livingstone; 2000.
24. FALABELLA FR, ESCOBAR RC Y GIRALDO RN. Fundamentos de medicina: Dermatología. 5ª ed. Colombia: CIB; 1997.
25. OTERO CM. Medicina General: Heridas, diagnóstico y tratamiento de urgencia. España: SEMG; 2000.
26. SANCHEZ SJ. Libro de cirugía. Ecuador: Sociedad Ecuatoriana de Cirugía; 2002.
27. ROBSON M. Cicatrización de heridas y reparación de tejidos. Buenos Aires: Roemmers; 1998.
28. GONZALES JT, RODRIGUEZ RR, MACHADO MO, CABRERA JS. Heridas: Métodos de tratamiento. México: MEDISAN; 2004.
29. ENRIQUEZ QB. Efecto del mucilago de la penca *Opuntia ficus indica* (tuna) en la cicatrización de heridas dérmicas provocadas en *Rattus norvegicus*. [Tesis para título profesional]. Tacna: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; 2010.
30. SABISTON D. Tratado de Patología Quirúrgica Moderna. 3ª ed. Madrid: Interamericana Mc Graw – Hill; 1995.
31. SALAVERRY GO. Cirugía general. Lima: Fondo editorial de la UNMSM; 1999.
32. MARINI M, VALDEZ R Y STRINGA O. Consenso sobre cicatrización de heridas. Argentina: Sociedad Argentina de Dermatología, 2008.

- 33.OTERO CM. Medicina General: Heridas, diagnóstico y tratamiento de urgencia. España: SEMG; 2000.
- 34.MENDOZA PM Y VELIZ QA. Efecto cicatrizante de un preparado dermatológico a base de baba de caracol *Helix aspersa* en heridas de piel producidas experimentalmente: [Tesis para título profesional]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2007.
- 35.RASSNER G. Manual y Atlas de Dermatología. 5º ed. España: El ateneo; 1997.
- 36.COHEN IK, DIEGELMAN RF Y CRSSLAND MC. Principios de Cirugía. Mexico: Interamericana Mc Graw – Hill; 1995.
- 37.MANZUR J, DIAZ AJ, CORTEZ M. Dermatología. Habana: Ciencias Médicas; 2002.
- 38.TROTT TA. Heridas y cortes: Tratamiento y sutura de urgencia. 3ª ed. España: Elsevier; 2007.
- 39.CHALELA – MANTILLA J. El dolor y la Piel. Perú: Dermatol; 2001.
- 40.EVANS D, LAND L. Presión Negativa Tópica para tratar heridas crónicas. España: Cochrane Wounds Group; 2000.
41. COTRAN RS. Patología Estructural y Funcional. 6ª ed. Madrid: Mc Graw – Hill interamericana; 2000.
- 42.ANDRADES P. Cirugía Plástica Esencial. Chile: Universidad de Chile; 2005.

43. PARAKRAMA C, TAYLOR CR. Patología General. 2ª ed. Mexico: Manual moderno; 1998.
44. BENAVIDES J. Reparación de heridas cutáneas. Rev. Dermatol. 16(1): 29-35.
45. HARISH BG, KRISHNA HS, KUMAR BM, KHADEER. Wound healing activity and docking of glycogen-synthase-kinase-3-beta-protein with isolated triterpenoid lupeol in rats. 2008. Phytomedicine. 15(9):763-767..
46. KUMAR V, ABBAS NA, MITCHELL R. Patología humana. 8ª ed. Barcelona: Elsevier; 2008.
47. BROUGHTON G, JEFFREY E, ATTINGER MD, CHRISTOPHER E. The Basic Science of Wound Healing: Plastic and Reconstructive Surgery. 2006.
48. KARUKONDA S, FLYNN T, BOH E. The effects of drugs on wound healing: part I. Int J Dermatol 2000.
49. HIDALGO AO; Determinación del efecto cicatrizante del extracto acuoetanólico de la planta *Bacopa procumbens* en la línea celular 3T3 de fibroblastos de ratón. [Tesis para Maestría]. México: Instituto Politécnico Nacional; 2010.
50. HUNT KT, MUELLER VR, GOODSON HV. Cicatrización de las heridas: Diagnóstico y tratamiento quirúrgicos. 7ª ed. México: El Manual Moderno; 1995.
51. CHALELA – MANTILLA J. El dolor y la piel. Perú: Dermatol; 2001.

52. Departamento de Biología Celular y tisular. México: Universidad Nacional Autónoma de México – Facultad de Medicina; 2010 [acceso 15 de noviembre de 2013]. De César Montalvo. Tejido Conjuntivo. Disponible en: http://histologiaunam.mx/descargas/ensenanza/portal_recursos_linea/apuntes/tejido_conjuntivo.pdf
53. CEDIEL JF, CARDENAS MH, GARCIA A, CHUAIRE L, PAYAN C, VILLEGAS V, SANCHEZ C. Manual de Histología. 1ª ed. Bogotá: Editorial universidad del Rosario; 2009.
54. Departamento de Electrónica Automática y Bioingeniería. Argentina: Universidad Nacional de San Juan – Facultad de Ingeniería; 2012 [acceso 20 de noviembre de 2013]. Catedra de Biología I. Disponible en: <http://dea.unsj.edu.ar/biologia1/th.pdf>
55. HAVSTEEN B. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*.
56. Universidad de las Américas Puebla. México: Facultad de Ingeniería Química; 2012 [acceso 20 de noviembre de 2013]. Disponible en: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqf/barranco_l_sl/capitulo1pdf
57. PORRAS – REYES BH, LEWIS WH, ROMAN JL. Enhancement of wound healing by the alkaloid taspine defining mechanism of action. 1993

58.VILLEGAS LF, MARCALO JA, MALDONADO AJ. (+)-epi-Alpha-bisabolol is the wound-healing principle of *Peperomia galioides*: investigation of the in vivo wound-healing activity of related terpenoids. 2001.

ANEXOS

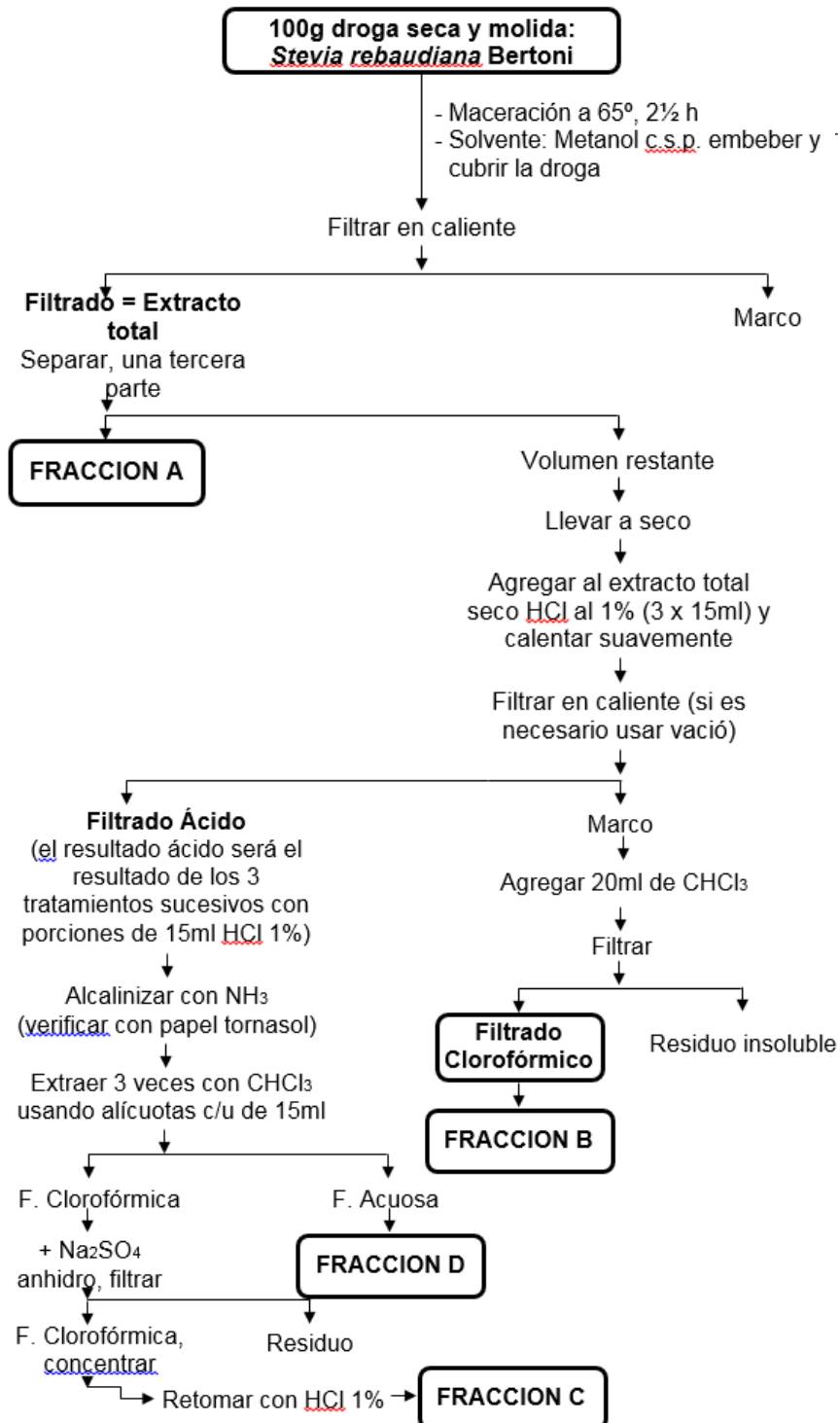
ANEXO N° 01

***Stevia rebaudiana* Bertoni**



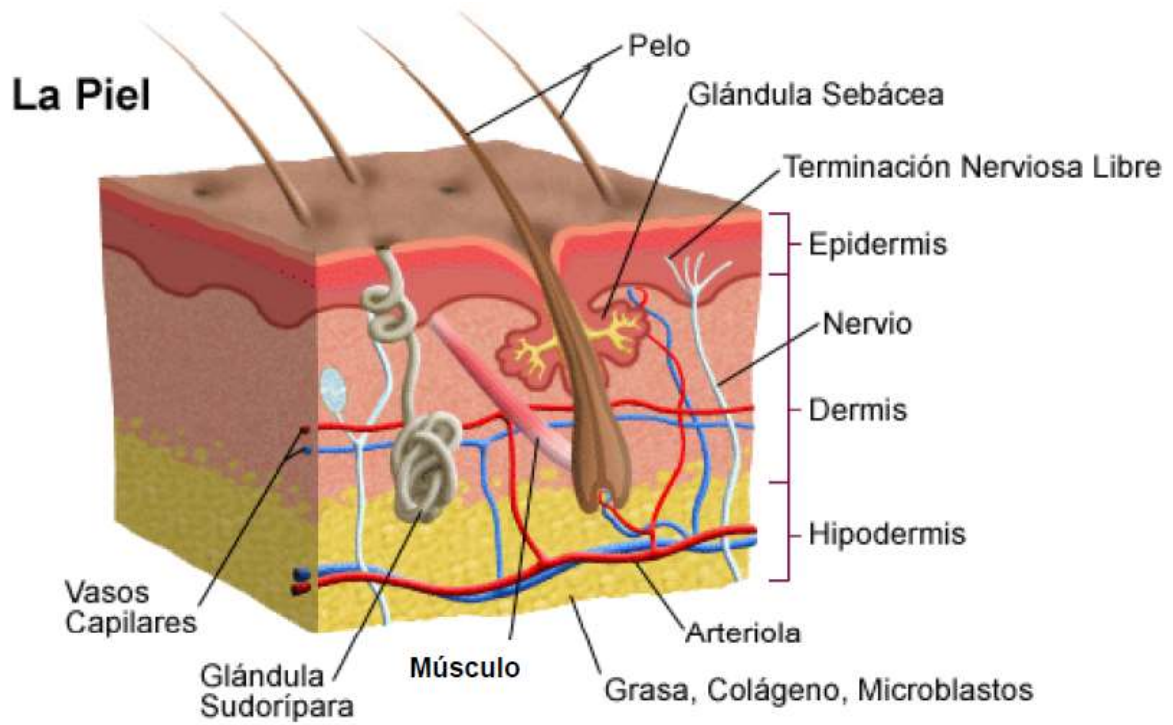
ANEXO N° 02

MARCHA FITOQUIMICA PRELIMINAR



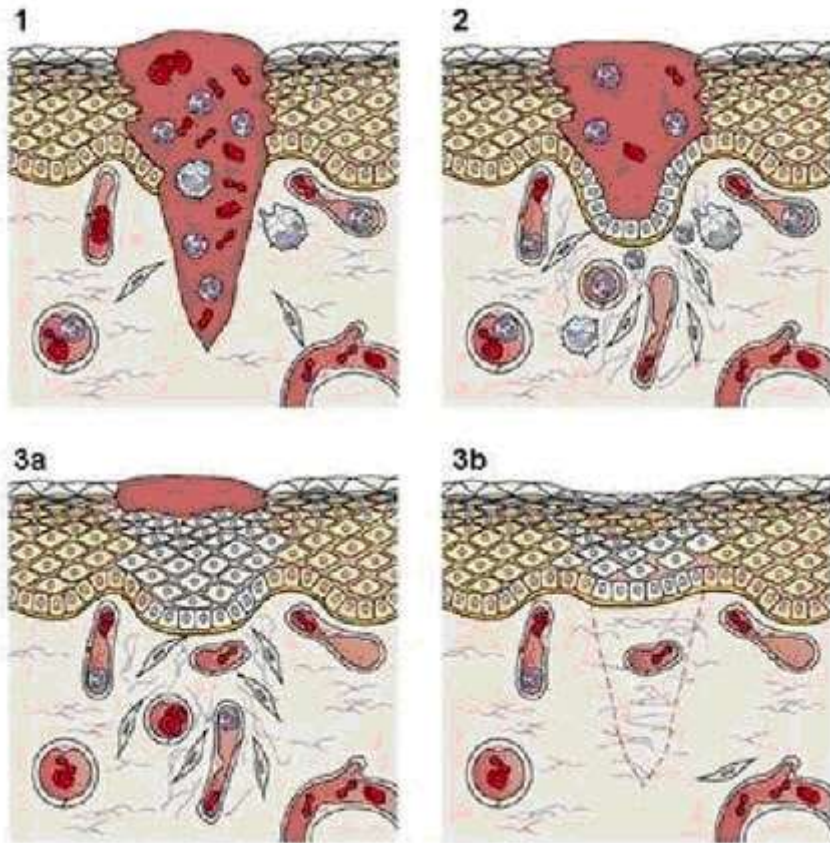
ANEXO N° 03

ESTRUCTURAS DE LA PIEL



ANEXO N° 04

FASES O PERIODOS DEL PROCESO DE CICATRIZACIÓN DE LAS HERIDAS

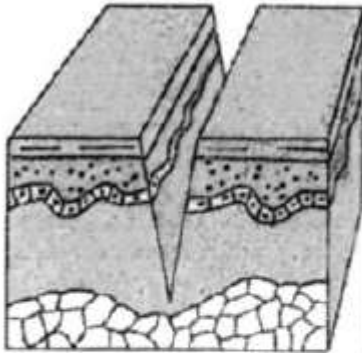


(1) Fase Inflamatoria; (2) Fase Proliferativa; (3a) Fase de maduración y (3b) Reparación.

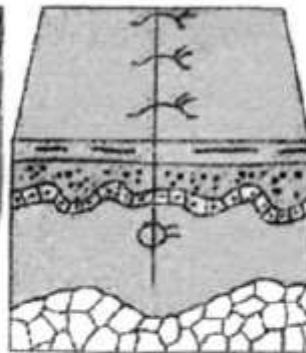
ANEXO Nº 05

TIPOS DE CICATRIZACIÓN

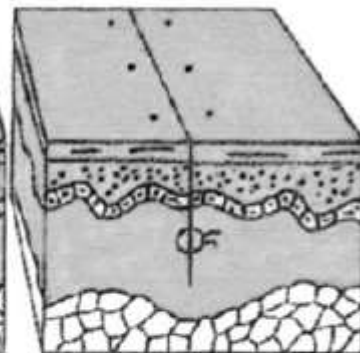
Intención primaria



Incisión limpia

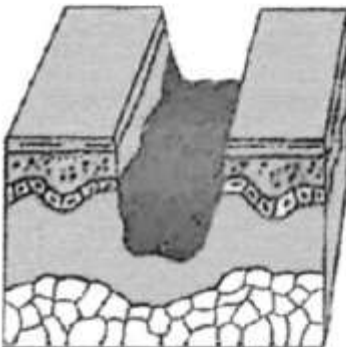


Sutura temprana

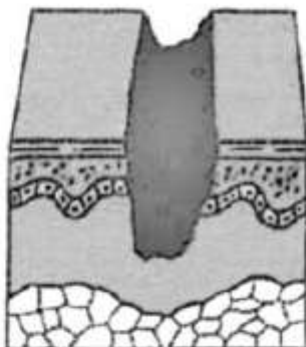


Cicatriz fina

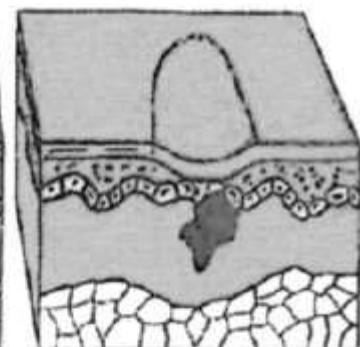
Intención secundaria



Cicatriz irregular con separación entre los bordes

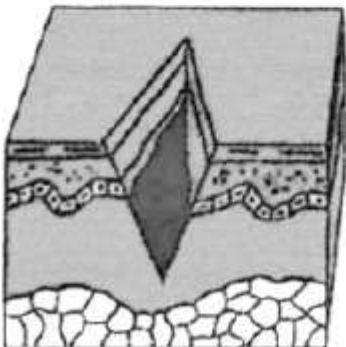


Granulación

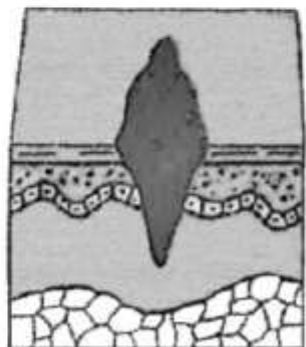


El epitelio crece sobre la cicatriz

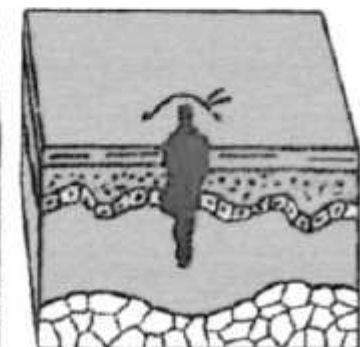
Intención terciaria



Herida



Aumento de la granulación



Sutura tardía con herida ancha

ANEXO N° 06

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA MARCHA FITOQUIMICA
PRELIMINAR



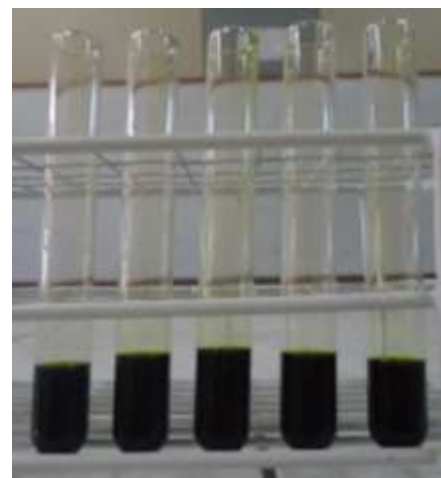
Stevia rebaudiana Bertoni
en Polvo



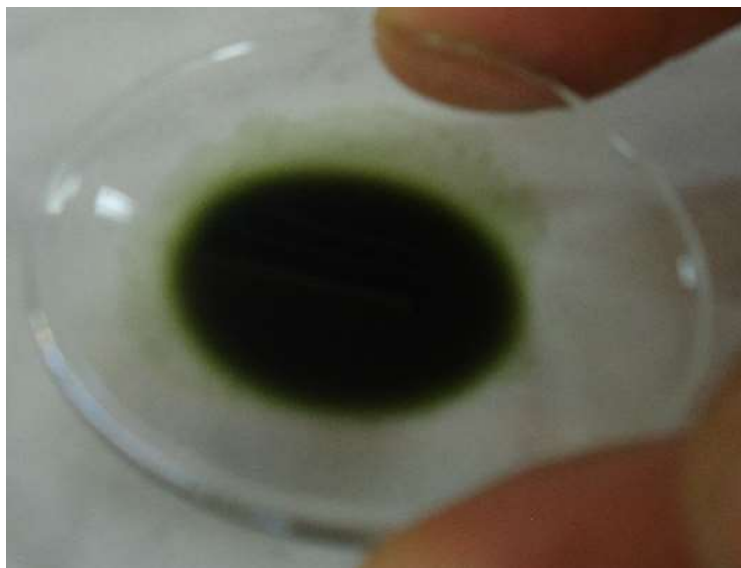
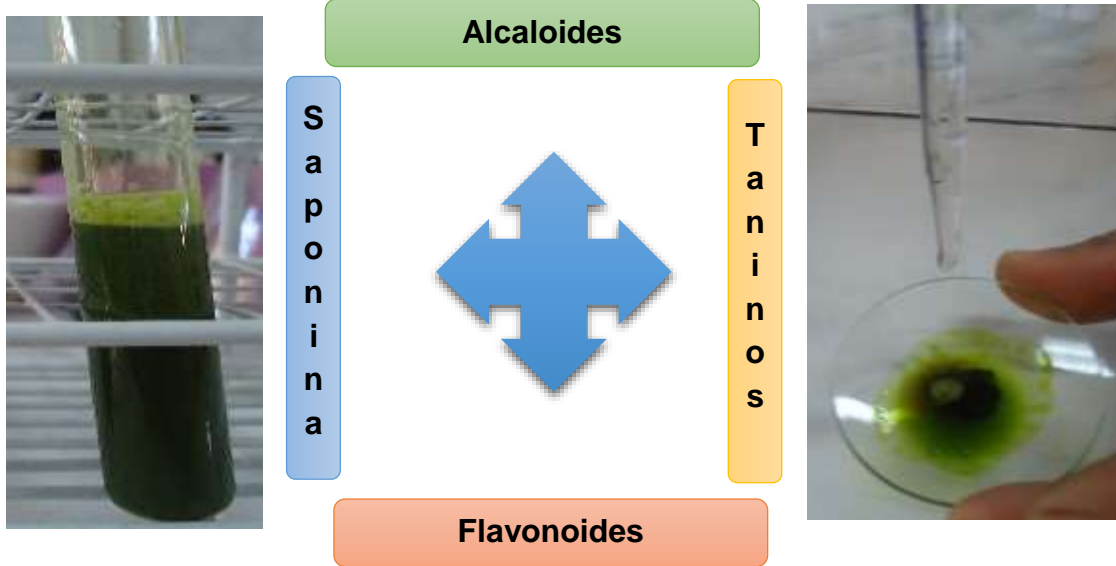
Extracción: Digestión
a Reflujo



Filtración del extracto
metanólico



Extracto metanólico de
Stevia rebaudiana



ANEXO N° 07

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA ELABORACION DEL UNGÜENTO A BASE DE *Stevia rebaudiana* Bertoni



***Stevia rebaudiana* Bertoni
en polvo**



**Tamizador con tamaño de
apertura de 106µm**



***Stevia rebaudiana* Bertoni
tamizada**

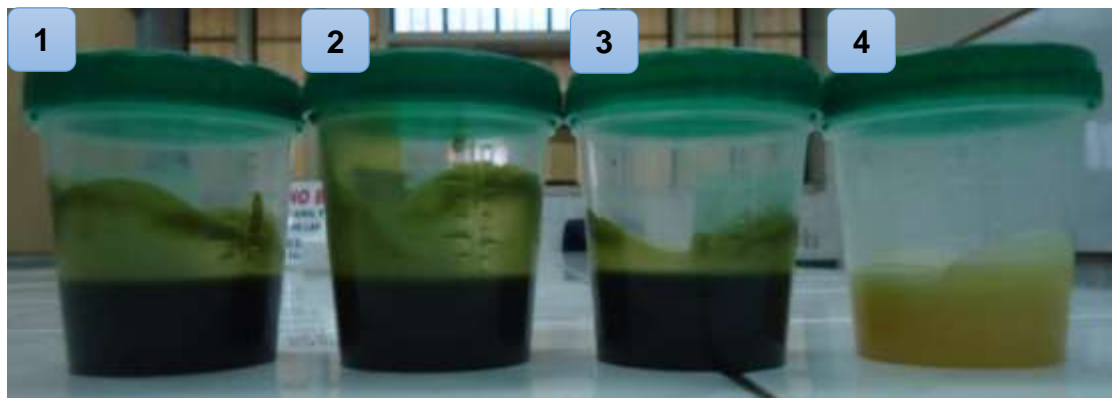


1. Peso se Stevia: 8g, 10g y 12g. 2. Peso de lanolina: 50g

3. Peso de vaselina: 50g



**Mezcla de los tres componentes para el ungüento: Lanolina +
Vaselina + Stevia en polvo**



**1. Ungüento de Stevia al 8%; 2. Ungüento de Stevia al 10%; 3.
Ungüento de Stevia al 12%; 4. Lanolina + vaselina**

ANEXO N° 08

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO FARMACOLOGICO



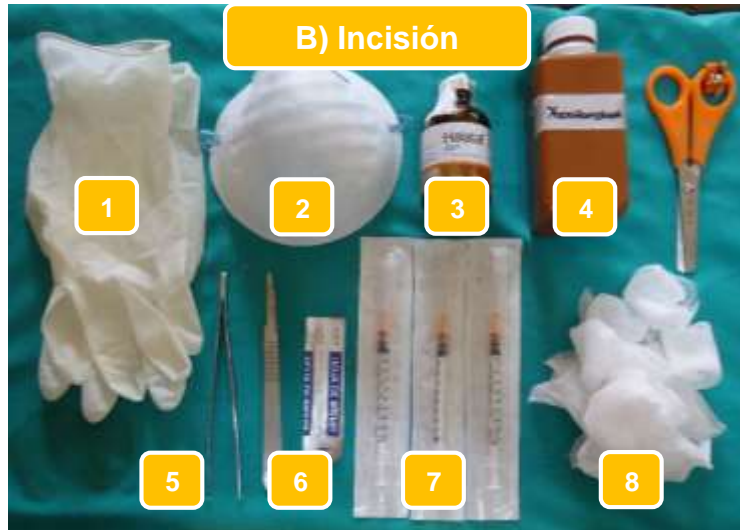
1. Guantes; 2. Jeringas; 3. Crema para depilar; 4. Anestésico; 5. Gasas



Administración: Vía sub cutánea



Aplicación de la crema para depilar (Depile®)



1. Guantes; 2. Mascarilla; 3. Anestésico; 4. Yodopovidona;
5. Pinzas; 6. Bisturí Nº 15; 7. Jeringas; 8. Gasas



Administración: Vía sub cutánea



Marcando 1cm para el corte



Desinfectando el área con yodopovidona



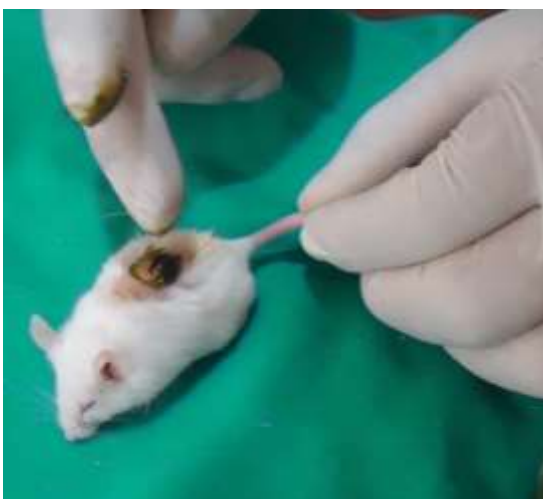
Incisión o corte con bisturí



C) Aplicación del ungüento



1. Ungüento de Stevia al 8%; 2. Ungüento de Stevia al 10%; 3. Ungüento de Stevia al 12% 4. Vaselina + Lanolina; 5. Dermacilin®



Aplicación de los ungüentos de Stevia al 8%, 10% y 12%



Aplicación de la crema y el ungüento para el control positivo y negativo

ANEXO N° 09

EVALUACION MACROSCOPICA DE LOS RATONES

UNGÜENTO DE STEVIA AL 8%



A los 10 días



A los 20 días

UNGÜENTO DE STEVIA AL 10%



A los 10 días



A los 20 días

UNGÜENTO DE STEVIA AL 12%



A los 10 días



A los 20 días

CONTROL POSITIVO: DERMACLIN®



A los 10 días



A los 20 días

CONTROL NEGATIVO: VASELINA + LANOLINA



A los 10 días



A los 20 días

BLANCO: SIN TRATAMIENTO



A los 10 días



A los 20 días

ANEXO Nº 10

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA EVALUACION MICROSCOPICA (CORTES HISTOLOGICOS)



**Anestesiarse a los ratones por vía
intraperitoneal**



Corte del tejido para el estudio



**1. Tejidos en gasa
2. Tejido sujeto en una gasa con un pabilo**



Tejidos en formol al 10% (fijador)

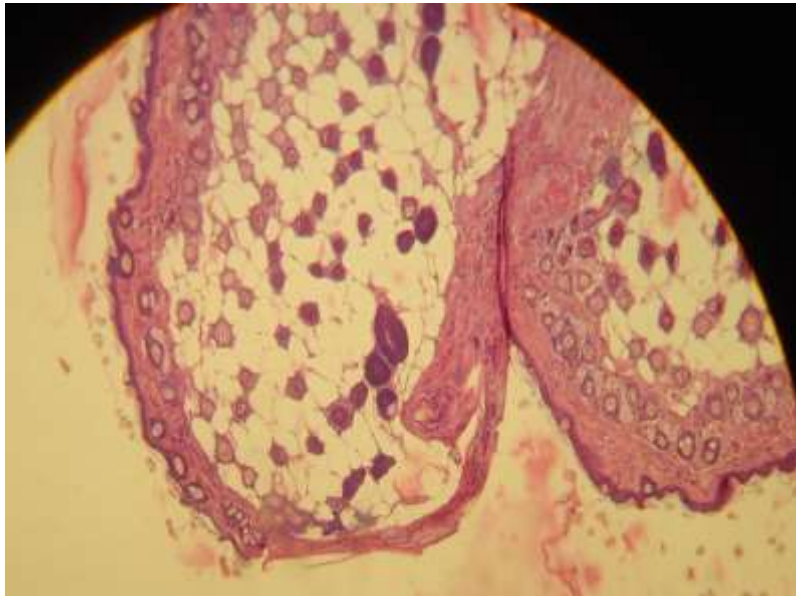


Batería para la coloración Hematoxilina – Eosina y Tricromico de Masson

ANEXO N° 11

**EVALUACION DE LOS CORTES HISTOLOGICOS MEDIANTE LA
COLORACION DE HEMATOXILINA – EOSINA Y TRICROMICO DE MASSON**

UNGÜENTO DE STEVIA AL 8%



Hematoxilina – Eosina. 4X

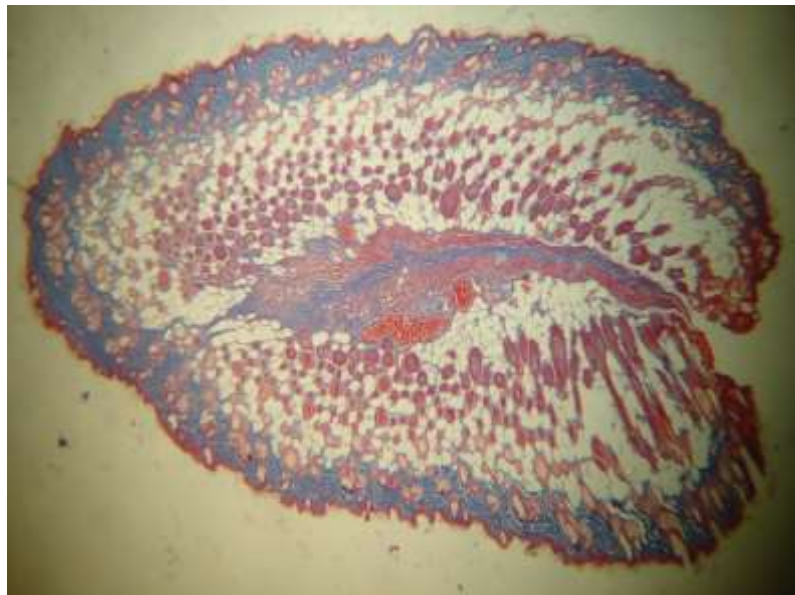


Tricromico de Masson. 4X

UNGÜENTO DE STEVIA AL 10%

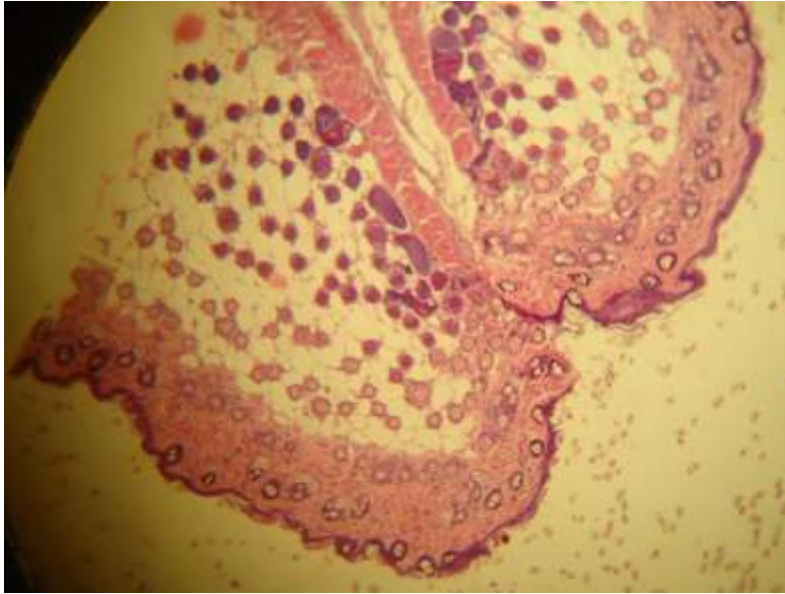


Hematoxilina – Eosina. 4X



Tricromico de Masson. 4X

UNGÜENTO DE STEVIA AL 12%

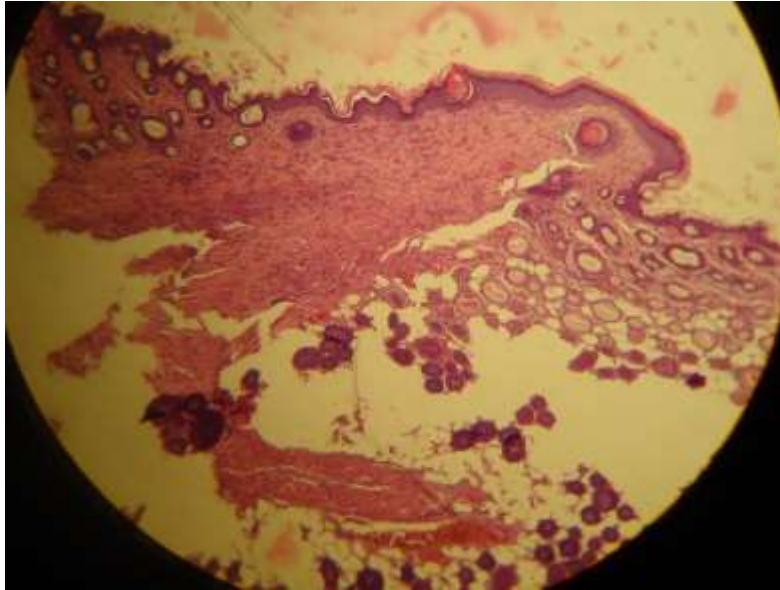


Hematoxilina – Eosina. 4X



Tricromico de Masson. 4X

CONTROL NEGATIVO: VASELINA + LANOLINA

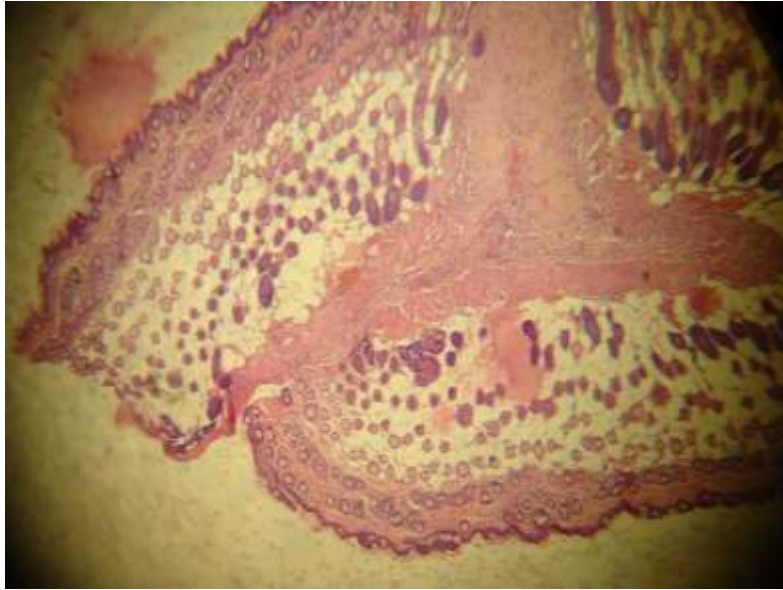


Hematoxilina – Eosina. 10X

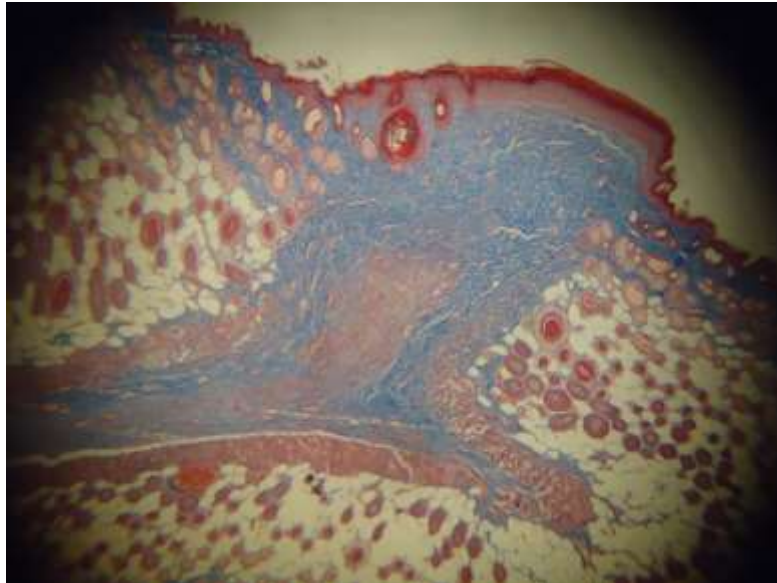


Tricromico de Masson. 4X

CONTROL POSITIVO: DERMACLIN®

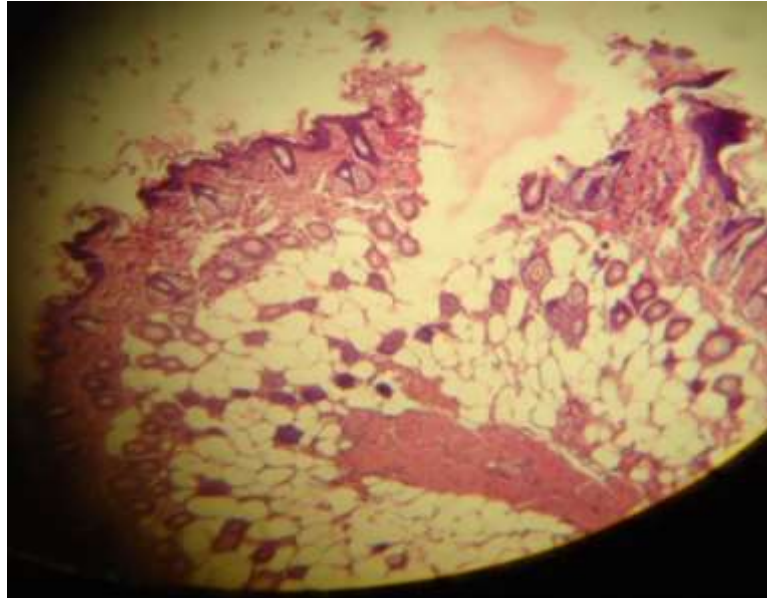


Hematoxilina – Eosina. 4X

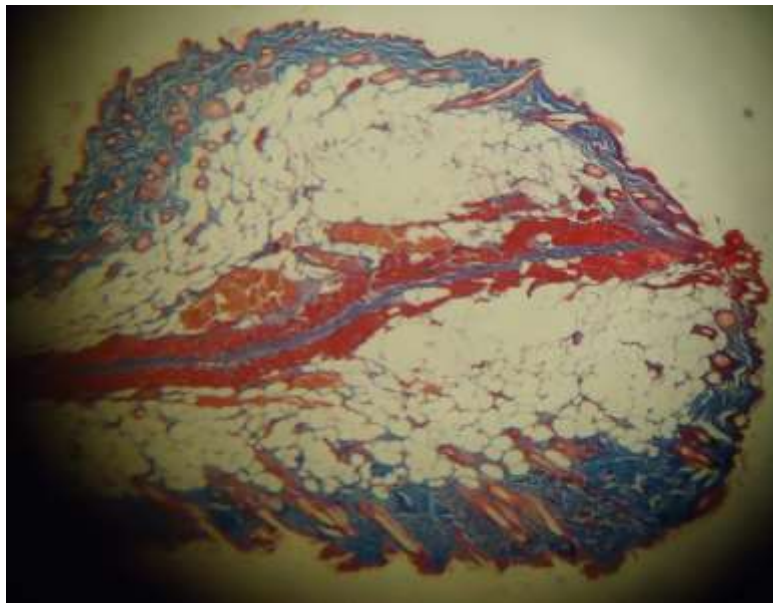


Tricromico de Masson. 10X

BLANCO: SIN TRATAMIENTO



Hematoxilina – Eosina. 4X



Tricromico de Masson. 4X

