

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA
Y BIOQUÍMICA**



**“Evaluación de la toxicidad y efecto cicatrizante del
extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans
neotropica* Diels “nogal peruano”. Ayacucho-2005.”**

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

PRESENTADO POR:

Bach. JUAN BETO RUIZ ORÈ

AYACUCHO - PERÚ

2007

*A mis padres Juan y
Julia por su
dedicación y esfuerzo
en la cristalización
de mi carrera
profesional.*

*A mis hermanos por
su permanente apoyo
en mi formación
profesional.*

*A mi hija MARA WHINONA
lo mejor de mi trabajo.*

*A Nilda, mi amor
especial por llenar de
alegría mi vida, ser
aliento constante.*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga forjadora de profesionales al servicio de la sociedad.

A mis asesores Q.F. Enrique AGUILAR FELICES y, Q.F. Aldo TINCO JAYO, por su valioso asesoramiento y apoyo en la conducción del presente trabajo de investigación, cuyos esfuerzos se materializan en este informe.

A la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, por ser forjadora de mis conocimientos como futuro profesional Químico Farmacéutico y sus profesores.

A mis padres y hermanos, forjadores de mi persona y profesión.

A las personas que colaboraron en la realización del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE.....	iv
RESUMEN.....	v
I.INTRODUCCIÓN.....	1
II.MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Antecedentes.....	3
2.2 Aspectos botánicos.....	4
2.3 Toxicidad.....	7
2.4 Cicatrización.....	8
2.4.1 Fases de la cicatrización.....	9
2.4.2 Mecanismos implicados en la cicatrización.....	11
III.MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1 Ubicación.....	13
3.2 Materiales.....	13
3.2.1 Material vegetal.....	13
3.2.2 Material biológico.....	13
3.3 Metodología.....	14
3.3.1 Métodos de procesamiento del material vegetal.....	14
3.3.2 Determinación de la toxicidad aguda.....	15
3.3.3 Estudio farmacológico.....	16
3.4 Análisis de datos.....	17
IV.RESULTADOS.....	18
V. DISCUSIÓN.....	32
VI.CONCLUSIONES.....	37
VII.RECOMENDACIONES.....	38
VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
ANEXOS.....	42

Evaluación de la toxicidad y efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”. Ayacucho-2005.

AUTOR : Bach. Juan Beto RUIZ ORE

ASESOR: Q.F. Enrique AGUILAR FELICES y Q.F. Aldo TINCO JAYO.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación estuvo orientado a demostrar la toxicidad y efecto cicatrizante de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”, realizado en los laboratorios de Farmacia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

Las hojas fueron colectadas en los meses de febrero a marzo del 2005 en la localidad de Azángaro, provincia de Huanta a 2500 m.s.n.m., luego de su identificación botánica fueron desecadas a temperatura ambiente y se preparó el extracto hidroalcohólico al 80%.

El tamizaje fitoquímico reporta la presencia de taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas, aminoácidos y azúcares reductores.

La toxicidad aguda oral del extracto hidroalcohólico se realizó mediante el método de dosis límite en ratones albinos de ambos sexos, con tres niveles de dosis (50, 200, 2000 mg/kg), los cuales fueron observados durante 14 días sin encontrarse mortalidad. Una vez sacrificados, se evaluó la reducción del peso de los órganos internos presentándose diferencias significativas ($p < 0.05$), concluyéndose que la toxicidad es independiente del sexo.

La actividad cicatrizante se determinó empleando el Test de Howes; a la dosis de 100, 200, 400 mg/kg, el mayor efecto cicatrizante se logró a 400 mg/kg (91.72%), con respecto al estándar (Cicatrin) (100%) encontrándose diferencias significativas.

Palabras clave: *Juglans neotropica* Diels, toxicidad aguda, actividad cicatrizante.

I. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional, es utilizada ampliamente y desde tiempos ancestrales en nuestro país. El conocimiento sobre salud, enfermedad, prevención y tratamiento; ha sido transmitido de una generación a otra; a través del tiempo. Este saber se basa exclusivamente en la experiencia y las observaciones. La planta *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano", es de uso frecuente como especie medicinal en casi toda la sierra del Perú, y en algunas zonas de la selva; en este sentido es necesario estudiar científicamente sus efectos con el fin de permitir su uso racional.

Las plantas medicinales constituyen un remedio curativo empleado desde la antigüedad por el hombre. Esta práctica es de gran importancia ya que amplía el arsenal terapéutico y carece de efectos significativos (Jaramillo, 1989).

Juglans neotropica Diels "nogal peruano", es utilizado tradicionalmente para curar afecciones bronquiales, tratamiento de diarrea, cicatrizantes de heridas y llagas, úlceras, diabetes, catarros, inflamaciones y úlceras de la boca. (Vander, 1972)

El presente trabajo de investigación busca contribuir al conocimiento de las bondades de esta especie medicinal para su futuro uso racional, sobre todo ahora que se observa un retorno cada vez mayor, al uso de las plantas medicinales en la terapia, para lo cual se trazo el siguiente objetivos general:

- Evaluar el efecto tóxico y cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano".

Además se planteó los siguientes objetivos específicos:

- Determinar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico mediante pruebas químicas y cromatográficas.
- Evaluar la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano".
- Precisar la concentración óptima del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano", que muestre una mayor eficiencia cicatrizante.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

En nuestro país no existe un plan estratégico que orienta la investigación y utilización en forma sistemática de los recursos vegetales que tengan como meta su incorporación definitiva al programa de Salud. No existe un inventario de recursos disponibles con este fin, no se dispone con una Farmacopea Nacional de Plantas Medicinales (Cornejo, 1986).

En el Perú desde los primeros momentos del descubrimiento y su conquista se observó que entre los súbditos del vasto imperio, se hallaba muy desarrollado la profesión de curanderos y herbolarios y que estas poseían conocimientos muy singulares sobre las propiedades medicinales y tóxicas de determinadas especies vegetales (Font Quer, 1980).

La bibliografía da cuenta de investigaciones farmacológicas referente al *Juglans neotropica* Diels siendo las siguientes:

Porturas, (1982), Realizó un "Estudio Farmacográfico del *Juglans neotrópica* Diels o "nogal peruano" donde estableció sus usos medicinales para los tratamientos de úlceras, diabetes, cicatrizante, catarros, bronquitis y como astringente.

Carhuallanqui, (2003), determinó la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y acuoso de *Juglans neotropica* Diels "nogal"; sobre cepas de

Salmonella spp, encontrándose que estas bacterias son sensibles a los componentes activos a la planta; usando como estándar el cloranfenicol a una concentración de 10 mg/ml; y asimismo, determino la presencia de los siguientes metabolitos secundarios: alcaloides, flavonoides, taninos y fenoles, antraquinonas, triterpenoides y esteroides, azúcares reductores, saponinas, aceites, aminoácidos, lactona y cumarinas.

Chanhualla, (2004) realizó un estudio sobre la “Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano” en bacterias Gram positivas causantes de infecciones respiratorias agudas, llegando a la conclusión que fue más eficaz en comparación a las penicilinas.

2.2. ASPECTOS BOTÁNICOS.

2.2.1. CLASIFICACIÓN SISTEMÁTICA.

Se realizó en el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y corresponde al Sistema de Clasificación de Engler and Prantl, modificado por Melchior en 1904 (Anexo 16).

DIVISIÓN	: Antophita (Angiospermae)
CLASE	: Dicotiledoneae
SUBCLASE	: Archyclamideae
ORDEN	: Juglandales
FAMILIA	: Juglandaceae
GENERO	: <i>Juglans</i>
ESPECIE	: <i>Juglans neotropica</i> Diels
NOMBRE VULGAR	: Nogal

2.2.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

El *Juglans neotropica* Diels “nogal”, es una especie arbórea monoica

(Ferreira, 1982). Este árbol nativo de los andes, crece en bosques naturales alcanzando hasta 30 m. con diámetros superiores a 1 metro (Lojan, 1992). Es una planta leñosa de gran porte, de tronco grueso, con grandes y abiertas ramas que forman una ancha copa (Font Quer, 1962).

La inflorescencia tiene la forma de amento, con flores estaminadas, pedunculadas y blanquecinas. El fruto es una drupa indehisciente de cáscara verde, amarga y tintórea, el endocarpio formado por dos valvas iguales y opuestas que cubren una almendra dividida en dos cotiledones (Desmarchelier, 2000).

2.2.3. HABITAT.

Crece en las huertas y riberas de los ríos de las zonas templadas, en el fondo de los valles en buenos suelos, en hondonadas protegidas contra el viento y donde hay humedad y buen drenaje; rehuye los sitios desabrigados y combatidos por fuertes vientos. En el Perú su distribución se observa entre 1000 y 3000 m.s.n.m. (Lojan, 1992).

2.2.4. USOS Y FORMAS DE APLICACIÓN.

Los usos que se dan a las hojas y frutos del nogal varían en los países: en Ecuador, la infusión de las hojas se utiliza como astringente y antidiarreico, especialmente en los niños. También se utiliza como antiséptico para lavar heridas y úlceras, y asimismo, para lavados vaginales en caso de leucorrea (Gupta, 1995). La infusión de las hojas es empleada para gargarismo como antiinflamatorio de la faringe; de igual modo, la infusión de las hojas se utiliza para bañar una o dos veces a los niños de la cintura para abajo cuando dan los primeros pasos para "endurecer los huesos" y caminen pronto; también se da este baño a las mujeres después del parto (Lojan, 1992). También la corteza del árbol, y las yemas combaten las perturbaciones del hígado, las erupciones de la piel (Bustamante, 2006).

En Colombia la infusión de las hojas y frutos sirve para teñir las canas y prevenir la caída del cabello. La infusión de las hojas se toma como depurativo de la sangre. La infusión de las raíces se toma para tratar afecciones del hígado. (Cornejo, 1986) Con la infusión de las hojas se prepara un jarabe que se endulza para tomarlo en cucharadas para la tos. Se indica que este jarabe es bueno para el tratamiento de la escrófula en estado primario (Cordova, 2001) (Basto, 2001).

Se hace hervir una hoja de nogal en un litro de leche para tomarla diariamente, dicen que los campesinos que así el sabor se parece al vino y alimenta al cerebro. Otros toman el “agua de nogal” como mate o té o agua aromática haciendo hervir una hoja en un litro de agua (Lojan, 1992).

La flora peruana tiene al *Juglans neotropica* Diels o “nogal” nativo del valle del Marañón, se cultiva como árbol ornamental. Sus hojas se usan en medicina popular para combatir las afecciones bronquiales (Ferreira, 1982).

Cornejo, (1981) señala que una de las grandes principales virtudes de esta planta radica en sus grandes propiedades tintóreas. Las hojas, frutos inmaduros, ramas tiernas y corteza del tallo; proporcionan variadas tonalidades de colores suaves de marrón – caoba; dependiendo de estos matices del tipo de muestra, la cantidad de la misma, el tipo de mordiente y el tiempo de ebullición. Hasta la fecha no se ha encontrado una especie similar en sus propiedades tintóreas que pueda suplir satisfactoriamente esta planta; por lo que urge su propagación masiva y una explotación racional y planificada no como se viene explotando actualmente de manera indiscriminada.

Como medicina se usa el pericarpio verde de los frutos y las hojas tiernas y yemas, las que se cortan en trozos pequeños y secos. La terapéutica moderna, las emplea como astringente en los tratamientos gástricos e intestinales, tónico y depurativo, calmante del sistema nervioso y hemostático. En aplicaciones

externas las preparaciones a base de nogal sirve en dermatología para curar las hinchazones o úlceras de la piel con ardor o picazón. Para neutralizar el flujo blanco se hacen irrigaciones vaginales (Romero & De la Cruz, 1997).

2.3. TOXICIDAD.

Efectos nocivos o adversos que una sustancia puede producir: puede ser aguda, sub aguda y crónica (Cotillo, 1998).

2.3.1. TOXICIDAD AGUDA.

Son los efectos adversos o mortales que produce una sustancia en un lapso de 24 horas cuando se administra en dosis elevadas. La toxicidad aguda tiene por objeto determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia. Usualmente, el punto final del estudio es la muerte del animal y la toxicidad aguda se expresa por la dosis letal 50, que viene a representar más o menos la dosis de la sustancia que produce la muerte en el 50% de los animales.

La observación de los animales se lleva a cabo después de la administración de la sustancia y dura hasta 14 días, después de los cuales los animales son sacrificados y autopsiados. En general, el test se realiza con 5 grupos de 10 animales de cada sexo, aunque existen algunos métodos abreviados que intentan reducir el número de animales a sacrificar.

La determinación de la DL_{50} se suele llevar a cabo en rata y ratón por al menos dos vías de administración entre las cinco posibles (i.v., i.m. ip. s.c. y oral). En el perro y otros animales de tamaño parecido, el punto final del estudio no suele ser la muerte del animal, sino la determinación de la dosis que produce unos severos efectos adversos.

2.3.2. TOXICIDAD SUB AGUDA.

Es la toxicidad que se produce con dosis de fármaco que individualmente no produce efectos tóxicos y puede presentarse cuando el uso de la misma

se hace por el lapso de uno a dos meses (Cotillo, 1998).

En este test, la administración del fármaco se lleva a cabo diariamente durante periodos que oscilan entre 15 días y 4 semanas. Las principales administraciones sanitarias requieren, antes de autorizar la administración de una dosis única de la sustancia al ser humano, que se hayan realizado estudios de toxicidad sub aguda en dos especies animales, una de las cuales deberá ser no roedora. En ambas especies, se suelen utilizar entre 4 y 5 dosis de sustancia (vehículo, dosis baja, media - dosis alta o vehículo - dosis baja -dosis media baja - dosis media alta - dosis alta).

En la rata se requieren al menos 10 animales de cada sexo para cada dosis y en el perro, al menos 4 animales de cada sexo. Muy frecuentemente, se añaden dos grupos satélite de animales (uno tratado con vehículo y otro con la dosis más alta) que no son sacrificados al final del estudio, sino que se les deja una o dos semanas para recuperarse las posibles lesiones inducidas por el producto.

Durante el estudio se controlan diariamente un buen número de parámetros (aspecto, comportamiento, peso, consumo de agua y alimento, examen oftalmoscópico, etc.) y al final los animales son sacrificados y autopsiados. Al inicio del estudio y antes de la autopsia, se toman muestras de sangre y orina para ser analizadas. La autopsia consiste en el examen macroscópico de las vísceras y tejidos y en la toma de especímenes para su examen anatomopatológico.

2.3.3. TOXICIDAD CRÓNICA.

Son las alteraciones funcionales que se presenta cuando se administra un fármaco por un periodo prolongado (Cotillo, 1998).

2.4. CICATRIZACIÓN,

Una cicatriz es una masa de colágeno que se produce cuando no es

posible reparar la necrosis de células parenquimatosas por regeneración. Si se destruyen las células hasta la capa basal, de la dermis o epidermis sucede una reparación con formación de cicatriz (Parakrama, 1998).

2.4.1 FASES DE LA CICATRIZACIÓN.

1. REGENERACIÓN.

Es la reconstrucción de la arquitectura original de cualquier órgano o tejido, en respuesta al daño ocasionado por el desgaste normal, o como consecuencia de abrasiones o quemaduras superficiales, no importando su extensión.

2.- REPARACIÓN.

Es la reconstrucción de los tejidos lesionados sin reestructuración de la arquitectura original, y por lo tanto dejando grados variables de distorsión, usualmente permanente y/o desorganización arquitectónica con consecuencias inevitables (Falabella, 1994).

Después de 24 horas de la lesión comienzan a proliferar los fibroblastos y las células endoteliales, formando (a los tres días), un tejido especializado (tejido granulado). El término "tejido de granulación" se debe a su aspecto granular blando en la superficie de las heridas, aunque lo más característico es el aspecto histológico (proliferación de pequeños vasos neoformados y fibroblastos), los nuevos vasos se forman por un proceso denominado angiogénesis o neovascularización en los vasos preexistentes (Cotran, 1998).

3. CICATRIZACIÓN DE HERIDAS.

La cicatrización como proceso restaurador puede producirse en forma normal o patológica, cuando es normal puede ser de dos tipos:

a.- Cicatrización por primera intención.

Es aquella que se produce en una herida aséptica y sin pérdida de sustancia (tejido) y cuyos bordes vuelven a ponerse en contacto. Este tipo de

cicatrización, es la que ocurre en la mayoría de las incisiones quirúrgicas (Hernández, 1991).

El proceso de cicatrización por primera intención es la siguiente:

- A las 24 horas: aparecen los neutrófilos en el margen de la incisión desplazándose hacia el coagulo de fibrina. Los bordes de la epidermis aumentan de grosor por la actividad mitótica de las células basales.
- A las 48 horas: brotes de células epiteliales migran y crecen a lo largo de la superficie de corte de la dermis, depositando material de membrana basal a medida que se desplazan. Se lesionan en la línea media, por debajo de la costra, produciéndose una capa epitelial continua pero fina.
- A los 3 días: los neutrófilos han sido sustituidos en gran parte por macrófagos, el tejido de granulación invade progresivamente el espacio de la incisión. Las fibras de colágeno están ahora presentes en los márgenes en un principio orientados verticalmente por lo que no se unen los bordes de la incisión. La proliferación epitelial continua y sigue aumentando de grosor la capa de epidermis.
- A los 5 días: el espacio de la incisión esta ocupado por tejido de granulación. La neovascularización es máxima, las fibras de colágeno son más abundantes y comienzan a sellar la incisión. La epidermis recupera su espesor normal y la diferenciación de las células de la superficie da lugar a una arquitectura epidérmica madura y queratinizada.
- Durante la segunda semana se produce una continua acumulación de colágeno y proliferación fibroblástica. El infiltrado leucocitario, el edema y el aumento de la permeabilidad vascular han desaparecido en gran parte. En este momento comienza el largo proceso de blanqueamiento (o palidez) que se debe al aumento de fibras colágenas en la cicatriz.
- Al final del primer mes la cicatriz esta formada por tejido conjuntivo

desprovisto de células inflamatorias, cubiertas ahora por un cicatriz intacta (Cotran, 1998).

b.- Cicatrización por segunda intención o granulación.

Es aquella que se producen en heridas sépticas, con pérdidas de sustancia y cuyos bordes no se ponen en contacto; es cuando la pérdida de células y tejidos es más extensa, como ocurre en el infarto, en la ulceración inflamatoria, en los abscesos y en las heridas superficiales con grandes defectos, el proceso de reparación es más complicado. Hay presencia de un gran defecto tisular que tiene que ser rellenado.

La regeneración de las células parenquimatosas no restablece completamente la arquitectura original. Para completar la reparación crece abundante tejido de granulación desde los márgenes.

En la actualidad la diferencia entre estas dos, es solamente de grado, ya que en la secuencia del proceso ambos son esencialmente iguales. Este procedimiento se da en tres fases que interaccionan: (Hernandez, 1991).

- Fase de actividad celular.
- Fase de actividad vascular.
- Fase de depósito de sustancias y fibras intracelulares.

(Cotran, 1998).

2.4.2. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA CICATRIZACIÓN.

La curación de las heridas es un proceso complejo, en el que participan diversos procesos como inducción de un proceso inflamatorio agudo por la propia herida, la regeneración, migración y proliferación de las células parenquimatosas y del tejido conjuntivo, la síntesis de proteínas de la membrana extracelular, el remodelaje del tejido conjuntivo y de los componentes parenquimatosos, así como la colagenización y reforzamiento de la cicatriz. Los mecanismos subyacentes a estos fenómenos son: los mediadores de la

inflamación aguda, el papel que desempeña los factores de crecimiento y las interacciones célula – membrana extracelular en la emigración, proliferación y diferenciación celular, así como los mecanismos de angiogénesis y fibrosis de la inflamación crónica.

El depósito de matriz del tejido conjuntivo (colágeno), su remodelaje es una cicatriz y el reforzamiento de la misma son los efectos finales del proceso organizado de reparación de heridas (Cotran, 1998).

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. UBICACIÓN.

El estudio se llevó a cabo en los laboratorios de Farmacia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, ubicada en la provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, a una altitud de 2750 m.s.n.m., durante los meses de marzo a junio del año 2005.

3.2. MATERIALES.

3.2.1. MATERIAL VEGETAL.

- 500 gramos de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano" en un estado de madurez, con presencia de inflorescencias y frutos, obtenida en la Localidad de Azángaro, provincia de Huanta, situada aproximadamente a los 2500 m.s.n.m.

3.2.2. MATERIAL BIOLÓGICO.

- 70 ratones albinos consanguíneos, de ambos sexos, adquiridos en el Instituto Nacional de Salud (INS), dependencia del Ministerio de Salud (MINSA), en la ciudad de Lima; con una edad aproximada de 9 semanas y una masa corporal de 20 ± 2 g, los cuales fueron adaptados a las condiciones de bioterio y alimentados a base de cebada, maíz y agua *ad libitum*.

3.3. METODOLOGÍA.

3.3.1. MÉTODOS DE PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL.

a.- Muestra desecada.

La muestra recolectada se secó en una superficie plana bajo sombra y buena ventilación por un mes a temperatura ambiente bien extendida para evitar su descomposición. Al mismo tiempo se cambio el papel de soporte cada 24 horas.

b.- Secado y Molienda.

La muestra se trituró empleando un mortero, con la finalidad de reducirla hasta un polvo fino, luego con un tamiz de 0.125 de diámetro se separó restos celulares.

c.- Preparación del extracto hidroalcohólico al 80%.

Se realizó de acuerdo al método descrito en el Manual de Técnicas de Investigación CYTED (1995). Se maceró 500 g. de hojas con una mezcla de 1200 mL de etanol de 96° y 300 mL de agua destilada por un periodo de 07 días, facilitando la extracción mediante agitaciones esporádicas y protegiéndolo de la acción de la luz; transcurrido este tiempo se realizó el filtrado y el residuo obtenido fue sometido a dos extracciones más. El filtrado se realizó al vacío con la ayuda de un embudo de Büchner y papel de filtro Whatman N° 01.

d.- Tamizaje Fitoquímico del Extracto hidroalcohólico.

d.1. Pruebas Químicas.

Se siguió la metodología recomendada por (Miranda y Cuellar 2000). (Anexo N° 14).

d.2. Pruebas Cromatográficas

Este procedimiento se efectuó teniendo en cuenta la técnica referida por (Wagner, H. y Bladt, S. 1996).

➤ Muestra : extracto hidroalcohólico al 80% de hojas de "nogal "

- Soporte : silicagel G tipo 60 en base de vidrio, 5 x 20 cm.
- Fase móvil : acetato de etilo, ácido gálico, ácido acético glacial, agua
(100:11:11:26)
- Revelador : Cloruro férrico.

3.3.2 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA.

3.3.2.1 MÉTODO DE DOSIS LÍMITE.

Se siguió la técnica descrita por Rodríguez (2004). Se formó 4 grupos de ratones mediante selección aleatoria (tres experimentales y un control) conformado por 6 animales cada uno, 3 de cada sexo. El extracto hidroalcohólico al 80% se resuspendió en carboximetilcelulosa al 1%, administrándose dosis únicas de 2000, 200 y 50 mg/kg (cada dosis en cada grupo), vía oral, retirándose la comida 6 horas antes del ensayo; el grupo control sólo recibió el vehículo. La administración se realizó mediante sonda orogástrica (Anexo 18).

Los animales fueron observados durante 14 días, al finalizar este periodo se procedió al sacrificio para realizarles la autopsia, y se efectuó un examen macroscópico de órganos principalmente: corazón, riñón, bazo, pulmón e hígado. El peso corporal se controló al inicio y al final del experimento (Wallace, H. 1989), (MSP, 1993).

3.3.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAR LA TOXICIDAD AGUDA.

Tratamientos				
Grupos	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Conc.	2000mg/Kg.	200mg/Kg.	50 mg/kg.	Blanco
Machos	R3	R3	R3	R3
Hembras	R3	R3	R3	R3

Nota:

Los grupos I, II y III corresponden a los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano", y el grupo IV corresponde al blanco.

3.3.3. ESTUDIO FARMACOLÓGICO.

3.3.3.1 TEST DE CICATRIZACIÓN POR EL METODO DE HOWES E.

Se depiló el lomo a los ratones en un área aproximada de 2 cm², 24 hrs. antes del Test, con el fin de descartar una reacción alérgica a la crema depiladora.

1. Se pesó los ratones y se les colocó en jaulas individuales.
2. Se anestesió al animal con Fenobarbital Sódico (75mg/Kg.), por Vía Intraperitoneal.
3. Luego de desinfectar el área depilada se realizó una incisión de 1 cm. de largo en el tercio del lomo y perpendicular al eje longitudinal del ratón.
4. Se afrontó los bordes de la herida con un punto de sutura de nudo triple.
5. Se administró en forma tópica la 1ra. dosis del tratamiento (El extracto hidroalcohólico al 80% se resuspendió en carboximetilcelulosa al 1%).
se repite cada 12 horas hasta el término del periodo de aplicación.
6. Pasadas las 96 hrs. se procedió a sacrificar al ratón con una sobredosis de Fenobarbital Sódico.
7. Posteriormente al sacrificio, se quitó el punto de sutura y se colocó al animal en posición de cubito ventral sobre el aparato de tensión.
8. Se insertó las agujas del aparato de Tensión a 0.50 cm. de los bordes de la herida y se empleó una bureta (previamente enrasada con agua destilada) para dejar caer el líquido al vaso hasta que se genera una tensión que abre la herida en toda su longitud.
9. Se anotó el nivel alcanzado.
10. Luego se determinó el porcentaje de la actividad cicatrizante.

(Howes E, 1929).

Es la expresión de la resistencia que muestra la cicatriz al ser sometido a una tensión, y que se expresa en porcentaje de la siguiente manera:

ANEXOS

