

ARTÍCULO ORIGINAL

Efecto cicatrizante de las diferentes formas farmacéuticas tópicas elaboradas con el extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels "nogal" en ratones albinos

Healing effect of different topic presentations formulated with hydroalcoholic extract of Juglans neotropica Diels "nogal" in albino mice

Susy Juro¹, Valmi Flores², Yanet Mendoza³, Carla del Carpio⁴

RESUMEN

Introducción: el nogal (*Juglans neotropica* Diels) crece en valles de tierras profundas y arenosas, de clima templado y lluvioso, en zonas como Cusco, Arequipa y Cajamarca. El objetivo fue determinar el efecto cicatrizante de diferentes formas farmacéuticas de aplicación tópica elaboradas con el extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels en ratones albinos. **Material y métodos:** se usaron hojas recolectadas en la localidad de Urubamba. Se realizaron cortes de 1cm² en el área dorsal escapular de ratones, a quienes en una primera fase del estudio se les aplicó el extracto a diferentes concentraciones (2.5%-40%), durante 21 días, luego de lo cual fueron sacrificados e inmediatamente se realizó la prueba del tensiómetro propuesto por Vaisberg. En la segunda fase, se formularon cinco formas farmacéuticas tópicas (pomada, emulsión agua en aceite (A/O), emulsión aceite en agua (O/A), pasta e hidrogel) las que se evaluaron según prueba del tensiómetro, en comparación al fármaco patrón (Cicatrín®). **Resultados:** la concentración mínima efectiva cicatrizante fue de 5%, encontrándose una relación concentración-cicatrización en el rango de 2.5% a 30% y una relación formulación-cicatrización, pues las presentaciones en emulsión O/A e hidrogel obtuvieron mayor resistencia a la fuerza de tensión, incluso mayor a la del fármaco patrón. Los resultados fueron corroborados con el estudio histológico. **Conclusión:** tanto el extracto hidroalcohólico al 5% como las formas farmacéuticas de emulsión O/A e hidrogel presentanro muy buena actividad cicatrizante.

Palabras clave: Extracto hidroalcohólico, *Juglans neotropica* Diels, Efecto cicatrizante, Formas farmacéuticas tópicas.

SUMMARY

Background: walnut (*Juglans neotropica* Diels) grows in deep valleys and sandy land, in temperate and rainy weather, in areas such as Cusco, Arequipa and Cajamarca. The objective was to determine the healing effect of different pharmaceutical presentations and concentrations for topical application from the hydroalcoholic extract of *Juglans neotropica* Diels in albino mice. **Methods:** we used leaves collected in the town of Urubamba. 1cm² cuts were made in the dorsal scapular area of mice, who in the first phase of the study were administered the extract at different concentrations (2.5-40%) for 21 days, after which they were sacrificed and immediately performed the tensiometer test proposed by Vaisberg. In the second phase five topical dosage forms (ointment, water in oil (W/O) emulsion, oil in water (O/W) emulsion, pasta and hydrogel) were evaluated by tensiometer test, and assessed the effect of these forms compared with standard drug (Cicatrín®). **Results:** minimal effective healing concentration was 5%, with a concentration-healing effect relationship in the range of 2.5% to 30% and a presentation-healing effect relationship, since the O/A emulsion and hydrogel were more resistant to tensile strength, even higher than the standard drug. Results were corroborated by histology. **Conclusion:** both hydroalcoholic extract at 5% and pharmaceutical presentations O/W emulsion and hydrogel have a good healing activity.

Key words: Hydroalcoholic extract, *Juglans neotropica* Diels, Healing effect, Topic pharmaceutical presentations.

¹ Químico-farmacéutico.

² Médico patólogo, Departamento de Anatomía Patológica. Hospital Antonio Lorena. Cusco-Perú.

³ Bióloga, Laboratorio de Microbiología. Facultad de Medicina Humana-Universidad Nacional de San Antonio Abad. Cusco-Perú.

⁴ Químico-farmacéutico, Centro de Investigación en Farmacia, Ambiente y Recursos Naturales (CINFAR). Facultad de Ciencias Químicas, Físicas y Matemáticas-Universidad Nacional de San Antonio Abad. Cusco-Perú.

Correspondencia: Carla del Carpio a delcarpiojc_daqf@unsaac.edu.pe

INTRODUCCIÓN

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha realizado desde tiempos inmemoriales. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso de que disponían los antiguos médicos¹. En nuestro país el uso de plantas medicinales está muy arraigado, tanto en la población rural como en la urbana, llegando incluso a integrar este conocimiento ancestral a la terapéutica de muchas enfermedades prevalentes².

El nogal (*Juglans neotropica* Diels) se encuentra en valles de tierras profundas y arenosas y de clima templado y lluvioso³; sus hojas y corteza contienen gran cantidad de taninos gálicos y catéquicos, lo que hace que tengan marcada acción astringente, la juglona además le confiere enérgica acción antiséptica, antiinflamatoria y queratinizante⁴. Perteneció a la familia Juglandaceae, pequeña familia de árboles y arbustos caducifolios y monoicos, que comprende de siete a ocho géneros y alrededor de 60 especies originarias de las regiones subtropicales y templadas del norte y sur de América, Asia y Europa. El género *Juglans* comprende 15 especies nativas del sureste de Europa, Asia y América, algunas especies de este género son: *Juglans regia* L., *Juglans nigra* L., *Juglans cinerea* L., *Juglans ailanthifolia* Carrière, y *Juglans neotropica* Diels (nogal peruano)⁵.

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

Existe diversa evidencia sobre plantas que presentan un buen efecto cicatrizante, por este motivo y teniendo en cuenta la información sobre el uso de las hojas de nogal como una alternativa curativa para heridas con difícil cicatrización, decidimos realizar la evaluación del efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de nogal. Se plantearon los siguientes objetivos: determinar la concentración efectiva cicatrizante del extracto hidroalcohólico al 70% de *Juglans neotropica* Diels "nogal"; diseñar diferentes formas farmacéuticas de aplicación tópica (emulsiones, pasta, gel, pomada) a partir del extracto hidroalcohólico al 70% usando la dosis efectiva determinada, y evaluar comparativamente el efecto cicatrizante de las formas farmacéuticas elaboradas frente a un patrón de cicatrización.

MATERIALES Y METODO

Animales de experimentación: se utilizaron 100 ratones albinos machos de la raza *Mus musculus* cepa Balb/C de 2-3 meses de edad con un peso promedio de 25 gramos,

provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Salud de Lima, alojados en jaulas individuales durante 21 días. Los animales se mantuvieron con libre acceso al agua y alimento. Todos los animales fueron depilados 24h antes de realizar un corte en la región escapular, en una área de 1cm², que incluyó piel y tejido celular subcutáneo.

Material vegetal: las hojas de *Juglans neotropica* Diels fueron recolectadas en la localidad de Urubamba, al norte de la ciudad del Cusco, a orillas del río Vilcanota, a 2950 m.s.n.m.

Preparación del extracto: se maceraron 500g de polvo de hojas de *Juglans neotropica* Diels en 100mL de etanol al 70% durante siete días, posteriormente el líquido filtrado fue concentrado a 40°C. El ensayo de solubilidad se realizó empleando solventes de polaridad creciente: n-hexano, cloroformo, acetato de etilo, butanol, etanol, metanol y agua. Finalmente la detección de los constituyentes químicos del extracto etanólico se realizó siguiendo la marcha fitoquímica general⁶.

Procedimiento experimental: en la primera fase de la investigación se aplicó, diariamente y por un período de 21 días, el extracto disuelto a las concentraciones de 2.5, 5, 10, 20, 30 y 40% en las heridas abiertas y bajo el efecto anestésico con 50mg/kg de pentobarbital sódico en grupos de seis animales para cada concentración, calculando el porcentaje de eficacia de cicatrización usando la fórmula:

$$\text{Porcentaje de eficacia de cicatrización} = \left(\frac{\text{Gramos para abrir cicatriz}}{\text{gramos para abrir piel intacta}} \right) \times 100$$

En la segunda fase se aplicaron cinco formulaciones elaboradas con extracto al 5%: pomada, emulsión agua en aceite (A/O), emulsión aceite en agua (O/A), pasta e hidrogel. Se observó el tiempo de aparición y caída de la costra y cicatrización del área durante todo el período experimental. Al finalizar el tratamiento de las dos fases los animales fueron sacrificados mediante sobredosis de anestesia e inmediatamente se realizaron las pruebas de resistencia a la tensión planteada por Vaisberg⁷. En la tercera fase se comparó el efecto cicatrizante de las formulaciones con mejores resultados frente a placebo (agua destilada) y al fármaco patrón (Cicatrín®), utilizando la prueba de resistencia a la tensión (gramos de arena necesarios para abrir una herida) y un posterior estudio histológico con cortes longitudinales de la piel regenerada. Las muestras de tejido con cicatrices experimentales fueron obtenidas inmediatamente a la muerte de los animales, seccionando un área de 1cm² que incluyó además parte de la piel sana tomada como referencia para las observaciones histológicas. Dichos fragmentos fueron fijados en formol neutro al 10% y procesados para su inclusión en parafina. Las coloraciones se realizaron con hematoxilina - eosina para su observación y evaluación histológica.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los ensayos de solubilidad y en la marcha fitoquímica se pueden observar en las **Tablas I y II**. El extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels, presentó marcada solubilidad en solventes polares, lo que indica una presencia mayoritaria de compuestos de alta polaridad. Igualmente se observó presencia de aminoácidos, flavonoides, taninos y saponinas como componentes mayoritarios, y compuestos fenólicos y lactonas en menor cantidad.

Tabla I. Solubilidad del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels.

Solvente	Solubilidad
Agua	+++
Metanol	+++
Etanol 70%	++
Acetona	++
Acetato de etilo	+
Éter etílico	+
Cloroformo	+
Benceno	+
Hexano	+

+: poco soluble, ++: soluble, +++: muy soluble.

Tabla II. Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels.

Metabolitos secundarios	Reactivo	Presencia
Glicósidos	Benedict	-
Aminoácidos	Ninhidrina	+++
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico	++
Flavonoides	Shinoda	+++
Quinonas	Borntrager	+
Taninos	Gelatina-sal	+++
Resinas	Acetato de cobre	-
Alcaloides	Dragendorff y Mayer	+
Saponinas	Espuma	+++
Lactonas	Hidroxamato férrico	++

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

En la primera fase de la investigación se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el tiempo de cicatrización y en la resistencia de la herida a la fuerza de tensión entre los animales tratados a diferentes concentraciones del extracto, determinándose que a la concentración al 5% tuvo mejor efecto cicatrizante **Tabla III y Gráfico 1**. El extracto a la concentración de 40% no presentó efecto cicatrizante ni de formación de costra.

Tabla III. Cicatrización de las diferentes dosis de extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels.

Concentración	Resistencia a la tensión (g)	Eficacia de la cicatrización (%)
2.5%	124.92±0.10	55.56
5%	156.90±0.13	69.40
10%	150.47±0.38	66.90
20%	107.87±0.20	47.95
30%	65.27±0.23	29.00

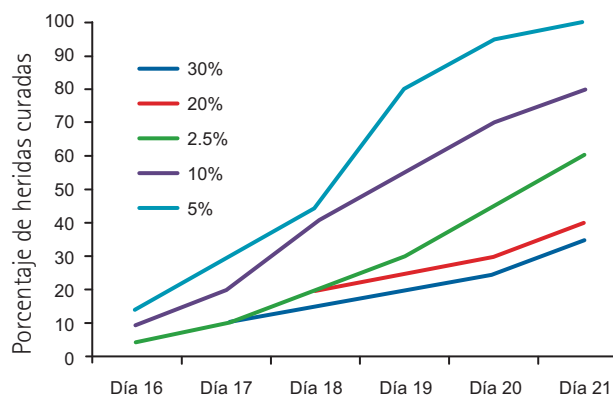


Gráfico 1. Porcentaje de heridas cerradas durante el tiempo de tratamiento con las diferentes dosis del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels.

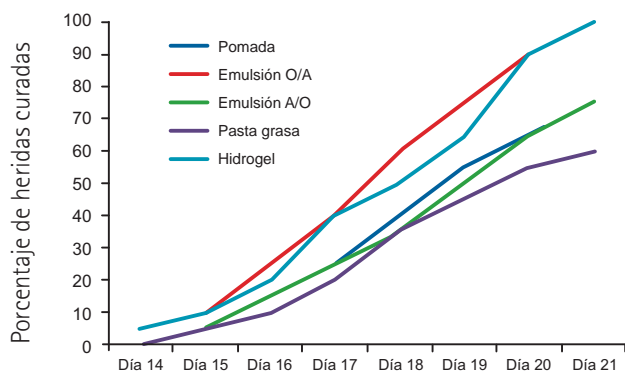
En la segunda fase de la investigación se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el tiempo de cicatrización y en la resistencia de la herida a la fuerza de tensión entre los animales tratados con las diferentes formulaciones elaboradas con el extracto de *Juglans neotropica* Diels "nogal" (**Tabla IV y Gráfico 2**).

Tabla IV. Porcentaje de eficacia de cicatrización de las diferentes formas farmacéuticas elaboradas con extracto de *Juglans neotropica* Diels al 5%.

Formulación	Resistencia a la tensión (g)	Eficacia de cicatrización (%)
Pomada	189.75±0.24	84.39
Emulsión O/A	212.20±0.21	94.40
Emulsión A/O	198.42±0.34	88.07
Pasta grasa	171.10±0.13	76.11
Hidrogel	211.13±0.12	93.86

O/A: Aceite en agua; A/O agua en aceite

En la tercera fase de la investigación también se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el tiempo de cicatrización y en la resistencia de la herida a la fuerza de tensión entre las dos formulaciones elaboradas (emulsión O/A e hidrogel) y Cicatrin® (**Tabla V**). Las composiciones en detalle de dichas formulaciones se presentan en la **Tabla VI**.



O/A: aceite en agua; A/O agua en aceite.

Gráfico 2. Porcentaje de heridas cerradas durante el tiempo de tratamiento con las diferentes formas farmacéuticas preparadas con el extracto hidroalcohólico al 5%.

Tabla V. Eficacia de cicatrización de las formas farmacéuticas con mejores resultados y del fármaco patrón.

Tratamiento	Resistencia a la tensión (g)	Eficacia de cicatrización (%)
Emulsión O/A	212.2±0.25	94.40
Hidrogel	211.3±0.25	93.96
Cicatrín®	185.1±0.15	82.34
Agua destilada	140.2±0.26	62.37

O/A: aceite en agua

Tabla VII. Histología de las formulaciones en emulsión O/A e hidrogel, del fármaco patrón y placebo.

Formulación	Epidermis	Inflamación	Fibroblastos	Fibras colágenas	Neoformación de vasos
Emulsión O/A	En regeneración	Escasa	++	++	Moderado
	Hiperplásica	Leve	+++	+++	Abundante
	Hiperplásica	Leve	+++	+++	Abundante
	En regeneración	Moderada	++	++	Moderado
Hidrogel	Hiperplásica	No	+++	+++	Abundante
	Hiperplásica	Escasa	+++	++	Moderado
	En regeneración	Leve	++	++	Moderado
	En regeneración	Escasa	+++	+++	Abundante
Fármaco patrón	Hiperplásica	Leve	++	++	Moderado
	Adelgazada	Crónica	+	+	Escasos
	Leve hiperplasia	M/S superficial	+	+	Escasos
	Leve hiperplasia	M/S superficial	+	+	No
Placebo	Adelgazada	Crónica	+	+	Escasos
	Leve hiperplasia	Escasa	+		Escasos
	Leve hiperplasia	M/S superficial	++	++	Escasos
	Adelgazada	M/S superficial	++	++	Escasos
	Adelgazada	Escasa	+	+	Escasos

M/S: moderada/severa

Tabla VI. Composición de las formulaciones empleadas en la tercera fase.

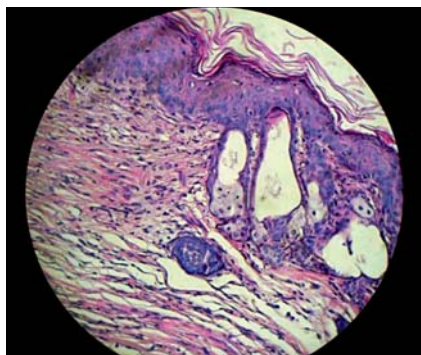
Emulsión O/A		Hidrogel	
Cera de abeja	13.0%	Carboximetilcelulosa	1.0%
Aceite mineral	21.5%	Glicerina	18.0%
Borato de sodio	0.5%	Agua	76.0%
Agua	60.0%	Extracto	5.0%
Extracto	5.0%		

O/A: aceite en agua

Al realizar la observación microscópica de los cortes histológicos, se pudo apreciar que las formas farmacéuticas elaboradas con el extracto tuvieron similares resultados, y mejores frente al grupo tratado con Cicatrín® (fármaco patrón) y con agua destilada (Tabla VII).

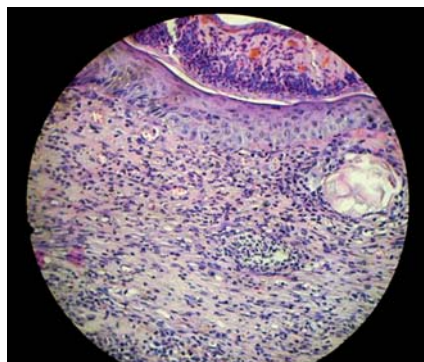
A la histología de la piel tratada con emulsión O/A al 5% de *Juglans neotropica* Diels se observó un tejido epidérmico regenerado y engrosado bajo la nueva epidermis, con abundante tejido de granulación compuesto por capilares en neoformación, presencia de macrófagos abundantes y fibroblastos, así como otras células en dermis. Se observó también continuidad en la piel, gran proliferación celular, reparación por tejido de granulación, angiogénesis y presencia

de colágeno con escasos leucocitos, cuya función es eliminar el tejido necrótico y fibrina. No se apreciaron hematomas ni infección, la costra ya se había desprendido (**Fotografía 1**).



Fotografía 1. Corte histológico de cicatriz experimental tratada con emulsión O/A al 5% de *Juglans neotropica* Diels. Continuidad en la piel, gran proliferación celular, reparación por tejido de granulación, angiogénesis y presencia de colágeno. HE 40X.

En la piel tratada con hidrogel al 5% de *Juglans neotropica* Diels se halló aumento del grosor de los bordes de la epidermis, debido a la actividad mitótica de las células basales. Igualmente se observó angiogénesis, presencia de macrófagos y abundantes fibroblastos y fibras de colágeno; la epidermis había formado una solución de continuidad. Debajo de la epidermis se observaba un proceso de reparación con la presencia de tejido de granulación. Las células basales de la epidermis proporcionaban una solución de continuidad con tejido conectivo denso; la fibrina se había desprendido (**Fotografía 2**).



Fotografía 2. Corte histológico de cicatriz experimental tratada con hidrogel al 5% de *Juglans neotropica* Diels. Solución de continuidad en tejido epidérmico y reparación mediante tejido de granulación. HE 40X.

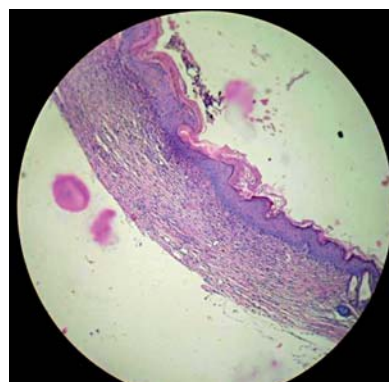
En el caso de la piel tratada con el fármaco patrón se observó abundante presencia de fibrina (costra), incipiente proliferación y migración celular y colágeno incipiente (**Fotografía 3**). Se observó así mismo que las células epidérmicas basales habían proporcionado una solución de continuidad con tejido conectivo denso; había infiltrado inflamatorio linfomononuclear. Había también agrupamiento

de células inflamatorias a predominio linfomononuclear con proliferación de células fibroblásticas, presencia de fibrina y colágeno incipientes y angiogénesis.



Fotografía 3. Corte histológico de cicatriz experimental tratada con el fármaco patrón. Abundante presencia de fibrina, incipiente proliferación, migración celular y formación de colágeno. HE 40X.

Finalmente en la histología de la piel tratada con placebo (**Fotografía 4**), observamos que el tejido epidérmico había formado una solución de continuidad; debajo de la epidermis se producía reparación mediante tejido de granulación, con leve inflamación.



Fotografía 4. Corte histológico de piel tratada con placebo. Presencia de fibrina, incipiente proliferación y migración celular, y leve inflamación. HE 10X.

DISCUSIÓN

Los resultados del ensayo de solubilidad indican que el extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels presenta marcada solubilidad en solventes polares, es decir una presencia mayoritaria de compuestos de alta polaridad; igualmente había presencia de aminoácidos, flavonoides, taninos y saponinas como componentes mayoritarios. La marcha fitoquímica pudo además evidenciar compuestos fenólicos y lactonas en menor cantidad.

La actividad cicatrizante del extracto fue expresada como resistencia a la tensión, demostrando una resistencia de 156.9g. La eficacia del extracto al 5% fue de 69.40%, el más alto porcentaje mostrado, constituyéndose por ello en la dosis mínima efectiva, habiendo logrado además el mayor porcentaje de heridas cerradas durante todo el período de tratamiento.

De las diferentes formulaciones elaboradas con la dosis mínima efectiva la emulsión O/A y el hidrogel tuvieron mejores resultados, con una eficacia de cicatrización de 94.40% y 93.86% respectivamente, además ambas formulaciones alcanzaron un 100% de cicatrización al día 21. Es necesario notar que el tipo de formulación juega un papel importante en la respuesta farmacológica, en este caso vemos que las formulaciones con contenido acuoso resultaron ser los mejores vehículos para el extracto que previamente demostró tener metabolitos polares en mayor cantidad.

La emulsión O/A tuvo una resistencia a la tensión de 212.2g y el hidrogel de 211.3g, valores muy similares, mientras que el fármaco patrón alcanzó un valor inferior de 185.1g y el placebo 140.2g. Tanto en el grupo tratado con el fármaco patrón como en el placebo murió un animal de experimentación, mientras que en los grupos tratados con las formulaciones a base de *Juglans neotropica* Diels

no murió ningún animal. Se sabe que esta especie además de contener taninos gálicos y catéquicos, que le confieren actividad cicatrizante y queratinizante, contiene compuestos con acción antibacteriana y antimicótica, lo cual podría haber evitado la infección de las heridas abiertas.

Los datos estadísticos se corroboraron con el estudio histológico, donde se observó que las formulaciones elaboradas con el extracto al 5% producían mayor cantidad de tejido de granulación, neovasos, fibroblastos y presencia de tejido colágeno, al compararla con el fármaco patrón y el placebo. Por lo tanto la aplicación de las formas farmacéuticas elaboradas con el extracto influye favorablemente sobre el cierre de las heridas, favoreciendo la cicatrización.

CONCLUSIÓN

Se realizó la evaluación de las formas farmacéuticas elaboradas con el extracto de *Juglans neotropica* Diels "nogal" a la concentración del 5% en ratones machos albinos, concluyéndose que la emulsión aceite en agua y el hidrogel presentaron mayor actividad cicatrizante frente a las otras formulaciones y al fármaco patrón, lo que pudo corroborarse con el estudio histológico.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. GUEVARA L. Plantas medicinales. 1ª ed. Cusco: Centro de estudios regionales andinos "Bartolomé de las Casas"; 1989.
2. ARÉVALO G. Las plantas medicinales y su beneficio en la Salud. 1ª ed. Lima: Ed AIDSESEP; 1994.
3. PALACIOS J. Plantas medicinales nativas del Perú. 2ª ed. Lima: CONCYTEC; 1997.
4. MACBRIDE, J.F. Juglandaceae, Flora of Perú. Field Museum of Natural History, Botanical Series Collation: 13(2/2): 263-66; 1936-81.
5. LOPEZ-LILLO A, SANCHEZ-DE LORENZO J.M. Arboles en España. Manual de identificación. 2ª ed. Madrid: Ed. Mundi-Prensa; 2001.
6. LOCK O. Investigación fitoquímica. Métodos de estudios de productos naturales. 2ª ed. Lima: Fondo Editorial PUCP; 1994.
7. VILLEGAS LF, FERNANDEZ ID, MALDONADO H, TORRES R, ZAVALETA A, VAISBERG A, et al. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Perú. J. Ethnopharmacol. 1997; 55(3):193-200.