

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**Efecto cicatrizante de los compuestos fenólicos aislados
de las flores de *Agave americana* "cabuya".**

Ayacucho 2013.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICA

PRESENTADO POR
Bach. PRADO HUAMANÍ, Iveth

AYACUCHO – PERÚ
2015

Tesis
Far 421
Pra
Ej. 2

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

RD N° 053 –2014– UNSCH – FCB2015 UNSCH –FCB-D

Bachiller Iveth Prado Huamani

En la ciudad de Ayacucho a las once días del mes de diciembre del dos mil quince, siendo las 10:00 am en el auditorio de la facultad de ciencias biológicas en la ciudad de huamanga se reúnen los miembros del jurado de sustentación de la tesis titulada "Efecto cicatrizante de los compuestos fenólicos aislado de las flores de Agave americana "cabuya" Ayacucho-2013" conformado por los siguientes miembros:

Mg. José Diez Macavilca - Presidente

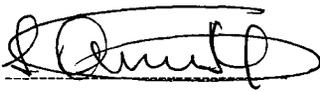
Blga Laura Aucasime Medina -Miembro

Dr. Edwin Carlos Enciso Roca -Miembro

Presidencia es asumida por el Mg. José Diez Macavilca y la secretaria asumiendo el profesor Américo Quinteros Quispe, acto seguido el presidente solicita al secretario dar lectura a la resolución y documentos que refrenda el acto de sustentación, a continuación el presidente invita a la sustentante a dar inicio con la exposición de la tesis en el tiempo de reglamento. Concluida la exposición de la sustentación el presidente invita a la sustentante y al público abandonar el auditorio momentaneamente para el proceso de liberación y calificación en los siguientes rubros:

Jurado	Nota de texto	Nota de exposic.	Nota de preg.	Promedio
Mg. José Diez Macavilca	17	17	17	17
Blga Laura Aucasime Medina	17	17	16	17
Dr. Edwin C. Enciso Roca	17	17	17	17

Concluyéndose en aprobar por unanimidad al Bach. Iveth Prado Huamaní con la nota promedio de DIECISIETE (17) como se plasma en los formatos de evaluación de cada jurado y las hojas de resumen de las calificaciones siendo las 12:00 pm se concluye con el acto de sustentación y evaluación para ello se deja constancia y refrenda con la firma de los miembros del jurado y secretario docente quienes dan fe del acto.



Prof. Laura Aucasime Medina
Miembro Jurado



Prof. Edwin C. Enciso Roca
Miembro Jurado



Prof. José Manuel Diez Macavilca
Presidente



Prof. Américo Quinteros Quispe
Secretario Docente

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres,
hermanos y a mi hija.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, forjadora de profesionales para la vida.

A la Facultad de Ciencias de la Salud y a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica por acogerme en sus aulas y a los profesores quienes con sus amplios conocimientos me formaron y guiaron mi formación profesional.

Al Mg. QF. José Manuel Diez Macavilca, docente de la EP de Farmacia y Bioquímica de la UNSCH, por su asesoría y conducción en el presente trabajo.

A todas las personas que me brindaron su apoyo, sugerencias y consejos durante el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. <i>Agave americana</i> "cabuya"	3
2.1.1. Descripción botánica de <i>Agave americana</i>	3
2.1.2. Clasificación taxonómica	4
2.1.3. Propiedades medicinales atribuidas por la medicina tradicional	4
2.2. Antecedentes de estudio	4
2.2.1. Estudio farmacológico de algunas especies del género <i>Agave</i>	4
2.2.2. Estudios químicos del género <i>Agave</i>	5
2.3. La herida y la cascada de cicatrización	5
2.3.1. Fase hemostática.	5
2.3.2. Fase inflamatoria.	6
2.3.3. Fase proliferativa.	6
2.3.4. Fase de remodelación	6
2.4. Principales metabolitos secundarios que participan en la cicatrización	7
2.4.1. Flavonoides	7
2.4.2. Taninos	8
III. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1. Ubicación	9
3.2. Población y muestra	9
3.2.1. Población	9
3.2.2. Muestra	9
3.2.3. Unidad experimental	9
3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos	9
3.3.1. Recolección de la muestra	9
3.3.2. Obtención del extracto hidroalcohólico	9
3.3.3. Tamizaje fitoquímico	10
3.3.4. Extracción e identificación de los flavonoides	10
3.3.5. Identificación de los flavonoides	10
3.4. Diseño experimental	10
3.5. Determinación del efecto cicatrizante	11
3.7. Análisis estadístico	12
IV. RESULTADOS	13
V. DISCUSIÓN	19
VI. CONCLUSIONES	23
VII. RECOMENDACIONES	25
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
ANEXOS	31

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Diseño experimental para la evaluación del efecto cicatrizante de los flavonoides aislados de <i>Agave americana</i> . Ayacucho 2013.	10
Tabla 2. Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las flores de <i>Agave americana</i> . Ayacucho, 2013.	14

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Fases de la cicatrización normal de heridas cutáneas.	7
Figura 2.	Porcentaje de efecto cicatrizante por efecto de los flavonoides aislados de las flores de <i>Agave americana</i> "cabuya". Ayacucho, 2014.	15
Figura 3.	Curvas espectrales correspondientes a los flavonoides aislados de las flores de <i>Agave americana</i> "cabuya". Ayacucho, 2014.	16
Figura 4.	Cromatografía en capa fina del visto bajo luz ultravioleta de los flavonoides aislados de las flores de <i>Agave americana</i> "cabuya". Ayacucho, 2014.	17

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Certificado de identificación botánica	32
Anexo 2. Diseño para la identificación de metabolitos secundarios de extracto hidroalcohólico de las flores de <i>Agave americana</i> “cabuya”.	33
Anexo 3. Flujograma del proceso de extracción de los compuestos fenólicos de las flores de <i>Agave americana</i> “cabuya”.	34
Anexo 4. Flores de <i>Agave americana</i> “cabuya”	35
Anexo 5. <i>Agave americana</i> “cabuya” en su hábitat natural	36
Anexo 6. Extracto hidroalcohólico de las flores de <i>Agave americana</i> “cabuya”	37
Anexo 7. Porcentaje de efecto cicatrizante por efecto de los flavonoides aislados de las flores de <i>Agave americana</i> “cabuya”. Ayacucho, 2014.	38
Anexo 8. Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett del porcentaje de efecto cicatrizante de los flavonoides aislados de las flores de <i>Agave americana</i> “cabuya”.	39
Anexo 9. Prueba de comparaciones múltiples de Duncan para las medias del porcentaje del efecto cicatrizante de los flavonoides aislados de las flores de <i>Agave americana</i> “cabuya” al 0,2; 0,5 y 1%.	40
Anexo 10. Matriz de consistencia	41

RESUMEN

Una herida es una pérdida de continuidad normal de los tejidos, mientras que el poder de autorreparación que tienen todos los seres vivos se denomina cicatrización. Las medidas que se han implementado para el cuidado de este tipo de lesiones han establecido históricamente las bases de la terapéutica actual, la misma que sigue desarrollándose a través de la búsqueda de moléculas que promuevan la cicatrización de manera mucho más efectiva y justamente las plantas ofrecen dicha posibilidad de manera importante. *Agave americana* en nuestro medio ofrece una gran alternativa dado los antecedentes tradicionales de su empleo como cicatrizante. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto cicatrizante de los flavonoides aislados del extracto hidroalcohólico de las flores de *Agave americana* "cabuya", realizado en los laboratorios del área de Farmacia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de enero a marzo de 2014. La muestra fue colectada en el distrito de Ayacucho, región Ayacucho. Del análisis cromatográfico y espectral se identificaron flavonoles y rutina. El efecto cicatrizante se determinó mediante el método tensiométrico administrándose flavonoides aislados de las flores de *Agave americana* a concentraciones de 0,2; 0,5 y 1% y comparados frente al estándar Dermaclín Plus. El mayor porcentaje de efecto cicatrizante se observó con la concentración de 0,5%, alcanzando un 67,1%. El porcentaje de efecto cicatrizante de los flavonoides a la concentración de 0,5% con un 67,1% fue significativamente mayor que el estándar Dermaclín Plus ($p < 0,05$), y al 1% con un 63,2%, estadísticamente similar ($p > 0,05$). Se concluye que los flavonoides aislados del extracto hidroalcohólico de las flores de *Agave americana* "cabuya" poseen efecto cicatrizante lo que confirma su uso tradicional y representa una buena alternativa en la curación de heridas.

Palabras clave: Flavonoides, Efecto cicatrizante, *Agave americana*, "cabuya"

I. INTRODUCCIÓN

En muchos sistemas de salud de América, Asia y Europa es frecuente el uso de drogas vegetales y fitomedicamentos como parte integral de la medicina convencional¹ y nuestro país no es la excepción ya que nuestra medicina tradicional hace uso de un gran número de especies vegetales para curar sus enfermedades y síndromes, desde los más leves hasta los más graves.

La curación de heridas es un tema tan antiguo como la historia del hombre. El hombre de Neandertal en Irak 60000 años a.C. usó hierbas contra las quemaduras. En el antiguo Egipto ya se usaban como apósitos el barro, gomas, resinas, miel, mirra y sustancias oleosas e Hipócrates trataba las heridas con vino, cera de abejas, roble sagrado, aceite y azúcar.²

Una herida es una pérdida de la continuidad normal de los tejidos, mientras que el poder de autorreparación que tienen todos los seres vivos se denomina cicatrización.³ Las medidas que se han implementado para el cuidado de este tipo de lesiones han establecido históricamente las bases de la terapéutica actual, la misma que sigue desarrollándose a través de la búsqueda de moléculas que promuevan la cicatrización de manera mucho más efectiva y justamente las plantas ofrecen dicha posibilidad de manera importante.

Agave americana es una especie de amplio uso en la medicina tradicional en nuestro medio. Existen evidencias en la literatura de que esta especie posee múltiples propiedades medicinales dentro de las que destaca la curación de heridas,⁴ por lo que ha sido objeto de amplios estudios destinados a demostrar científicamente dichas propiedades terapéuticas.

Cabe destacar que este trabajo se desarrolló en los laboratorios de Farmacognosia y Farmacología de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, en la Ciudad de Ayacucho, Perú. Cada etapa del trabajo se ha

desarrollado en base a procedimientos y protocolos estandarizados de laboratorio de tal forma que los resultados reflejan la confiabilidad del experimento.

En vista de tales evidencias y como un aporte al conocimiento científico de la "cabuya", se emprendió este trabajo, el mismo que se condujo en aras de lograr los siguientes objetivos:

- Evaluar el efecto cicatrizante de los compuestos fenólicos aislados de las flores de *Agave americana* "cabuya".
- Aislar los compuestos fenólicos de las flores de *Agave americana* "cabuya".
- Identificar los compuestos fenólicos presentes en las flores de *Agave americana* "cabuya", mediante pruebas químicas, cromatográficas y espectrales.
- Determinar la concentración de los compuestos fenólicos aislados de las flores de *Agave americana* "cabuya" con mayor efecto cicatrizante, y
- Comparar el porcentaje de efecto cicatrizante de los compuestos fenólicos aislados de las flores de *Agave americana* "cabuya" con un medicamento de referencia (Dermaclín Plus®).

II. MARCO TEÓRICO

2.1. *Agave americana* “cabuya”

2.1.1. Descripción botánica

Agave americana es una planta herbácea, perenne, monocotiledónea, de hojas simples grandes, basales. Flores bisexuales, de perigonio corolino, formado por seis tépalos amarillentos carnosos, dispuestos en dos ciclos: tres internos y tres externos. Hojas simples, enteras, gruesas de color verde azulado, cubierta por una gruesa cutícula, de bordes espinosos; terminado en una espina fuerte a la que están adheridas interiormente un conjunto de fibras bastante resistentes. Dichas hojas presentan una cubierta cerosa e impermeable llamada cutícula. El tallo es corto, cilíndrico, cuyo ápice está cubierto por un penacho de grandes hojas, casi a flor de tierra. Cuando la planta alcanza la madurez y las hojas posteriores son más cortas, aparece por el medio el llamado escapo floral, a manera de un falso tallo cilíndrico de entrenudos largos que llevan hojas cortas, triangulares pobres en clorofila y con el ápice espinoso. Dicho escapo floral contiene un gran racimo de flores bisexuales pedunculadas en forma de candelabro. Estas plantas después de florecer una sola vez en su vida, mueren. Durante largo tiempo siguen acrecentando la roseta de sus hojas basales y algunas hasta producen un corto tronco, pero durante este tiempo nunca florecen. El androceo, consta de seis estambres libres. El gineceo, de ovario ínfero, tricarpelar concrecente, trilocular con numerosos óvulos en cada celda. El fruto suele ser una cápsula valvar con semillas aplanadas. Se propaga vegetativamente a través de bulbillos.⁵

2.1.2. Clasificación taxonómica

DIVISIÓN	: MAGNOLIOPHYTA
CLASE	: LILIOPSIDA
SUB CLASE	: LILIIDAE
ORDEN	: LILIALES
FAMILIA	: AGAVACEAE
GENERO	: Agave
ESPECIE	: Agave americana L.
Nombre Vulgar	: “cabuya”

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de ciencias biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (Anexo N 01).

2.1.3. Propiedades medicinales atribuidas por la medicina tradicional

Agave americana se ha utilizado ampliamente en la medicina tradicional. El zumo de las raíces se utiliza contra llagas canceradas o inflamadas, podridas e inveteradas, sin excepción de las venéreas, con singular alivio, y por lo común con una completa curación de ellas.⁴ Las hojas cortadas en porciones adecuadas y previamente sozadas se emplean para aliviar los calambres y reumatismo.⁵

2.2. Antecedentes de estudio cicatrizante

Existen innumerables estudios sobre el efecto cicatrizante de varias especies vegetales. En nuestro medio destacan los siguientes:

- Actividad cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* “yawar soqo”.⁶
- Efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas y raíces de *Gamochaeta americana* (Mill.) Wedd. “qeto qeto”, en ratones albinos.⁷
- Efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las flores y hojas de *ligaria cuneifolia* “tullma”, en ratones albinos.⁸
- Efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de los tallos y hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni “estevia”.⁹
- Actividad cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jungia paniculata* (D C) A. Gray “matico de puna”, en ratones albinos.¹⁰

2.2.1. Estudio farmacológico de algunas especies de Agave

El extracto metanólico del *Agave sisalana* mostró un fuerte efecto sobre *Shigella*

dysenteriae y moderadamente sobre *Bacillus atrophaeus*.¹¹ El extracto de las hojas y flores de *Agave attenuata* también mostró un buen potencial antioxidante medido por su actividad captadora del radical DPPH e inhibición de la peroxidación lipídica.¹²

2.2.2. Estudios químicos de algunas especies de Agave

Estudios fitoquímicos de especies del género *Agave* han revelado su riqueza importante en compuestos fenólicos, incluyendo flavonoides, homoisoflavonoides y ácidos fenólicos, así como glucósidos de flavonol (kaempferol-3-O-glucósido y kaempferol-3-O-rutinósido) presentes en las flores en *Agave americana*.¹³ Los extractos crudos de tépalos y anteras de *Agave durangensis* reveló en total ocho flavonoles (cinco glicósidos de quercetina y tres glicósidos de canferol), las flores tuvieron el contenido más alto de flavonoides (1210,4.µg/extracto seco) y el perfil de flavonoides más complejo (ocho compuestos).¹⁴ Así mismo, se han identificado polifenoles en *Agave americana*, por lo que representa una fuente importante de este metabolito.¹⁵ Así mismo, estudios sobre el extracto acuoso del zumo de *Agave sisalina* puso en evidencia la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas y glucósidos cardíacos¹¹, en tanto que el extracto metanólico de las hojas de *Agave attenuata* mostró niveles apreciables en cuanto a su contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides.¹² Los fenoles presentes en el género *Agave* también tienen un gran potencial como marcadores quimiotaxonómicos específicos.¹³

2.3. La herida y la cascada de cicatrización

Las heridas son lesiones traumáticas de la piel con solución de continuidad de la misma. La cicatrización cutánea corresponde a la compleja interacción entre muchos tipos de células (con sus citoquinas o mediadores) y la matriz extracelular³, lo que constituye una respuesta inmune innata a la lesión tisular con el objetivo de restaurar la integridad del tejido y la función de barrera de la piel.

2.3.1. Fase hemostática.

Los microvasos lesionados se contraen, la cascada de coagulación se activa, las plaquetas se agregan, y se forma un coágulo de fibrina, el cual se acopla a la herida y sirve como una matriz provisional. Se da la liberación de numerosas citoquinas, quimioquinas, y factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de

crecimiento celular endotelial vascular y factor de crecimiento transformante β 1. Desde el coágulo y el tejido circundante se promueve la migración de células inflamatorias al sitio de la lesión.¹⁶

2.3.2. Fase inflamatoria.

Se caracteriza por la infiltración secuencial de los neutrófilos, monocitos y linfocitos. Los neutrófilos, cuyo máximo se da a las 24 horas, fagocitan invasores infecciosos y restos de tejido desvitalizado. Los monocitos migran a la herida y se diferencian en macrófagos maduros que podrían regular la respuesta de curación de heridas, ya que eliminan desechos, células apoptóticas, neutrófilos viejos y promueven la conclusión de la inflamación segregando citoquinas y factores de crecimiento que reclutan y activan otras células implicadas en el proceso de reparación. Los macrófagos pro-inflamatorios M1 activados están presentes durante la fase inflamatoria temprana, mientras que los macrófagos antiinflamatorios M2 activados (promotores de la regeneración tisular por queratinocitos y estimuladores de la angiogénesis y síntesis de matriz extracelular) prevalecerán después de la reparación. El papel de los linfocitos, (últimas células inflamatorias para entrar en la herida) no se ha definido claramente, pero podrían influir en el proceso de cicatrización de heridas mediante interacción célula-célula directa con los macrófagos, plaquetas, queratinocitos y fibroblastos, y/o a través de la liberación de citoquinas conocidas por jugar un papel en la remodelación tisular.¹⁶

2.3.3. Fase proliferativa.

Se caracteriza por proliferación y migración de queratinocitos que involucran reepitelización. Se sustituye la matriz de fibrina provisional con tejido de granulación. Los fibroblastos proliferan en respuesta a factores de crecimiento y la síntesis de componentes de la matriz extracelular, como colágeno tipo III y I, glicosaminoglicanos y proteoglicanos. La angiogénesis, inducida por hipoxia, se extiende hacia la nueva matriz, formando una densa red de capilares que suministra oxígeno y nutrientes a las células de la herida. Formado el tejido de granulación, algunos fibroblastos se diferencian en miofibroblastos, que expresan actina y son actores clave en la contracción de la herida y la remodelación de la matriz extracelular.¹⁶

2.3.4. Fase de remodelación.

Es esencial para la restauración de la funcionalidad completa del tejido. Los

componentes de la matriz extracelular son constantemente degradados y nuevamente sintetizados para lograr la arquitectura aproximada del tejido normal. La fracción de colágeno tipo III disminuye con el tiempo, y se sustituye por la más fuerte de colágeno de tipo I, aumentando la resistencia a la tracción, pero no alcanza más de 80% de la piel no herida. La densidad microvascular vuelve a la normalidad por la regresión de los capilares recién formados.¹⁶

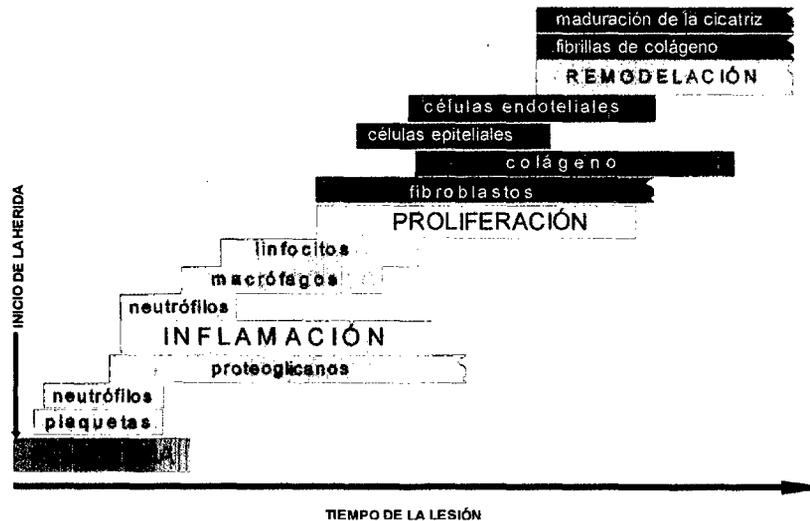


Figura 1. Fases de la cicatrización normal de heridas cutáneas.¹⁷

2.4. Polifenoles cuaternarios derivados de bioflavonoides cítricos 1% (Dermaclín Plus®, Laboratorios Quilab).

- **Polifenoles cuaternarios derivados de bioflavonoides cítricos.** Tienen acción bactericida, fungicida, antiviral y antiparasitaria extremadamente potente y de amplio espectro efectivo y potente acción residual.
- **Lidocaína.** Es un anestésico que aplicado tópicamente sobre la piel o submucosa ejerce una potente acción analgésica en la zona de aplicación. Actúa bloqueando la iniciación y conducción del impulso nervioso al disminuir la permeabilidad de la membrana neuronal al sodio iónico.

2.5. Principales metabolitos secundarios cicatrizantes

2.5.1. Flavonoides

La principal actividad atribuida a los flavonoides es la de ser "venoactivos", es decir, ser capaces de disminuir la permeabilidad de los capilares sanguíneos y aumentar su resistencia. Tienen como núcleo básico al 2-fenil cromano. Farmacológicamente son antioxidantes (por quelación de metales), acción

antiespasmódica, antiinflamatoria, anticoagulante indirecto de la sangre, acción diurética, antiedematoso, hipocolesterolemia.¹⁸

Por ejemplo, se ha demostrado que los flavonoides purificados de *Vitex leucoxylo* poseen actividad cicatrizante al reducir significativamente la resistencia a la rotura de heridas.¹⁹

2.5.2. Taninos

Los taninos son polifenoles, distribuidos en taninos condensados e hidrolizables, con una inmensa variabilidad estructural, alcanzando altos grados de polimerización.²⁰

Los taninos son conocidos desde la antigüedad por sus propiedades curtientes, astringentes, antiinflamatorias y antidiarreica.²¹ Las proantocianidinas o taninos condensados son un grupo de bioflavonoides polifenólicos biológicamente activos que son sintetizados por muchas plantas y se ha demostrado que facilitan la cicatrización de heridas²², tanto bajo la forma de extracto como de formulaciones semisólidas.²³ Se postula que al limitar la pérdida de fluidos e impedir las agresiones externas, los taninos favorecen la regeneración de los tejidos en caso de heridas superficiales o quemaduras.¹⁸

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

El presente trabajo de Investigación se realizó en los laboratorios de Farmacología y Farmacognosia de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de agosto a diciembre de 2013.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

Flores de *Agave americana* "cabuya" que crece en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, región Ayacucho.

3.2.2. Muestra

2.5 kg de flores de *Agave americana* "cabuya".

3.2.3. Unidad experimental

30 ratones albinos, *Mus musculus*, machos, de dos meses de edad y de 20 +/- 25 g de peso, que fueron adquiridos del Instituto Nacional de Salud-Centro Nacional de Productos Biológicos, Lima.

3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos

3.3.1. Recolección de la muestra

La recolección, selección y secado de las muestras se realizó de acuerdo a los procedimientos establecidos por Villar del Fresno. Se seleccionaron las flores intactas; se lavaron con abundante agua y se secaron a la sombra, en una habitación ventilada, sobre papel periódico, aproximadamente por una semana.²⁴

3.3.2. Obtención del extracto hidroalcohólico

2,5 kg de flores de *Agave americana* "cabuya" fueron molidos en un mortero de porcelana. El material seco y molido obtenido se extrajo por maceración durante

7 días con etanol de 80°. Luego se filtró con papel Whatman N° 40 y la solución hidroalcohólica se concentró a presión y temperatura reducida hasta sequedad en una estufa a una temperatura no mayor de 50°C.

3.3.3. Tamizaje fitoquímico

Para la identificación y reconocimiento de los diferentes metabolitos secundarios presentes en el extracto se realizaron las reacciones de coloración y precipitación.²⁵

3.3.4. Extracción e identificación de los flavonoides

El extracto hidroalcohólico seco se reconstituyó con agua destilada y se trató con éter de petróleo para eliminar grasas, ceras, pigmentos y otros metabolitos que posiblemente interfieran en la extracción de compuestos fenólicos. La extracción líquido-líquido con acetato de etilo se hizo utilizando un embudo de separación, para recuperar finalmente la fracción de acetato de etilo y evaporarla a sequedad (fracción flavónica).²⁶

3.3.5. Identificación de los flavonoides

a. Pruebas cualitativas

Reactivo de cloruro férrico: se añadió unas gotas de cloruro férrico 1%, sobre la fracción de acetato de etilo.

b. Cromatografía en capa fina (CCF)

La fracción de acetato de etilo se reconstituyó con 0,5 ml de metanol y se aplicó en la base de la placa cromatográfica con capilares de vidrio.

Se llevó a una cubeta cromatográfica conteniendo como sistema de solventes BAW (butanol, ácido acético y agua) en una proporción de 4:1:5.²¹

Se retiró la placa y dejó secar al aire para luego observar bajo lámpara de luz UV. Se reveló con cloruro férrico 1%.

3.4. Diseño experimental

Los animales de experimentación fueron agrupados de manera aleatoria en cinco grupos, donde cada grupo estuvo comprendido de seis animales (Tabla 1):

Grupo I: Blanco o control negativo (gel base, desprovisto de compuestos fenólicos)

Grupo II: Estándar o control positivo (Dermaclín Plus® que son polifenoles cuaternarios derivados de bioflavonoides cítricos 1%)

Grupos III, IV y V: Geles al 0,2; 0,5 y 1,0% de los compuestos fenólicos aislados de las flores de *Agave americana* "cabuya", respectivamente.

Tabla 1. Diseño experimental para la evaluación del efecto cicatrizante de los flavonoides aislados de *Agave americana*. Ayacucho 2013.

Grupo	Gel base	Dermaclin plus [®]	Concentración (%)		
			0,2	0,5	1,0
Blanco	X				
Grupo control		X			
Tratamiento 1			X		
Tratamiento 2				X	
Tratamiento 3					X

3.5. Determinación del efecto cicatrizante

a. Formulación de los geles

Se formuló geles a base de los compuestos fenólicos aislados del extracto hidroalcohólico de *Agave americana* "cabuya" al 0,2; 0,5 y 1,0 %. Se reconstituyó 0,2; 0,5 y 0,1 g de compuestos fenólicos con 20 ml de agua destilada y luego se enrazó con agua destilada csp 100 ml, soluciones que se calentaron para luego añadir un gramo de carboximetilcelulosa y finalmente metilparabeno como preservante. De otro lado, se formuló también un gel base (blanco) disolviendo a fuego lento 1g de carboximetilcelulosa más agua destilada csp 100 ml y la incorporación final de metilparabeno.

b. Test de cicatrización

Se fundamenta en la aplicación de una fuerza de tensión ejercida (medida en mililitros de agua) necesaria para abrir una herida incisa de 1cm de longitud producida en el tercio superior del lomo del ratón.²⁷

Se siguió el procedimiento siguiente:

- Se depiló el lomo de los ratones en un área aproximada de dos centímetros cuadrados con el depilatorio comercial Opilca[®].
- Se pesó los ratones y se colocaron en jaulas individuales.
- Se administró por vía SC una dosis de 74 mg/Kg de pentobarbital a cada ratón para una buena manipulación.
- Se les practicó una incisión de un centímetro de largo en el lomo de cada ratón, previa desinfección de la zona.
- Se hizo puntos de sutura con un punto triple utilizando hilo de sutura no reabsorbible Mersilk[®] 3/0.

- Se administró la primera dosis de tratamiento a cada grupo: compuestos fenólicos al 0,2; 0,5 y 0,1%; blanco (gel); medicamento de referencia (Dermaclín Plus®) cantidad necesaria hasta recubrir la herida cada 8 horas, por un período de tres días.
- Luego de 72 horas de tratamiento se procedió a sacrificar a los ratones con una sobredosis de pentobarbital sódico 1%.
- Se retiraron los puntos de sutura y se colocó los animales en posición decúbito ventral sobre el aparato de tensión.
- Se insertaron las agujas del aparato de tensión a 0,5 cm de los bordes de la herida y el agua contenido en la bureta se dejará caer al vaso hasta que genere una fuerza de tensión que abra la herida en toda su longitud.
- Se anotó el nivel de agua alcanzado.
- Se determinó el porcentaje de la actividad que es la expresión de la resistencia que muestra la cicatriz al ser sometido a una tensión, y que es expresada en porcentaje de la siguiente manera.

$$\% EC = \frac{X_{tto} - X_b}{X_{tto}} \times 100$$

Donde:

%EC : Porcentaje de efecto cicatrizante

X_{tto} : Fuerza promedio para abrir la herida del grupo tratado con los extractos

X_b : Fuerza promedio para abrir la herida del grupo sin tratamiento (blanco).

3.7. Análisis estadístico

La diferencia significativa existente entre los tratamientos fue evaluada mediante análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significación estadística de 95% ($p < 0,05$). Las comparaciones entre los tratamientos se hizo el test de Duncan y frente al estándar con el test de Dunnett, para cuyo efecto se usó del programa SPSS versión 21.

IV. RESULTADOS

Tabla 2. Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las flores de *Agave americana*. Ayacucho, 2013.

Ensayo	Metabolito	Observación	Valoración
Catequinas	Catequinas	Fluorescencia verde esmeralda	+
Fehling	Azúcares reductores	Coloración rojo ladrillo	++
Espuma	Saponinas	Ligera presencia de espuma.	+++
Cloruro férrico	Compuestos fenólicos y taninos	Precipitado azul negruzco	++
Shinoda	Flavonoides	Coloración violeta intensa	+++
Antocianinas	Antocianidina	Coloración rojo marrón	++

+++ : Abundante ++ : Regular + : Escaso

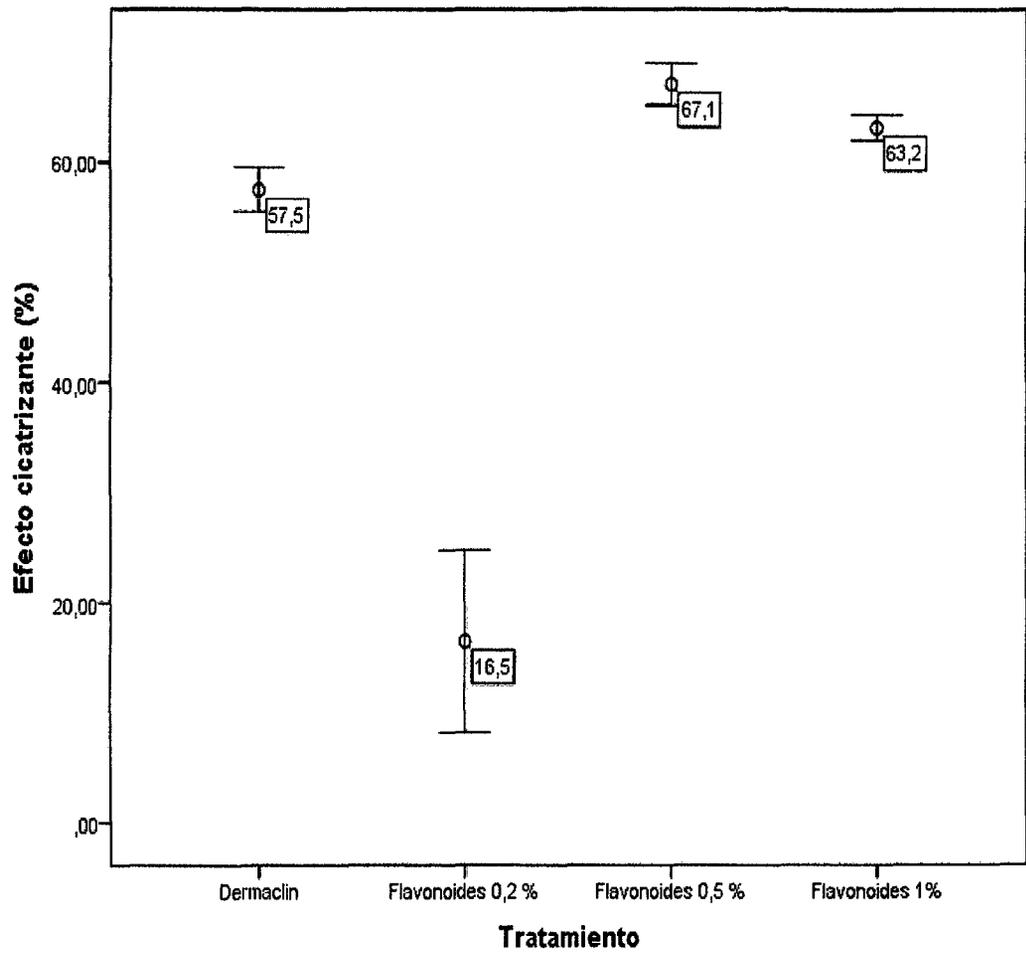


Figura 2. Porcentaje de efecto cicatrizante por efecto de los flavonoides aislados de las flores de *Agave americana* "cabuya". Ayacucho, 2014.

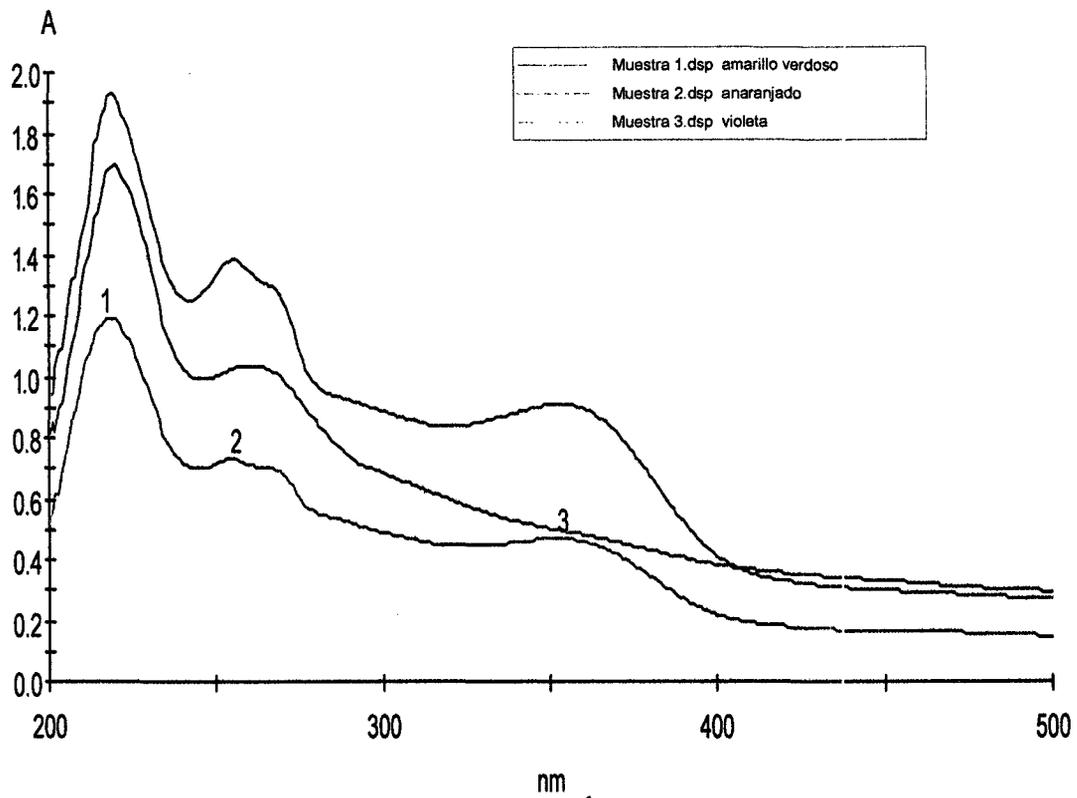


Figura 3. Curvas espectrales correspondientes a los flavonoides aislados de las flores de *Agave americana* "cabuya". Ayacucho, 2014.

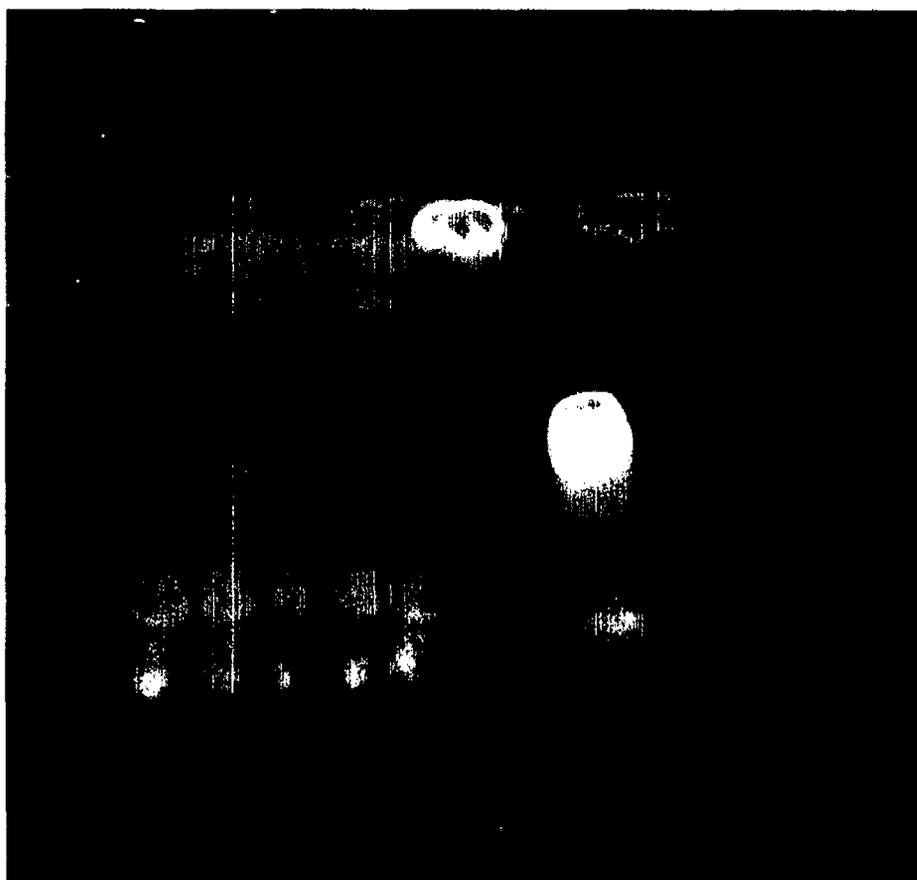


Figura 4. Cromatografía en capa fina del visto bajo luz ultravioleta de los flavonoides aislados de las flores de *Agave americana* "cabuya". Ayacucho, 2014.

V. DISCUSIÓN

Las flores de *Agave americana* "cabuya" (Anexo 2) fueron recolectadas y seleccionadas en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, región Ayacucho.

La Tabla 2, expone los resultados del screening fitoquímico realizado donde se puede apreciar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las flores de *Agave americana* "cabuya". Es evidente la presencia abundante de compuestos fenólicos (Flavonoides, taninos condensados). Saponinas y catequinas. Lo que indica, evidentemente, la eficacia del método de extracción empleado. Este resultado, por lo tanto, confirma lo hallado por otros autores.²⁸

Muchos estudios dan cuenta de que los compuestos fenólicos se distribuyen en todas las partes aéreas de la planta^{13,15}, y las flores no son la excepción. Por ejemplo, Subramanian y col. aislaron clorogenina con un rendimiento de 0,5% de las flores frescas de *Agave americana*, a su vez identificaron los glucósidos de flavonoles como kaempferol-3-glucósido y kaempferol-3-rutinósido.²⁸

Es muy probable que el polen de las flores recolectadas también hayan contribuido a dar positivo a las reacciones de identificación para compuestos fenólicos. En efecto, se ha descrito la presencia de fenoles en el polen de *Agave durangensis*.¹³

Muchos trabajos de investigación orientados a determinar el efecto cicatrizante *in vivo* llevadas a cabo en nuestro medio han usado con frecuencia el estándar Cicatrin⁷⁻⁹ cuya composición guardaba poca relación con la naturaleza química de los extractos de origen vegetal. En este trabajo, sin embargo, el estándar usado fue el Dermaclin Plus[®], un producto con un principio activo natural (flavonoides) similar a los presentes en extractos vegetales, útil en desinfección de heridas, cortes, quemaduras y otras afecciones de la piel.

La Figura 2, muestra el porcentaje de efecto cicatrizante por efecto del medicamento de referencia y los geles a base de los flavonoides aislados de las flores de *Agave americana* "cabuya". Los hallazgos a raíz de la prueba de tensión muestran que los flavonoides demuestran, de manera importante, el porcentaje alto de efecto cicatrizante, muy por encima del estándar, que se ha logrado con los geles a concentraciones de 0,5 y 1%. Una particularidad se nota cuando a la concentración de 0,5% existe ligera superioridad frente a la concentración de 1%, lo que además indica que el efecto cicatrizante no dependería de la concentración de flavonoides puesto que se nota cierta tendencia hacia la inhibición de la cicatrización a una concentración mayor, probablemente por algún mecanismo tóxico.

La prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (Anexo 7) nos da información más clara al respecto. El estadístico en referencia, con una confiabilidad del 95%, arroja como resultado que, efectivamente, el efecto logrado por la concentración de flavonoides al 1% es estadísticamente similar al estándar de referencia Dermaclín Plus, en vista de que $p > 0,05$, mientras que el efecto cicatrizante de las demás concentraciones resultaron ser diferentes al estándar de referencia Dermaclín Plus, ya que $p < 0,05$.

Las comparaciones múltiples con la prueba de Duncan (Anexo 8), prescindiendo del estándar, nos confirma la diferencia estadística ($p < 0,05$) del efecto cicatrizantes de la concentración de flavonoides al 0,2% frente a las demás concentraciones de geles de flavonoides administrados siendo, además, que los efectos de las concentraciones de 0,5 y 1% son estadísticamente similares ($p > 0,05$). Todos estos resultados nos llevan a la conclusión de que las flores de *Agave americana* poseen flavonoides con actividad cicatrizante significativa, cuya naturaleza química probablemente facilita el proceso regenerativo por mecanismos mucho más efectivos que el estándar de referencia.

Ya que *Agave americana* es una de las especies más estudiadas, la literatura reporta la presencia de dos glucósidos de flavonol en sus flores. En efecto, como se puede apreciar comparativamente, existe mucha similitud de la curva espectral UV obtenida con la curva estándar de la rutina. Los flavonoides aislados (Figura 3 y 4), por lo tanto, parecen coincidir con los obtenidos por Sankara, los mismos que corresponden a los glucósidos del kaempferol ya mencionados arriba: kaempferol-3-glucósido y kaempferol-3-rutinósido.²⁸

Respecto al posible mecanismo de acción cicatrizante, caben muchas posibilidades dado que el proceso fisiopatológico es muy complejo. Podríamos establecer que los compuestos fenólicos de las flores de *Agave americana* ejercen un potente poder antioxidante capaz de proteger a los fibroblastos y queratinocitos de la piel en pro de la cicatrización de las heridas, como el caso de *Chromolaena odorata*, cuyo extracto etanólico ha demostrado ser beneficioso para el tratamiento de heridas. Este trabajo hecho sobre la protección de daño oxidativo de cultivos celulares de piel donde se ensayó los compuestos fenólicos pudo explicar el posible mecanismo implicado en la curación de heridas. Los compuestos más activos se fraccionaron y se identificaron a partir del extracto bruto usando cromatografía líquida acoplada con espectroscopia UV y espectrometría de masas. Se investigó los efectos antioxidantes de las fracciones purificadas en cultivos de fibroblastos y queratinocitos mediante ensayo colorimétrico de liberación de hidrogenasa y lactato. Los resultados mostraron que los ácidos fenólicos presentes (protocatéquico, p-hidroxibenzoico, p-cumárico, ferúlico y ácidos vanílicos) y mezclas complejas de agliconas lipófilas de flavonoides (flavanonas, flavonas y flavonoles, chalconas) participen como potentes antioxidantes en la protección de las células de piel contra el daño oxidativo lo que a su vez podría contribuir en la mejora de la cicatrización de heridas.²⁹

Existen innumerables especies vegetales cuyos compuestos fenólicos, particularmente los flavonoides, han demostrado un amplio espectro de actividades biológicas dentro de las cuales se encuentran la antiinflamatoria, proceso fisiopatológico crucial durante el proceso de cicatrización de heridas. Un ejemplo claro se puede apreciar en el estudio realizado sobre las actividades antiinflamatoria y cicatrizantes del extracto alcohólico crudo y los flavonoides de *Vitex leucoxyton*, los que demostraron ser eficaces en el control de la inflamación aguda, con ningún efecto sobre la inflamación crónica, donde el extracto crudo también redujo significativamente la resistencia a la rotura de la herida.¹⁹

En gran medida cualquier mecanismo antiinflamatorio y antioxidante va a favorecer el proceso de cicatrización. Los flavonoides no sólo han demostrado sus actividades en modelos *in vivo*, sino también *in vitro*. Los enfoques para la investigación *in vitro* de los procesos de cicatrización de heridas, por ejemplo, se han reportado en los estudios con especies de *Buddleja*. En efecto, se ha podido

observar que los extractos de las hojas de *Buddleja globosa*, que contenía tres flavonoides y dos derivados del ácido cafeico, indujeron la diferenciación de los queratinocitos y alteró la expresión de las proteínas producidas por los fibroblastos cultivados, incluso mostró algún efecto sobre la contracción reticular, con la consecuente aceleración en la curación de heridas.^{30,31}

Se evaluaron las propiedades antioxidantes y composición fenólica de extractos de diferente hidrofobicidad de flores comestibles enteras de *Agave durangensis*. Separadamente, se analizaron extractos crudos de tépalos y anteras–polen. El análisis de HPLC–DAD reveló en total ocho flavonoles (cinco glicósidos de quercetina y tres glicósidos de canferol), que variaron en número y concentración en los extractos. Los extractos totales de las flores enteras tuvieron el contenido más alto de flavonoides (1210,4 µg/g extracto seco) y el perfil de flavonoides más complejo (ocho compuestos). Todos los extractos mostraron importante actividad antioxidante, no claramente asociada al contenido de flavonoides. Los extractos crudos de tépalos mostraron las propiedades antioxidantes más altas (capacidad antioxidante total, capacidad bloqueadora de radicales libres, y capacidad reductora de fierro: 30,2 mg de equivalentes de ácido ascórbico, EC₅₀=0,074 µg/mL, e IC₅₀=43,28 µg/mL, respectivamente). Las flores de *Agave durangensis* representan una fuente importante de flavonoles antioxidantes.¹⁴

Otro trabajo similar también aporta evidencia sobre la actividad antioxidante involucrada en el proceso de cicatrización de heridas de las agaváceas. *Agave attenuata* también mostró un buen potencial antioxidante frente a radicales libres DPPH e inhibición de la peroxidación lipídica.¹²

VI. CONCLUSIONES

1. Los flavonoides aislados del extracto hidroalcohólico de las flores de *Agave americana* "cabuya" poseen efecto cicatrizante.
2. Los compuesto fenólicos aislados de las flores de *Agave Americana* "cabuya" corresponden a ciertos flavonoles y a la rutina basado en análisis espectral UV y comparativamente con las absorbancias de la rutina reportados en la bibliografía.
3. La concentración con el mayor porcentaje de efecto cicatrizante fue al 0,5%, con un máximo de 67,1%.
4. El porcentaje de efecto cicatrizante de los flavonoides a la concentración de 0,5% con un 67,1% fue significativamente mayor que el estándar Dermaclín Plus ($p < 0,05$), y al 1% con un 63,2%, estadísticamente similar ($p > 0,05$).

VII. RECOMENDACIONES

1. Evaluar histológicamente el proceso de cicatrización en un tratamiento prolongado con esta planta.
2. Realizar estudios de toxicidad dérmica para evaluar la seguridad de los flavonoides de esta especie vegetal.
3. Realizar estudios clínicos con fórmulas semisólidas elaboradas a base de los flavonoides de esta especie.
4. Desarrollar y evaluar la estabilidad de los geles elaborados a base de los flavonoides de esta planta a fin de garantizar su tiempo de vida media.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guillermo F, Bonilla P, Arroyo J. Efecto cicatrizante del tallo subterráneo de *Peperomia scutellaefolia* R. et P. en geles aplicados a *Ratus norvegicus*. *Folia dermatol. Peru*, 2005; 16 (1):15-22.
2. Andrades P, sepúlveda S, González J. Curación avanzada de heridas. *Rev. Chilena de Cirugía*, 2004; 56(4): 396-403.
3. Ferraina P, Oria A. *Cirugía de Michans*. 5ª ed. Buenos Aires: Editorial El Ateneo; 2008.
4. Soukup J. 1970. *Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana*. Editorial Salesiano. Lima – Perú.
5. Cornejo V. *Las plantas y sus utilidades*. Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, 1983.
6. Curo N. Actividad cicatrizante del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* “yawar soqo”. [Tesis de Grado] Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga: Facultad de Ciencias Biológicas; 2004.
7. Diaz L. Efecto Cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas y raíces de *Gamochaeta ameriana* (Mill.) Wedd. “qeto qeto” en ratones. [Tesis de Grado] Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga: Facultad de Ciencias Biológicas; 2007.
8. Pillaca K. Efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las flores y hojas de *Ligaria cuneifolia* “Tullma”. [Tesis de Grado] Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga: Facultad de Ciencias Biológicas; 2008
9. Hinostroza, M. Efecto Cicatrizante del extracto hidroalcohólico de los tallos y hojas de *Stevia Rebaudiana* Bertoni “estevia”. [Tesis de Grado] Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga: Facultad de Ciencias Biológicas; 2009.
10. Quispe M. Evaluación de la actividad cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Junglia paniculata* (DC) A. Gray “matico de puna”. [Tesis de Grado] Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga: Facultad de Ciencias Biológicas; 2010.
11. Hammuel C, Ezeayanaso C, Ogabiela EE, Udiba UU, Anyim B, Olabanji O. Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of *Agave sisalana* Perrine juice (waste). *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 2011; 3(7):180-183.
12. Rizwan K, Zubair M, Rasool N, Riaz M, Zia-Ul-Haq M, De Feo V. Phytochemical and biological studies of *Agave attenuata*. *International journal of molecular sciences*, 2012; 13(5):6440-6451.
13. Almaraz-Abarca N, Delgado-Alvarado EA, Hernández-Vargas V, Ortega-Chávez M, Orea-Lara G, de Leon AC, Muniz-Martinez R. Profiling of phenolic compounds of somatic and reproductive tissues of *Agave durangensis* Gentry (Agavaceae). *American Journal of Applied Sciences*, 2009. 6(6):1076-1085.
14. Barriada-Bernal LG, Almaraz-Abarca N, Delgado-Alvarado EA, Gallardo-Velázquez T, Ávila-Reyes JA, Torres-Morán MI, Herrera-Arrieta Y. Flavonoid composition and antioxidant capacity of the edible flowers of

- Agave durangensis* (Agavaceae). CyTA-Journal of Food, (ahead-of-print), 2013. 1-10.
15. Ben Hamissa AM, Seffen M, Aliakbarian B, Casazza AA, Perego P, Converti A. Phenolics extraction from *Agave americana* (L.) leaves using high-temperature, high-pressure reactor. Food and Bioproducts Processing, 2012; 90(1):17-21.
 16. Sgonc R, Gruber J. Age-Related Aspects of Cutaneous Wound Healing: A Mini-Review. Gerontology, 2012; 59(2):159-164.
 17. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. Front Biosci, 2004; 9(1), 283-289.
 18. Bruneton J. Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. 2ª ed. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.; 2001.
 19. Sarma SP, Aithal KS, Srinivasan KK, Udupa AL, Kumar V, Kulkarni DR, Rajagopal PK. Anti-inflammatory and wound healing activities of the crude alcoholic extract and flavonoids of *Vitex leucoxydon*. Fitoterapia, 1990; 61(3):263-265. <http://www.cabdirect.org/abstracts/19910650205.html>
 20. Kardel M, Taube F, Schulz H, Schütze W, Gierus M. Different approaches to evaluate tannin content and structure of selected plant extracts-review and new aspects. Journal of Applied Botany and Food Quality, 2013; 86(1):154-66.
 21. Lock O. Investigación fitoquímica. 2ª ed. Lima: Fondo editorial PUCP; 1994.
 22. Sen CK, Khanna S, Gordillo G, Bagchi D, Bagchi M, Roy S. Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing. Annals of the New York Academy of Sciences, 2002; 957(1):239-249.
 23. Nirmala S, Ravichandiran V, Bathula N, Dubala J, Kumar S, Arun S. Stability studies and evaluation of the semisolid dosage form of the tannin fraction from the stem bark of *Ficus racemosa* Linn. for wound healing activity. Inventi Impact: Ethnopharmacology, 2012.
 24. Villar del Fresno A. Farmacognosia General. Madrid: Editorial Síntesis S.A.; 1999.
 25. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales. Universidad La Habana: Universidad de La Habana; 2000.
 26. Aguilar E. Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smilax sonchifolia* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante y antirradicalaria. [Tesis de Maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
 27. Howes E, Sooy J, Harvey S. The healing of Wounds as determined by their tensile strength. Jour AMA; 1929: 92(1).
 28. Subramanian SS, Nair AGR. Chlorogenin and kaempferol glycosides from the flowers of *Agave americana*. Phytochemistry. 1970; 9(12), 2582. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200857829>
 29. Phan TT, Wang L, See P, Grayer RJ, Chan SY, Lee ST. Phenolic compounds of *Chromolaena odorata* protect cultured skin cells from oxidative damage: implication for cutaneous wound healing. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2001; 24(12):1373-1379.

30. Houghton PJ, Hylands PJ, Mensah AY, Hensel A, Deters AM. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 100(1):100-107. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874105004320>
31. Mensah AY, Sampson J, Houghton PJ, Hylands PJ, Westbrook J, Dunn M, et al. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001; 77(2):219-226. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874101002975>

ANEXOS

Anexo 1

Certificado de identificación botánica de *Agave americana* "cabuya".



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

C E R T I F I C A

Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica Srta. Iveth, PRADO HUAMANÍ, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

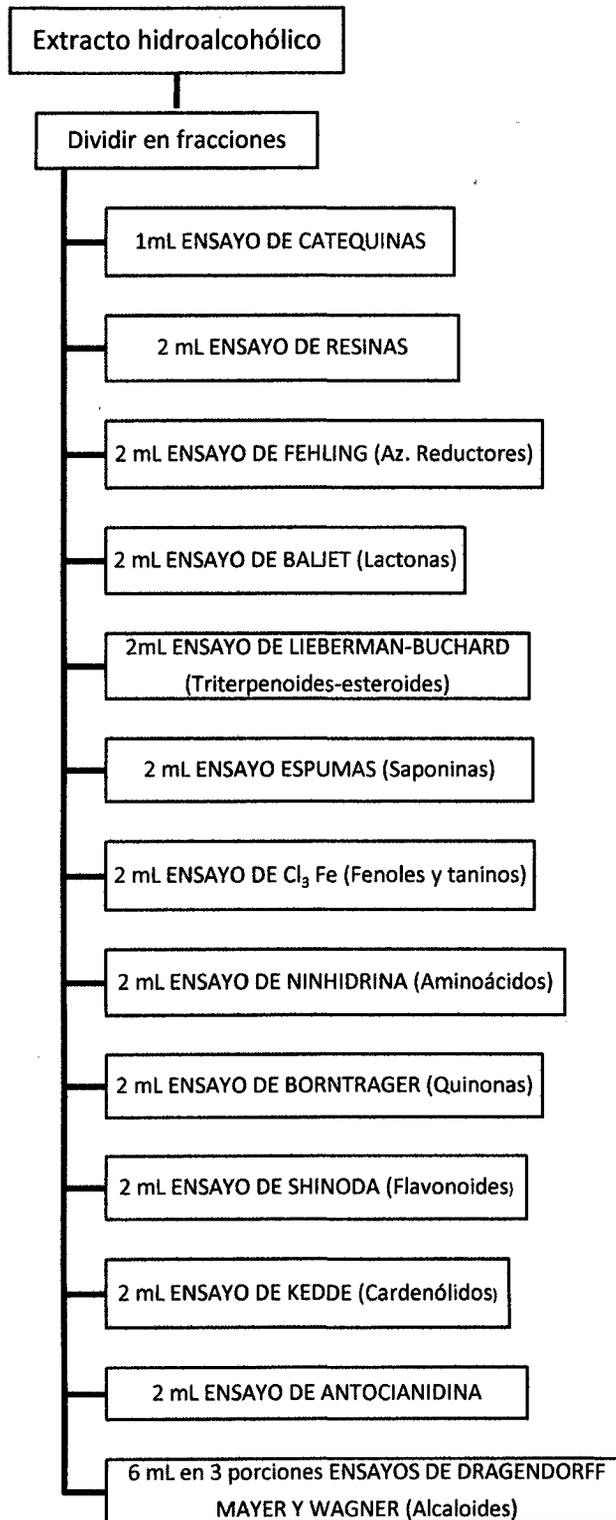
DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	LILIOPSIDA
SUB CLASE	:	LILIIDAE
ORDEN	:	LILIALES
FAMILIA	:	AGAVACEAE
GENERO	:	Agave
ESPECIE	:	Agave americana L.
N.V.	:	"cabuya azul"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 05 de Noviembre del 2013

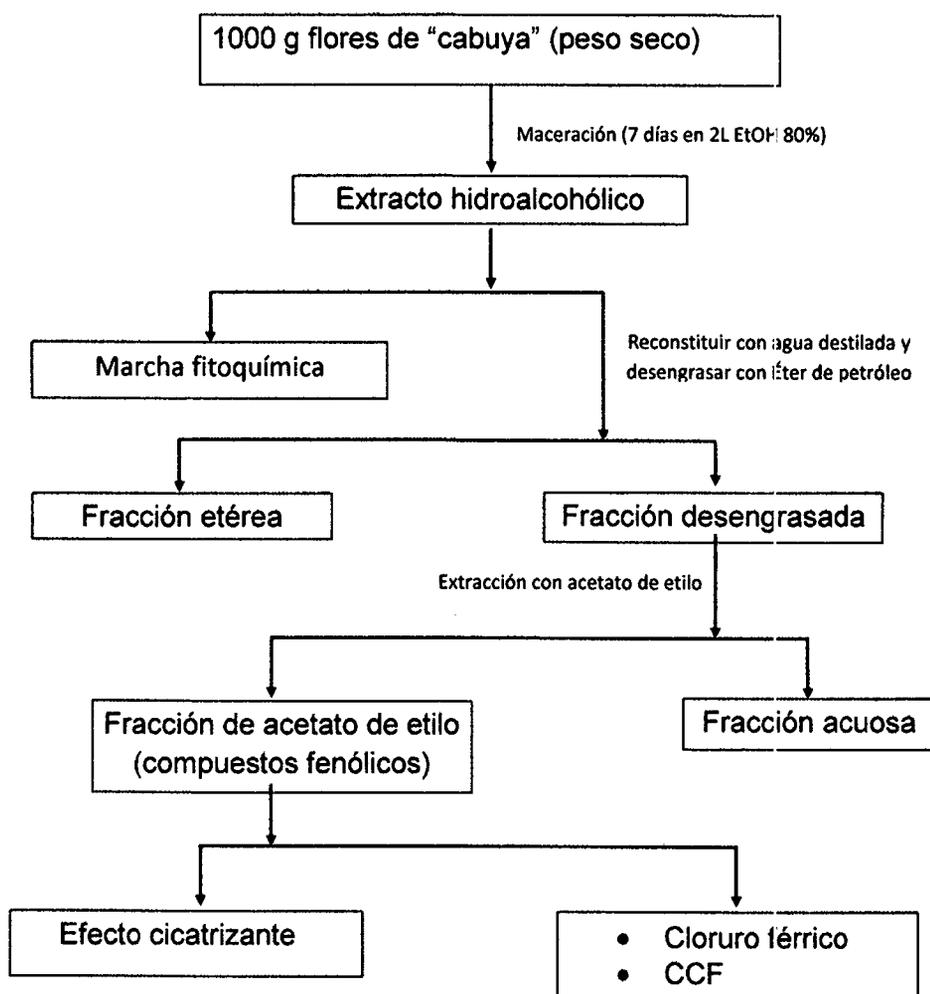
Anexo 2

Diseño para la identificación de metabolitos secundarios de extracto hidroalcohólico de las flores de *Agave americana* "cabuya".



Anexo 3

Flujograma del proceso de extracción de los compuestos fenólicos de las flores de *Agave americana* "cabuya".



Anexo 4

Flores de *Agave americana* "cabuya"



Anexo 5

Agave americana "cabuya" en su hábitat natural



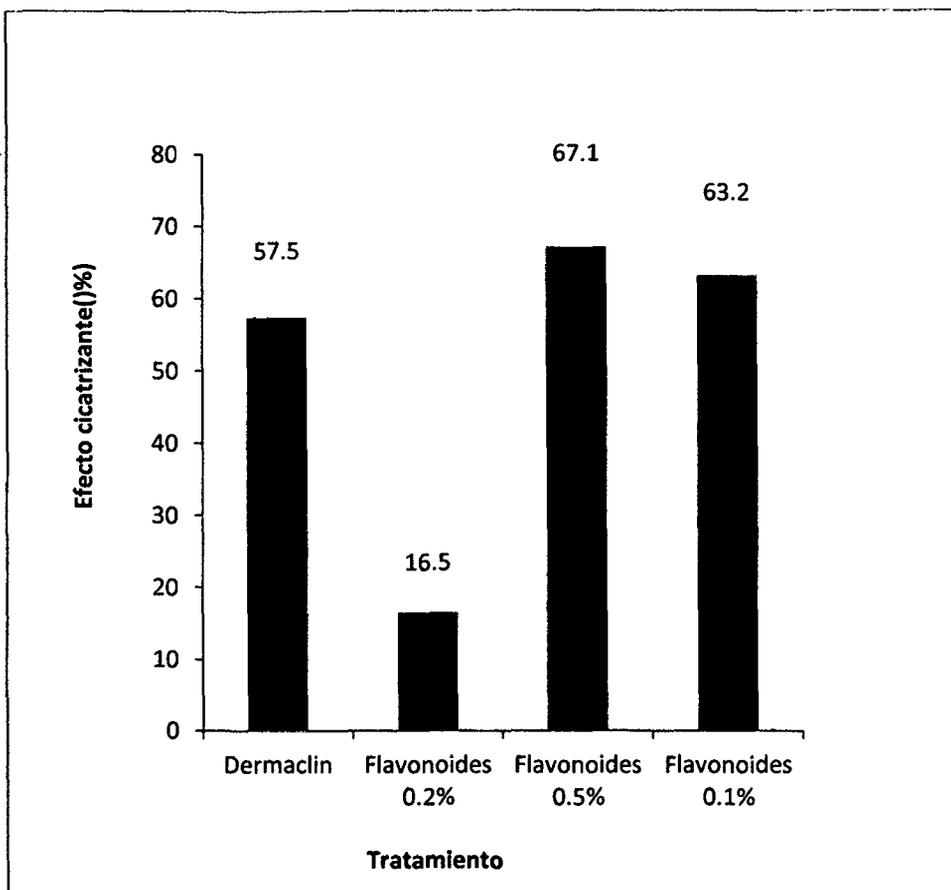
Anexo 6

Extracto hidroalcohólico de las flores de *Agave americana* "cabuya"



Anexo 7

Porcentaje de efecto cicatrizante por efecto de los flavonoides aislados de las flores de *Agave americana* "cabuya". Ayacucho, 2014.



Anexo 8

Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett del porcentaje de efecto cicatrizante de los flavonoides aislados de las flores de *Agave americana* "cabuya".

(I) Tratamiento	(J) Estándar	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza
					Límite inferior
F 0,2 %	Dermaclin	-122,18228	12,55157	1,000	-150,1361
F 0,5 %	Dermaclin	70,48651*	12,55157	,000	42,5327
F 1%	Dermaclin	37,47757*	12,55157	,011	9,5238

p<0,05

Anexo 9

Prueba de comparaciones múltiples de Duncan para las medias del porcentaje del efecto cicatrizante de los flavonoides aislados de las flores de *Agave americana* "cabuya" al 0,2; 0,5 y 1%.

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa =: 0,05		
		1	2	3
F 0,2 %	5	21,9928		
F 1%	5		181,6526	
F 0,5 %	5			214,6616
Sig.		1,000	1,000	1,000

p<0,05

Anexo 10

Matriz de consistencia

Titulo	Problema	Objetivos	Hipótesis	variables	Marco teórico	Metodología
<p>"Efecto cicatrizante de los compuestos fenólicos aislados de las flores de <i>Agave americana</i> "cabuya". Ayacucho 2013.</p>	<p>¿Tendrán efecto cicatrizante los compuestos fenólicos aislados de las flores de <i>Agave americana</i> "cabuya"?</p>	<p>General</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluar el efecto cicatrizante de los compuestos fenólicos aislados de las flores de <i>Agave americana</i> "cabuya". <p>Específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aislar los compuestos fenólicos de las flores de <i>Agave americana</i> "cabuya". • Identificar los compuestos fenólicos presentes en las flores de <i>Agave americana</i> "cabuya", mediante pruebas químicas y cromatográficas. • Determinar la concentración de los compuestos fenólicos aislados de las flores de <i>Agave americana</i> "cabuya" con mayor efecto cicatrizante. • Comparar el porcentaje de efecto cicatrizante de los compuestos fenólicos aislados de las flores de <i>Agave americana</i> "cabuya" con un medicamento de referencia (Dermacilin Plus® 1%). 	<p>Los compuestos fenólicos aislados de las flores de <i>Agave americana</i> "cabuya" poseen efecto cicatrizante.</p>	<p>Variable independiente</p> <p>Compuestos fenólicos aislados de las flores de <i>Agave americana</i> "cabuya".</p> <p>Indicador</p> <p>Concentraciones de 0,2; 0,5 y 1,0 % de los compuestos fenólicos aislados</p> <p>Variable dependiente</p> <p>Efecto cicatrizante</p> <p>Indicador:</p> <p>Resistencia a la tensión expresada en ml de agua.</p>	<p><i>Agave americana</i>.</p> <p>Propiedades atribuidas por la medicina tradicional. Las raíces, contra heridas y llagas canceradas o inflamadas⁴, calambres y reumatismo.⁵</p> <p>Estudio farmacológico de algunas especies del género <i>Agave</i></p> <p><i>Agave sisalana</i> mostró un fuerte efecto sobre <i>Shigella dysenteriae</i> y moderadamente sobre <i>Bacillus atrophaeus</i>⁶</p> <p><i>Agave attenuata</i> es antioxidante e inhibe la peroxidación lipídica.⁷</p> <p>Estudio químico.</p> <p>Compuestos fenólicos incluido flavonoides, homoisoflavonoides y ácidos fenólicos.⁸ alcaloides, taninos, saponinas y glucósidos cardíacos⁹.</p> <p>La herida y la cascada de cicatrización</p> <p>Las heridas son lesiones traumáticas de la piel con solución de continuidad. La cicatrización corresponde a la compleja interacción entre muchos tipos de células (con sus citoquinas o mediadores) y la matriz extracelular³.</p> <ul style="list-style-type: none"> -Fase hemostática -Fase inflamatoria -Fase proliferativa -Fase de remodelación <p>Metabolitos secundarios que participan en la cicatrización</p> <ul style="list-style-type: none"> -Flavonoides -Taninos. 	<p>Nivel de investigación. Básica-Experimental</p> <p>Población. Plantas de <i>Agave americana</i> "cabuya", que crecen en el distrito de Ayacucho provincia de Huamanga, Región Ayacucho.</p> <p>Muestra. 2,5 kg de flores de <i>Agave americana</i> "cabuya".</p> <p>Unidad experimental. 30 ratones albinos de ambos sexos <i>Mus musculus</i>, de 20 a 25 g de peso, adquiridos del Instituto Nacional de Salud-Centro Nacional de Productos Biológicos - Lima.</p> <p>Extracción de flavonoides. Extracción líquido-líquido con acetato de etilo.</p> <p>Test de cicatrización. Método tensiométrico propuesto por Howes. Se fundamenta en la adición de la fuerza de tensión ejercida necesaria para abrir una herida incisa de un centímetro de longitud producida en el tercio superior del lomo del ratón.</p> <p>Diseño experimental. Diseño aleatorio. Cinco grupos aleatorios, cada uno con repeticiones de seis ratones.</p> <p>Grupo I: Blanco (gel)</p> <p>Grupo II: Estándar: Dermacilin Plus®</p> <p>Grupos III, IV y V: Geles al 0,2; 0,5 y 1,0% de los compuestos fenólicos aislados de las flores de <i>Agave americana</i> "cabuya", respectivamente.</p> <p>Análisis estadístico. Análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significación estadística de 95%. Las comparaciones entre cada tratamiento se harán con la Pruebas de Duncan y Dunnett, para cuyo efecto se recurrirá al uso del programa SPSS versión 20.</p>

Efecto cicatrizante de los compuestos fenólicos aislados de las flores de *Agave americana* "cabuya". Ayacucho 2013.

Iveth Prado Huamaní,¹ José Manuel Diez Macavilca¹
Farmacia y Bioquímica: UNSCH

RESUMEN

Una herida es una pérdida de continuidad normal de los tejidos, mientras que el poder de autorreparación que tienen todos los seres vivos se denomina cicatrización. Las medidas que se han implementado para el cuidado de este tipo de lesiones han establecido históricamente las bases de la terapéutica actual, la misma que sigue desarrollándose a través de la búsqueda de moléculas que promuevan la cicatrización de manera mucho más efectiva y justamente las plantas ofrecen dicha posibilidad de manera importante. *Agave americana* en nuestro medio ofrece una gran alternativa dado los antecedentes tradicionales de su empleo como cicatrizante. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto cicatrizante de los flavonoides aislados del extracto hidroalcohólico de las flores de *Agave americana* "cabuya", realizado en los laboratorios del área de Farmacia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de enero a marzo de 2014. La muestra fue colectada en el distrito de Ayacucho, región Ayacucho. Del análisis cromatográfico y espectral se identificaron flavonoles y rutina. El efecto cicatrizante se determinó mediante el método tensiométrico administrándose flavonoides aislados de las flores de *Agave americana* a concentraciones de 0,2; 0,5 y 1% y comparados frente al estándar Dermacilin Plus. El mayor porcentaje de efecto cicatrizante se observó con la concentración de 0,5%, alcanzando un 67,1%. El porcentaje de efecto cicatrizante de los flavonoides a la concentración de 0,5% con un 67,1% fue significativamente mayor que el estándar Dermacilin Plus ($p < 0,05$), y al 1% con un 63,2%, estadísticamente similar ($p > 0,05$).

Se concluye que los flavonoides aislados del extracto hidroalcohólico de las flores de *Agave americana* "cabuya" poseen efecto cicatrizante lo que confirma su uso tradicional y representa una buena alternativa en la curación de heridas.

Palabras clave: Flavonoides, Efecto cicatrizante, *Agave americana*, "cabuya"

SUMMARY

An injury is loss a normal continuity of the tissues, while self-healing power which all living beings have are called cicatrization. The actions that have been implemented for the treatment of these kinds of injuries have established historically the basis of the current therapeutic, which continues developing itself through the search for molecules that promote cicatrization more effectively. Plants offer this possibility significantly. the American Agave in our environment provides a great alternative because of its historic uses as traditional healing. The objective of this study was to determine the healing effect of flavonoids isolated from alcoholic extract of the flowers of American Agave (cabuya). It was done in the laboratories of pharmacy area of San Cristobal de Huamanga University. From January to March in 2014. The sample was taken in the district of Ayacucho-Ayacucho region. From the chromatographic and spectral analysis it was identified flavonols and rutin. The healing effect was determined by the tensiometric method administering flavonoids isolated from American Agave flowers at concentrations of 0.2, 0.5 and 1% and compared with the standard Dermacilin Plus. The higher percentage of healing effect of the flavonoids was observed in concentrations of 0.5% reaching 64.1%. The percentage of healing effect of flavonoids to the concentration of 0.5% with a 67.1% was significantly higher than the standard Dermacilin Plus (), and 1% with 63.2% statistically similar (). It is concluded that the flavonoids isolated from the alcoholic extract of the American Agave flowers (cabuya) possess healing effect confirming its traditional use and represents an alternative in injury healing.

Keywords: effective cicatrization, American Agave, flavonids.

INTRODUCCIÓN

En muchos sistemas de salud de América, Asia y Europa es frecuente el uso de drogas vegetales y fitomedicamentos como parte integral de la medicina convencional¹ y nuestro país no es la excepción ya que nuestra medicina tradicional hace uso de un gran número de especies vegetales para curar sus enfermedades y síndromes, desde los más leves hasta los más graves.

La curación de heridas es un tema tan antiguo como la historia del hombre. El hombre de Neandertal en Irak 60000 años a.C. usó hierbas contra las quemaduras. En el antiguo Egipto ya se usaban como apósitos el barro, gomas, resinas, miel, mirra y sustancias oleosas e Hipócrates trataba las heridas con vino, cera de abejas, roble sagrado, aceite y azúcar.²

Una herida es una pérdida de la continuidad normal de los tejidos, mientras que el poder de eutorreparación que

tienen todos los seres vivos se denomina cicatrización.³

Las medidas que se han implementado para el cuidado de este tipo de lesiones han establecido históricamente las bases de la terapéutica actual, la misma que sigue desarrollándose a través de la búsqueda de moléculas que promuevan la cicatrización de manera mucho más efectiva y justamente las plantas ofrecen dicha posibilidad de manera importante.

Agave americana es una especie de amplio uso en la medicina tradicional en nuestro medio. Existen evidencias en la literatura de que esta especie posee múltiples propiedades medicinales dentro de las que destaca la curación de heridas,⁴ por lo que ha sido objeto de amplios estudios destinados a demostrar científicamente dichas propiedades terapéuticas.

Cabe destacar que este trabajo se desarrolló en los laboratorios de Farmacognosia y Farmacología de la

Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, en la Ciudad de Ayacucho, Perú. Cada etapa del trabajo se ha desarrollado en base a procedimientos y protocolos estandarizados de laboratorio de tal forma que los resultados reflejan la confiabilidad del experimento.

En vista de tales evidencias y como un aporte al conocimiento científico de la "cabuya", se emprendió este trabajo, el mismo que se condujo en aras de lograr los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Evaluar el efecto cicatrizante de los compuestos fenólicos aislados de las flores de *Agave americana* "cabuya".

Objetivos específicos:

- Aislar los compuestos fenólicos de las flores de *Agave americana* "cabuya".
- Identificar los compuestos fenólicos presentes en las flores de *Agave americana* "cabuya", mediante pruebas químicas, cromatográficas y espectrales.
- Determinar la concentración de los compuestos fenólicos aislados de las flores de *Agave americana* "cabuya" con mayor efecto cicatrizante, y
- Comparar el porcentaje de efecto cicatrizante de los compuestos fenólicos aislados de las flores de *Agave americana* "cabuya" con un medicamento de referencia (Dermaclín Plus®).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Ubicación

El presente trabajo de Investigación se realizó en los laboratorios de Farmacología y Farmacognosia de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de agosto a diciembre de 2013.

- **3.2. Población y muestra**
- **3.2.1. Población**

Flores de *Agave americana* "cabuya" que crece en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, región Ayacucho.

- **3.2.2. Muestra**

2.5 kg de flores de *Agave americana* "cabuya".

- **3.2.3. Unidad experimental**

30 ratones albinos, *Mus musculus*, machos, de dos meses de edad y de 20 +/- 25 g de peso, que fueron adquiridos del Instituto Nacional de Salud-Centro Nacional de Productos Biológicos, Lima.

- **3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos**
- **3.3.1. Recolección de la muestra**

La recolección, selección y secado de las muestras se realizó de acuerdo a los procedimientos establecidos por Villar del Fresno. Se seleccionaron las flores intactas; se lavaron con abundante agua y se secaron a la sombra, en una habitación ventilada, sobre papel periódico, aproximadamente por una semana.²⁴

- **3.3.2. Obtención del extracto hidroalcohólico**

2,5 kg de flores de *Agave americana* "cabuya" fueron molidos en un mortero de porcelana. El material seco y molido obtenido se extrajo por maceración durante 7 días con etanol de 80°. Luego se filtró con papel Whatman N° 40 y la solución hidroalcohólica se concentró a presión y temperatura reducida hasta sequedad en una estufa a una temperatura no mayor de 50°C.

- **3.3.3. Tamizaje fitoquímico**

Para la identificación y reconocimiento de los diferentes metabolitos secundarios presentes en el extracto se realizaron las reacciones de coloración y precipitación.²⁵

- **3.3.4. Extracción e identificación de los flavonoides**

El extracto hidroalcohólico seco se reconstituyó con agua destilada y se trató con éter de petróleo para eliminar grasas, ceras, pigmentos y otros metabolitos que posiblemente interfieran en la extracción de compuestos fenólicos. La extracción líquido-líquido con acetato de etilo se hizo utilizando un embudo de separación, para recuperar finalmente la fracción de acetato de etilo y evaporarla a sequedad (fracción flavónica).²⁶

- **3.3.5. Identificación de los flavonoides**

a. Pruebas cualitativas

Reactivo de cloruro férrico: se añadió unas gotas de cloruro férrico 1%, sobre la fracción de acetato de etilo.

b. Cromatografía en capa fina (CCF)

La fracción de acetato de etilo se reconstituyó con 0,5 ml de metanol y se aplicó en la base de la placa cromatográfica con capilares de vidrio.

Se llevó a una cubeta cromatográfica conteniendo como sistema de solventes BAVV (butanol, ácido acético y agua) en una proporción de 4:1:5.²¹

Se retiró la placa y dejó secar al aire para luego observar bajo lámpara de luz UV. Se reveló con cloruro férrico 1%.

- **3.4. Diseño experimental**

Los animales de experimentación fueron agrupados de manera aleatoria en cinco grupos, donde cada grupo estuvo comprendido de seis animales (Tabla 1):

Grupo I: Blanco o control negativo (gel base, desprovisto de compuestos fenólicos)

Grupo II: Estándar o control positivo (Dermaclín Plus® que son polifenoles cuaternarios derivados de bioflavonoides cítricos 1%)

Grupos III, IV y V: Geles al 0,2; 0,5 y 1,0% de los compuestos fenólicos aislados de las flores de *Agave americana* "cabuya", respectivamente.

Tabla 1. Diseño experimental para la evaluación del efecto cicatrizante de los flavonoides aislados de *Agave americana*. Ayacucho 2013.

Grupo	Gel base	Dermaclín plus®	Concentración (%)		
			0,2	0,5	1,0
Blanco	X				
Grupo control		X			
Tratamiento 1			X		
Tratamiento 2				X	
Tratamiento 3					X

- **3.5. Determinación del efecto cicatrizante**

a. Formulación de los geles

Se formuló geles a base de los compuestos fenólicos aislados del extracto hidroalcohólico de *Agave americana* "cabuya" al 0,2; 0,5 y 1,0 %. Se reconstituyó 0,2; 0,5 y 0,1 g de compuestos fenólicos con 20 ml de agua destilada y luego se enrazó con agua destilada csp 100 ml, soluciones que se calentaron para luego añadir un gramo de carboximetilcelulosa y finalmente metilparabeno como preservante. De otro lado, se formuló también un gel base (blanco) disolviendo a fuego lento 1g de carboximetilcelulosa más agua destilada csp 100 ml y la incorporación final de metilparabeno.

b. Test de cicatrización

Se fundamenta en la aplicación de una fuerza de tensión ejercida (medida en mililitros de agua) necesaria para abrir una herida incisa de 1cm de longitud producida en el tercio superior del lomo del ratón.²⁷

Se siguió el procedimiento siguiente:

- Se depiló el lomo de los ratones en un área aproximada de dos centímetros cuadrados con el depilatorio comercial Gillette®.

- Se pesó los ratones y se colocaron en jaulas individuales.
- Se administró por vía SC una dosis de 74 mg/Kg de pentobarbital a cada ratón para una buena manipulación.
- Se les practicó una incisión de un centímetro de largo en el lomo de cada ratón, previa desinfección de la zona.
- Se hizo puntos de sutura con un punto triple utilizando hilo de sutura no reabsorbible Mersilk® 3/0.
- Se administró la primera dosis de tratamiento a cada grupo: compuestos fenólicos al 0,2; 0,5 y 0,1%; blanco (gel); medicamento de referencia (Dermaclín Plus®) cantidad necesaria hasta recubrir la herida cada 8 horas, por un período de tres días.
- Luego de 72 horas de tratamiento se procedió a sacrificar a los ratones con una sobredosis de pentobarbital sódico 1%.
- Se retiraron los puntos de sutura y se colocó los animales en posición decúbito ventral sobre el aparato de tensión.
- Se insertaron las agujas del aparato de tensión a 0,5 cm de los bordes de la herida y el agua contenido en la bureta se dejará caer al vaso hasta que genere una fuerza de tensión que abrirá la herida en toda su longitud.
- Se anotó el nivel de agua alcanzado.
- Se determinó el porcentaje de la actividad que es la expresión de la resistencia que muestra la cicatriz al ser sometido a una tensión, y que es expresada en porcentaje de la siguiente manera.

$$\% EC = \frac{X_{tto} - X_b}{X_{tto}} \times 100$$

Donde:

- %EC : Porcentaje de efecto cicatrizante
- X_{tto} : Fuerza promedio para abrir la herida del grupo tratado con los extractos
- X_b : Fuerza promedio para abrir la herida del grupo sin tratamiento (blanco).

• 3.7. Análisis estadístico

La diferencia significativa existente entre los tratamientos fue evaluada mediante análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significación estadística de 95% (p<0,05). Las comparaciones entre los tratamiento se hizo el test de Duncan y frente al estándar con el test de Dunnett, para cuyo efecto se usó del programa SPSS versión 21.

RESULTADOS

Tabla 2. Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las flores de *Agave americana*. Ayacucho, 2013.

Ensayo	Metabolito	Observación	Valoración
Catequinas	Catequinas	Fluorescencia verde esmeralda	+
Fehling	Azúcares reductores	Coloración rojo ladrillo	++
Espuma	Saponinas	Ligera presencia de espuma.	+++
Cloruro férrico	Compuestos fenólicos y taninos	Precipitado azul negruzco	++
Shinoda	Flavonoides	Coloración violeta intensa	+++
Antocianinas	Antocianidina	Coloración rojo marrón	++

+++; Abundante ++: Regular +: Escaso

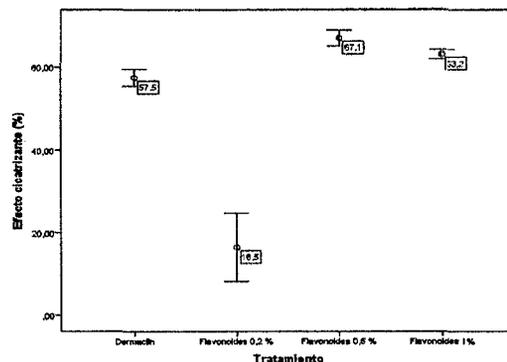


Figura 2. Porcentaje de efecto cicatrizante por efecto de los flavonoides aislados de las flores de *Agave americana* "cabuya". Ayacucho, 2014.

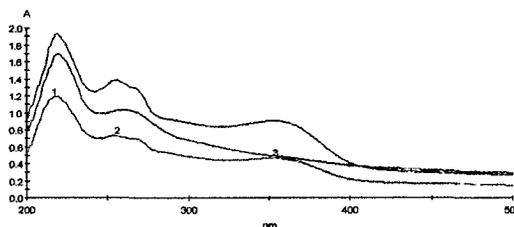


Figura 3. Curvas espectrales correspondientes a los flavonoides aislados de las flores de *Agave americana* "cabuya". Ayacucho, 2014.



Figura 4. Cromatografía en capa fina del visto bajo luz ultravioleta de los flavonoides aislados de las flores de

DISCUSIONES:

Las flores de *Agave americana* "cabuya" (Anexo 2) fueron recolectadas y seleccionadas en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, región Ayacucho. La Tabla 2, expone los resultados del screening fitoquímico realizado donde se puede apreciar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las flores de *Agave americana* "cabuya". Es evidente la presencia abundante de compuestos fenólicos (Flavonoides, taninos condensados). Saponinas y catequinas. Lo que indica,

evidentemente, la eficacia del método de extracción empleado. Este resultado, por lo tanto, confirma lo hallado por otros autores.²⁸

Muchos estudios dan cuenta de que los compuestos fenólicos se distribuyen en todas las partes aéreas de la planta^{13,15}, y las flores no son la excepción. Por ejemplo, Subramanian y col. aislaron clorogenina con un rendimiento de 0,5% de las flores frescas de *Agave americana*, a su vez identificaron los glucósidos de flavonoles como kaempferol-3-glucósido y kaempferol-3-rutinósido.²⁸

Es muy probable que el polen de las flores recolectadas también hayan contribuido a dar positivo a las reacciones de identificación para compuestos fenólicos. En efecto, se ha descrito la presencia de fenoles en el polen de *Agave durangensis*.¹³

Muchos trabajos de investigación orientados a determinar el efecto cicatrizante *in vivo* llevadas a cabo en nuestro medio han usado con frecuencia el estándar Cicatrin⁷⁻⁹ cuya composición guardaba poca relación con la naturaleza química de los extractos de origen vegetal. En este trabajo, sin embargo, el estándar usado fue el Dermaclin Plus®, un producto con un principio activo natural (flavonoides) similar a los presentes en extractos vegetales, útil en desinfección de heridas, cortes, quemaduras y otras afecciones de la piel.

La Figura 2, muestra el porcentaje de efecto cicatrizante por efecto del medicamento de referencia y los geles a base de los flavonoides aislados de las flores de *Agave americana* "cabuya". Los hallazgos a raíz de la prueba de tensión muestran que los flavonoides demuestran, de manera importante, el porcentaje alto de efecto cicatrizante, muy por encima del estándar, que se ha logrado con los geles a concentraciones de 0,5 y 1%. Una particularidad se nota cuando a la concentración de 0,5% existe ligera superioridad frente a la concentración de 1%, lo que además indica que el efecto cicatrizante no dependería de la concentración de flavonoides puesto que se nota cierta tendencia hacia la inhibición de la cicatrización a una concentración mayor, probablemente por algún mecanismo tóxico.

La prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (Anexo 7) nos da información más clara al respecto. El estadístico en referencia, con una confiabilidad del 95%, arroja como resultado que, efectivamente, el efecto logrado por la concentración de flavonoides al 1% es estadísticamente similar al estándar de referencia Dermaclin Plus, en vista de que $p > 0,05$, mientras que el efecto cicatrizante de las demás concentraciones resultaron ser diferentes al estándar de referencia Dermaclin Plus, ya que $p < 0,05$.

Las comparaciones múltiples con la prueba de Duncan (Anexo 8), prescindiendo del estándar, nos confirma la diferencia estadística ($p < 0,05$) del efecto cicatrizante de la concentración de flavonoides al 0,2% frente a las demás concentraciones de geles de flavonoides administrados siendo, además, que los efectos de las concentraciones de 0,5 y 1% son estadísticamente similares ($p > 0,05$). Todos estos resultados nos llevan a la conclusión de que las flores de *Agave americana* poseen flavonoides con actividad cicatrizante significativa, cuya naturaleza química probablemente facilita el proceso regenerativo por mecanismos mucho más efectivos que el estándar de referencia.

Ya que *Agave americana* es una de las especies más estudiadas, la literatura reporta la presencia de dos glucósidos de flavonol en sus flores. En efecto, como se puede apreciar comparativamente, existe mucha similitud de la curva espectral UV obtenida con la curva estándar de la rutina. Los flavonoides aislados (Figura 3 y 4), por lo tanto, parecen coincidir con los obtenidos por Sankara, los mismos que corresponden a los glucósidos del kaempferol ya mencionados arriba: kaempferol-3-glucósido y kaempferol-3-rutinósido.²⁸

Respecto al posible mecanismo de acción cicatrizante, caben muchas posibilidades dado que el proceso fisiopatológico es muy complejo. Podríamos establecer que los compuestos fenólicos de las flores de *Agave americana* ejercen un potente poder antioxidante capaz de proteger a los fibroblastos y queratinocitos de la piel en pro de la cicatrización de las heridas, como el caso de *Chromolaena odorata*, cuyo extracto etanólico ha demostrado ser beneficioso para el tratamiento de heridas. Este trabajo hecho sobre la protección de daño oxidativo de cultivos celulares de piel donde se ensayó los compuestos fenólicos pudo explicar el posible mecanismo implicado en la curación de heridas. Los compuestos más activos se fraccionaron y se identificaron a partir del extracto bruto usando cromatografía líquida acoplada con espectroscopia UV y espectrometría de masas. Se investigó los efectos antioxidantes de las fracciones purificadas en cultivos de fibroblastos y queratinocitos mediante ensayo colorimétrico de liberación de hidrogenasa y lactato. Los resultados mostraron que los ácidos fenólicos presentes (protocatéquico, p-hidroxibenzoico, p-cumárico, ferúlico y ácidos vanílicos) y mezclas complejas de agliconas lipófilas de flavonoides (flavanonas, flavonas y flavonoles, chalconas) participen como potentes antioxidantes en la protección de las células de piel contra el daño oxidativo lo que a su vez podría contribuir en la mejora de la cicatrización de heridas.²⁹

Existen innumerables especies vegetales cuyos compuestos fenólicos, particularmente los flavonoides, han demostrado un amplio espectro de actividades biológicas dentro de las cuales se encuentran la antiinflamatoria, proceso fisiopatológico crucial durante el proceso de cicatrización de heridas. Un ejemplo claro se puede apreciar en el estudio realizado sobre las actividades antiinflamatoria y cicatrizantes del extracto alcohólico crudo y los flavonoides de *Vitex leucoxylon*, los que demostraron ser eficaces en el control de la inflamación aguda, con ningún efecto sobre la inflamación crónica, donde el extracto crudo también redujo significativamente la resistencia a la rotura de la herida.¹⁹

En gran medida cualquier mecanismo antiinflamatorio y antioxidante va a favorecer el proceso de cicatrización. Los flavonoides no sólo han demostrado sus actividades en modelos *in vivo*, sino también *in vitro*. Los enfoques para la investigación *in vitro* de los procesos de cicatrización de heridas, por ejemplo, se han reportado en los estudios con especies de *Buddleja*. En efecto, se ha podido observar que los extractos de las hojas de *Buddleja globosa*, que contenía tres flavonoides y dos derivados del ácido cafeico, indujeron la diferenciación de los queratinocitos y alteró la expresión de las proteínas producidas por los fibroblastos cultivados, incluso mostró algún efecto sobre la contracción reticular, con la consecuente aceleración en la curación de heridas.^{30,31}

Se evaluaron las propiedades antioxidantes y composición fenólica de extractos de diferente hidrofobicidad de flores comestibles enteras de *Agave durangensis*. Separadamente, se analizaron extractos crudos de tépalos y anteras-polen. El análisis de HPLC-DAD reveló en total ocho flavonoles (cinco glucósidos de quercetina y tres glucósidos de canferol), que variaron en número y concentración en los extractos. Los extractos totales de las flores enteras tuvieron el contenido más alto de flavonoides (1210,4 µg/g extracto seco) y el perfil de flavonoides más complejo (ocho compuestos). Todos los extractos mostraron importante actividad antioxidante, no claramente asociada al contenido de flavonoides. Los extractos crudos de tépalos mostraron las propiedades antioxidantes más altas (capacidad antioxidante total, capacidad bloqueadora de radicales libres, y capacidad reductora de hierro: 30,2 mg de equivalentes de ácido ascórbico, $EC_{50}=0,074$ µg/mL, e $IC_{50}=43,28$ µg/mL, respectivamente). Las flores de *Agave durangensis*

representan una fuente importante de flavonoles antioxidantes.¹⁴

Otro trabajo similar también aporta evidencia sobre la actividad antioxidante involucrada en el proceso de cicatrización de heridas de las agaváceas. *Agave attenuata* también mostró un buen potencial antioxidante frente a radicales libres DPPH e inhibición de la peroxidación lipídica.¹²

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Guillermo F, Bonilla P, Arroyo J. Efecto cicatrizante del tallo subterráneo de *Peperomia scutellaeifolia* R. et P. en geles aplicados a *Ratus norvergicus*. Folia dermatol. Peru, 2005; 16 (1):15-22.
2. Andrades P, sepúlveda S, González J. Curación avanzada de heridas. Rev. Chilena de Cirugía, 2004; 56(4): 396-403.
3. Ferraina P, Oría A. Cirugía de Michans. 5ª ed. Buenos Aires: Editorial El Ateneo; 2008.
4. Soukup J. 1970. Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana. Editorial Salesiano. Lima – Perú.
5. Comejo V. Las plantas y sus utilidades. Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, 1983.
6. Curo N. Actividad cicatrizante del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* "yawar soqo". [Tesis de Grado] Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga: Facultad de Ciencias Biológicas; 2004.
7. Diaz L. Efecto Cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas y raíces de *Gamochaeta ameriana* (Mill.) Wedd. "qeto qeto" en ratones. [Tesis de Grado] Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga: Facultad de Ciencias Biológicas; 2007.
8. Pillaca K. Efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las flores y hojas de *Ligaria cuneifolia* "Tullima". [Tesis de Grado] Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga: Facultad de Ciencias Biológicas; 2008
9. Hinostroza, M. Efecto Cicatrizante del extracto hidroalcohólico de los tallos y hojas de *Stevia Rebaudiana* Bertoni "estevia". [Tesis de Grado] Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga: Facultad de Ciencias Biológicas; 2009.
10. Quispe M. Evaluación de la actividad cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Junglia paniculata* (DC) A. Gray "matico de puna". [Tesis de Grado] Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga: Facultad de Ciencias Biológicas; 2010.
11. Hammuel C, Ezeayanaso C, Ogabiela EE, Udiba JU, Anyim B, Olabanji O. Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of *Agave sisalana* Perrine juice (waste). Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, 2011; 3(7):180-183.
12. Rizwan K, Zubair M, Rasool N, Riaz M, Zia-Ul-Haq M, De Feo V. Phytochemical and biological studies of *Agave attenuata*. International journal of molecular sciences, 2012; 13(5):6440-6451.
13. Almaraz-Abarca N, Delgado-Alvarado EA, Hernández-Vargas V, Ortega-Chávez M, Orea-Lara G, de Leon AC, Muniz-Martínez R. Profiling of phenolic compounds of somatic and reproductive tissues of *Agave durangensis* Gentry (Agavaceae). American Journal of Applied Sciences, 2009. 6(6):1076-1085.
14. Barriada-Bernal LG, Almaraz-Abarca N, Delgado-Alvarado EA, Gallardo-Velázquez T, Ávila-Reyes JA, Torres-Morán MI, Herrera-Arrieta Y. Flavonoid composition and antioxidant capacity of the edible flowers of *Agave durangensis* (Agavaceae). CyTA-Journal of Food, (ahead-of-print), 2013. 1-10.
15. Ben Hamissa AM, Seffen M, Aliakbarian B, Casazza AA, Perego P, Converti A. Phenolics extraction from *Agave americana* (L.) leaves using high-temperature, high-pressure reactor. Food and Bioproducts Processing, 2012; 90(1):17-21.
16. Sgonc R, Gruber J. Age-Related Aspects of Cutaneous Wound Healing: A Mini-Review. Gerontology, 2012; 59(2):159-164.
17. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. Front Biosci, 2004; 9(1), 283-289.
18. Bruneton J. Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. 2ª ed. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.; 2001.
19. Sarma SP, Aithal KS, Srinivasan KK, Udupa AL, Kumar V, Kulkarni DR, Rajagopal PK. Anti-inflammatory and wound healing activities of the crude alcoholic extract and flavonoids of *Vitex leucoxylon*. Fitoterapia, 1990; 61(3):263-265. <http://www.cabdirect.org/abstracts/19910650205.html>
20. Kardel M, Taube F, Schulz H, Schütze W, Gierus M. Different approaches to evaluate tannin content and structure of selected plant extracts-review and new aspects. Journal of Applied Botany and Food Quality, 2013; 86(1):154-66.
21. Lock O. Investigación fitoquímica. 2ª ed. Lima: Fondo editorial PUCP; 1994.
22. Sen CK, Khanna S, Gordillo G, Bagchi D, Bagchi M, Roy S. Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing. Annals of the New York Academy of Sciences, 2002; 957(1):239-249.
23. Nirmala S, Ravichandiran V, Bathula N, Dubala J, Kumar S, Arun S. Stability studies and evaluation of the semisolid dosage form of the tannin fraction from the stem bark of *Ficus racemosa* Linn. for wound healing activity. Inventi Impact: Ethnopharmacology, 2012.
24. Villar del Fresno A. Farmacognosia General. Madrid: Editorial Síntesis S.A.; 1999.
25. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales. Universidad La Habana: Universidad de La Habana; 2000.
26. Aguilar E. Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante y antirradicalaria. [Tesis de Maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
27. Howes E, Sooy J, Harvey S. The healing of Wounds as determined by their tensile strength. Jour AMA; 1929: 92(1).
28. Subramanian SS, Nair AGR. Chlorogenin and kaempferol glycosides from the flowers of *Agave americana*. Phytochemistry.1970; 9(12), 2582. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200857829>
29. Phan TT, Wang L, See P, Grayer RJ, Chan SY, Lee ST. Phenolic compounds of *Chromolaena odorata* protect cultured skin cells from oxidative damage: implication for cutaneous wound healing. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2001; 24(12):1373-1379.

30. Houghton PJ, Hylands PJ, Mensah AY, Hensel A, Deters AM. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 100(1):100-107. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874105004320>
31. Mensah AY, Sampson J, Houghton PJ, Hylands PJ, Westbrook J, Dunn M, et al. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001; 77(2):219-226. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874101002975>