



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS

LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL EXTRACTO
METANÓLICO DE LA CORTEZA DE *Ceiba aesculifolia* subsp.
parvifolia SOBRE HERIDAS SUPERFICIALES

TESIS PROFESIONAL

Para obtener el título de

Bióloga

Presenta:

Mara Janette Tolentino Velázquez

Directora de tesis

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. México. 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, y al laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores (FES) campus Iztacala.

Este trabajo fue dirigido por la Dra. María Margarita Canales Martínez.

Al jurado:

Dr. César Mateo Flores Ortiz

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez

M. en C. Karla Stephanie Martínez Elizalde

M. en C. Ana Bertha Hernández Hernández

Este trabajo fue financiado por:

PAPIT IN211614 y IN213713

PAPCA 2014 (No.9)

DEDICATORIAS

A mis padres Samuel y Teresa las palabras no me alcanzarán en esta vida para agradecer todo el sacrificio que han hecho para poder llegar hasta aquí, ya que todos sus desvelos por sacarnos adelante están reflejados en mis hermanas y en mí. Gracias por siempre alentarme a realizar mis sueños desde pequeña, a trabajar duro por lo que quiero y por todo el apoyo que me brindaron durante la carrera, ya que sin ustedes jamás hubiera terminado los amo con todo mi corazón y todo esto es por y para ustedes, LOS AMO.

A ti Saúl, que te puedo decir, no hay palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí, gracias por alentarme a ser mejor ser humano, cuando me decaía o sentía que ya no podía más estabas tú a mi lado para confortarme, de corazón te agradezco por ser parte de mi vida, poco a poco vamos cumpliendo las metas que nos hemos propuesto sé que siempre puedo contar contigo. Gracias por ser mi compañero de viaje en esta loca y divertida aventura de la biología.

A mis hermanas Lupita y Paola, porque, aunque a veces no nos llevemos tan bien, sé que puedo contar con ustedes y de algún modo me han ayudado, las amo mucho y espero que sea un buen ejemplo para ustedes, ya que ser la hermana mayor a veces es difícil.

A la gran familia que han vivido con nosotros y que de alguna manera han formado parte de esto, a mi abuela Susana, a mis tíos Gregorio, Celia y Toño, a mis primas Diana, Daniela y a los bebés más hermosos Ali y Daniis. Y a los que ya no están aquí, siempre los llevare en el corazón recordando vivir mi día a día como si fuera el último.

Maestra Margarita y Prof. Marco, por todo el apoyo que me brindaron y sobre todo por la experiencia de aprender a trabajar en equipo y aún más por compartir sus conocimientos, muchas gracias.

A mi laboratorio de Farmacognosia porque desde que llegué me sentí como en una segunda casa, gracias por ser excelentes personas, de todas he aprendido algo, pero en especial a:

Mis amigas Hatziry y Rebe, en verdad gracias por esta linda amistad, por hacer mis días más alegres, por siempre estar ahí en las buenas y en las malas, por la ayuda y los consejos en el trabajo de laboratorio; porque sé que siempre puedo contar con ustedes y que esta amistad crezca aún más, para mí son un ejemplo de superación y que no hay obstáculos grandes para salir adelante, las quiero mucho.

Mario y Michael gracias por toda la ayuda en el laboratorio y por siempre estar dispuesto a transmitir sus conocimientos, me hacen reír mucho y me la paso de lo mejor con ustedes, creo que todo este tiempo juntos me ha servido para conocerlos mejor y que esta amistad dure mucho, los quiero mucho. Son los mejores.

A todos los de los laboratorios de Farmacognosia e Inmunología. Ana, Karlita, Marlene, Less, Gus, Jose, Nelly, Óscar, Emanuel, Manuel, Alicia, Pili, Dany, Fany Judith, Rubén, porque de algún modo de todos he recibido la ayuda.

Y a todas mis amigas las “mantodeas” porque las cosas vividas en el salón y en la practicas jamás se me olvidarán, aunque el tiempo y la distancia nos separen las quiero. Pero en especial a Sandy porque has estado en los momentos más difíciles para mí eso jamás se me olvidará y creo que la amistad no se mide en años sino en momentos. Y a ti fertz por que fuiste la primera que conocí al inicio de la carrera. Gracias por todo.

*“La vida no es fácil para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa!
Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo”.*

Marie Curie

ÍNDICE	
Resumen	10
Introducción.....	12
Planteamiento del problema.....	19
Hipótesis.....	19
Objetivo general	19
Objetivos particulares.....	19
Material y métodos	20
Colecta del material vegetal.....	20
Obtención de los extractos.....	20
Evaluación de la actividad antimicrobiana	20
Evaluación de la actividad antioxidante	22
Contenido de fenoles totales.....	22
Contenido de flavonoides totales	22
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	23
Efecto cicatrizante	23
Grupos experimentales	23
Análisis estadísticos	25
Resultados	26
Obtención del extracto	26
Actividad antioxidante	28
Cuantificación de fenoles totales	33
Cuantificación de flavonoides	33
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	34
Método tensiométrico de Vaisberg.....	37
Evaluación de la eficacia cicatrizante.....	37
Histología	38
Discusión.....	40
Apéndices.....	48
Apéndice 1	48
Descripción botánica de <i>Ceiba aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i> Rose.....	48

Clasificación:.....	48
Nombre común:.....	48
Tipos de vegetación.....	49
Fenología.....	49
Distribución.....	49
Historia.....	50
Apéndice 2.....	51
Zona de colecta.....	51
Clima.....	52
Hidrografía.....	52
Edafología.....	52
Vegetación.....	53
Población.....	54
Apéndice 3.....	¡Error! Marcador no definido.
Método de difusión en agar.....	55
Apéndice 4.....	58
Actividad antioxidante.....	58
Apéndice 5.....	60
Método para la determinación de fenoles totales.....	60
Apéndice 6.....	62
Flavonoides totales.....	62
Apéndice 7.....	64
Método tensiométrico.....	64
Evaluación de la eficacia cicatrizante.....	64
Apéndice 8.....	65
Técnica histológica.....	65
Apéndice 9.....	68
Gráficas de la actividad antioxidante.....	68
Apéndice 10.....	70
Gráfica para la cuantificación de fenoles.....	70
Apéndice 11.....	71

Gráfica para la cuantificación de flavonoides.....	71
Apéndice 12	72
Registro fotográfico de los diferentes tratamientos	72
Referencias	74

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Tercer día de inflamación.....	14
FIGURA 2. Efecto del extracto MeOH1 y MeOH 2 de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i> . sobre bacterias Gram (+) y Gram (-)	29
FIGURA 3. Efecto del extracto MeOH1 y MeOH 2 de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i> . sobre una levadura.....	29
FIGURA 4. Efecto del extracto MeOH1 y MeOH 2 sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ...	30
FIGURA 5. Efecto del extracto MeOH1 y MeOH 2 sobre <i>Staphylococcus epidermidis</i>	30
FIGURA 6. Efecto del extracto MeOH1 y MeOH 2 sobre <i>Salmonella tipymurium</i>	31
FIGURA 7. Efecto del extracto MeOH1 y MeOH 2 sobre <i>Vibrio cholera</i>	31
FIGURA 8. Cromatograma del análisis del HPLC del extracto MeOH1 de <i>C. aesculifolia</i> . subsp. <i>parvifolia</i>	34
FIGURA 9. Eficacia cicatrizante del extracto MeOH1 de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	37
FIGURA 10. Cortes histológicos vistos a (10X): (A) Piel sana, (B) control negativo (C) control positivo, (D) Sin tratamiento.....	38
FIGURA 11. Cortes histológicos de las tres concentraciones de MeOH1 de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i> vistos a 10x: (E) 20%,(F) 10%,(G) 5%.....	39
FIGURA 12. Árbol y corteza de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	48
FIGURA 13. Distribución de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	49
FIGURA 14. Ubicación geográfica del poblado de San Rafael Coxcatlan, Puebla, México.....	51
FIGURA 15. Actividad antioxidante del extracto MeOH1 de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	68
FIGURA 16. Actividad antioxidante del extracto MeOH2 de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	69
FIGURA 17. Actividad antioxidante de la quercetina.....	69
FIGURA 18. Curva patrón de ácido gálico.....	70
FIGURA 19. Curva patrón de quercetina.....	71

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Antecedentes del género <i>Ceiba</i>	18
CUADRO 2. Cepas utilizadas para evaluar la actividad antimicrobiana.....	21
CUADRO 3. Rendimiento del extracto MeOH1 de la corteza.....	26
CUADRO 4. Rendimiento del extracto de la corteza.....	26
CUADRO 5. Actividad antimicrobiana de los extractos metanólico MeOH1, MeOH2 de la corteza de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	28
CUADRO 6. Capacidad antioxidante de ambos extractos.....	32
CUADRO 7. Cantidad de fenoles de los extractos.....	32
CUADRO 8. Resultados obtenidos de las tres pruebas realizadas capacidad antioxidante, fenoles y flavonoides.....	33
CUADRO 9. Picos de absorbancia	35
CUADRO 10. Concentraciones en ppm de extracto para la curva de actividad antioxidante.....	58
CUADRO 11. Concentraciones para preparar las soluciones problema para determinar fenoles totales.....	61

RESUMEN

Introducción. Desde la antigüedad, el hombre ha buscado diferentes métodos para el tratamiento de las heridas. En San Rafael, Coxcatlán, Puebla, la corteza de la especie *Ceiba aesculifolia subsp parvifolia*, es utilizada por los pobladores de la localidad para aliviar heridas que no pueden cicatrizar. En la región se le conoce a esta especie como “Pochote”. Una herida consiste en una lesión en alguna parte del cuerpo que daña las estructuras anatómicas y funcionales normales a consecuencia de un trauma. Para su restauración, se lleva a cabo un proceso llamado cicatrización que consiste en tres fases: inflamación, proliferación y maduración, las cuales son secuenciales y simultáneas establecidas dentro de un tiempo determinado, que intenta devolver la integridad anatómica, funcional y estética de los tejidos lesionados dejando una cicatriz. El objetivo de este trabajo fue corroborar científicamente la eficacia cicatrizante de los extractos de *C. aesculifolia subsp parvifolia*.

Metodología. Por maceración se obtuvo el extracto metanólico (MeOH1) de la corteza y con una partición se obtuvieron las fracciones hexánica (H) y metanólica libre de compuestos no polares (MeOH2). De MeOH1 y MeOH2 se evaluó: la actividad antimicrobiana (método de difusión en agar de Kirby-Baüer), la capacidad antioxidante (método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil), fenoles totales (Follin-Ciocalteu) y flavonoides totales (cloruro de aluminio) y se realizó una cromatografía líquida de alta resolución HPLC. Se utilizaron ratones machos (*Mus musculus*), de la cepa CD1 de 6-8 semanas de edad, a cada ratón se le hizo un corte aproximadamente de 1 cm en la región dorsal. Todos los tratamientos (extracto metanólico al 5%, 10%, 20%, Recoverón NC, gel a base de carbopol) se aplicaron por vía tópica cada 12 horas durante 10 días. Un lote de ratones se utilizó para evaluar la cicatrización por el método tensiométrico y otro para el análisis histológico.

Resultados. MeOH1 y MeOH2 presentaron actividad antibacteriana y antifúngica (sobre las cepas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* y *Candida albicans*), la capacidad antioxidante obtuvo una $CA_{50}=13.72\mu\text{g/mL}$ para MeOH1 y $CA_{50}=16.72\mu\text{g/mL}$ para MeOH2 y está relacionada con la cantidad de fenoles y flavonoides totales. MeOH1 y MeOH2 presentaron fenoles con una concentración de 440 mg eAG/g, para los flavonoides se obtuvo una concentración en MeOH1 de 6.0 $\mu\text{g eQ/g}$ y para MeOH2 de 5.3 $\mu\text{g eQ/g}$. En cuanto a la cromatografía líquida de alta resolución HPLC se encontró que el compuesto predominante fue la catequina y las concentraciones de 5% y 10 % presentaron el 60% y 100% de eficacia cicatrizante, lo cual se confirmó realizando la histología de los diferentes tratamientos y corroboró que el extracto MeOH1 favorece el proceso de cicatrización en heridas superficiales.

Conclusión. El extracto de *Ceiba aesculifolia*. subsp. *parvifolia* favorece la actividad cicatrizante.

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, el hombre ha buscado diferentes métodos para el tratamiento de las heridas, acelerar el proceso de cicatrización de esas lesiones, ya que entre más rápido y eficaz sean, menores serán las molestias para ellos y rápidamente recobrarán su buen estado de salud (Rodríguez y González 2011).

Una herida se puede definir como una lesión en alguna parte del cuerpo que daña las estructuras anatómicas y funcionales normales a consecuencia de un trauma, la lesión puede ocurrir por cualquier tipo de fuerza mecánica o térmica que rompen la piel (Teller y White 2016). Independientemente del tipo de herida que se trate y de la extensión que abarque la pérdida de tejido, en cualquier curación de una herida ocurren tres fases que se solapan en el tiempo y no se pueden disociar unas de otras. Cuando se produce la herida empieza la cicatrización que es un proceso de reparación ordenado con una secuencia de eventos biológicos, establecida dentro de un tiempo determinado, que intenta devolver la integridad anatómica, funcional y estética de los tejidos lesionados dejando una cicatriz (Sepúlveda y Carolis 2005).

Esta serie de eventos complejos son activados a partir del daño producido y está orientado a estimular el crecimiento, reparación y remodelación del tejido, lo que permite el restablecimiento de las características físicas, mecánicas que favorecen las condiciones normales del tejido. El proceso de cicatrización es una secuencia de eventos que depende de la dinámica celular del tejido lesionado y circundante estas células permiten la liberación de factores de crecimiento y citocinas para llevar a cabo la reparación en tres fases: aguda o inflamatoria, proliferación celular y remodelación tisular (Corredor et al., 2013).

Con la hemostasia se inicia de inmediato la inflamación la cual se presenta con los signos físicos de eritema, calor, edema y dolor. La inflamación representa una dilatación de los vasos sanguíneos, con aumento de su permeabilidad, y el reclutamiento de los leucocitos hacia el foco de lesión y se detiene la hemorragia por medio de las plaquetas y de la formación de fibrina. Los episodios inflamatorios están dominados secuencialmente por los neutrófilos y los macrófagos, los dos asumen la función crítica de desbridamiento (es la eliminación de tejido infectado,

dañado o muerto para que la herida pueda sanar correctamente) pero los macrófagos también fomentan el reclutamiento y la activación de células necesarias para las etapas posteriores de la cicatrización. Aunque se sabe bien que las células inflamatorias regulan la reparación de la matriz del tejido conjuntivo, hoy en día se han precisado los mensajeros de la regulación de diversas citocinas y factores de crecimiento y la activación de células migratorias (Figura 1). (Teller y Therese 2016).

En la proliferación los episodios inflamatorios llevan al desbridamiento de la herida, una vez desbridada, la cicatrización entra en una fase de reparación en este período, una vez que empieza a enviar las respuestas agudas de la hemostasia e inflamación. Se coloca un andamio para la reparación de la herida mediante la angiogenia, la fibroplasia y la epitelización esta fase se caracteriza por la proliferación celular (fibroblastos y colágeno) con el objetivo de que se vuelvan a formar los vasos destruidos y se rellene la zona defectuosa mediante tejidos de granulación (Seymour y Schwartz 2000).

Finalmente, la maduración y remodelación son los eventos de reparación que comienzan con la hemostasia y la creación de un coágulo de fibrina-fibronectina, esta fase se caracteriza por la formación, organización y resistencia que obtiene el tejido al formar la cicatriz, lo cual se obtiene de la contracción de la herida generada por los miofibroblastos y la organización de los paquetes de colágeno. Todos los eventos anteriores intervienen para la reparación del tejido lesionado, los cuales son dirigidos por factores de crecimiento generados por células implicadas tales como los queratinocitos, fibroblastos y células inflamatorias, estos factores actúan en cada una de las etapas del proceso de cicatrización el cual es dinámico y está mediado por proteínas solubles (citocinas y factores de crecimiento) y células encargadas de la proliferación celular para el restablecimiento del tejido lesionado (Corredor et.al., 2013).

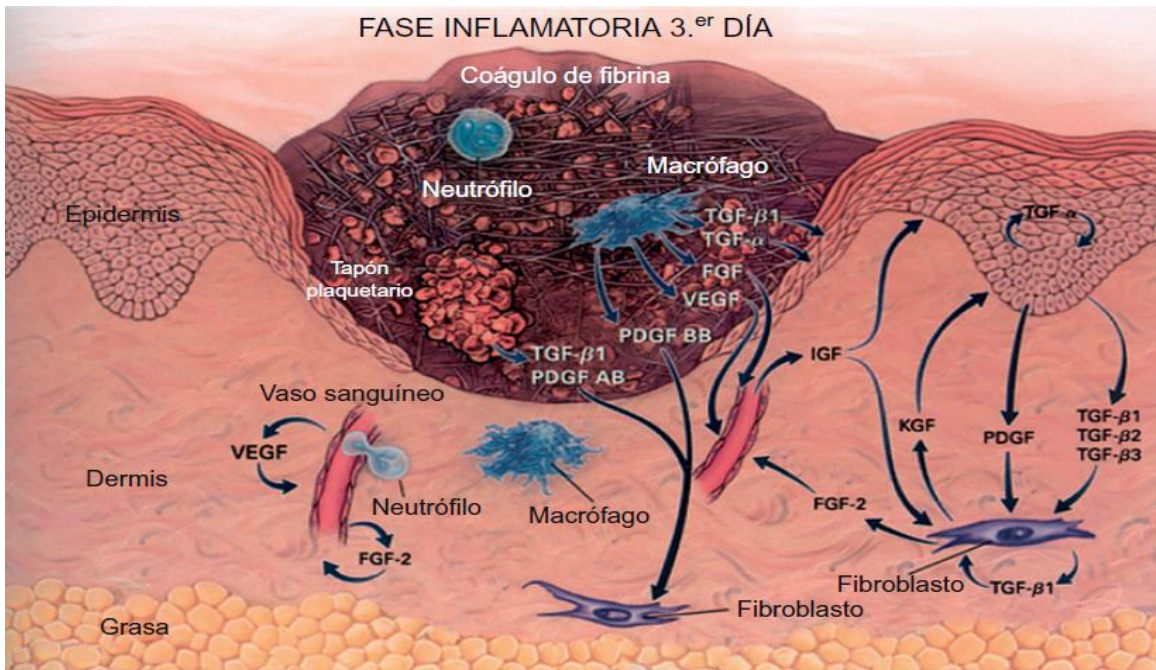


Figura 1. Tercer día de la fase inflamatoria (Tomado de Teller y Therese 2016).

Los fármacos empleados para la reepitelización o aumento de la fuerza tensil de las heridas, pueden clasificarse bajo el criterio de su aplicación, generalmente es tópica para aquellos que se utilizan en ungüentos o cremas. Igualmente hay fármacos de uso parenteral, que incluyen vía oral, intramuscular e inyecciones directas en los sitios o alrededor de las heridas (Valencia, 2010). Sin embargo, a través de los años, tanto médicos como la industria farmacéutica se han abocado en la búsqueda de un cicatrizante tópico ideal, seguro y eficaz para su uso con mínimos o nulos efectos adversos para el paciente (Anduaga y Sánchez 2005), pero la mayoría de estos medicamentos que están en el mercado poseen costos elevados o son pocos accesibles para los pacientes.

Por lo que una alternativa es la medicina tradicional ya que se ha utilizado desde hace miles de años y es considerada como el conjunto de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentadas en las teorías, creencias y experiencias de diferentes culturas y que se utilizan para mantener la salud, prevenir y tratar enfermedades, abarcando una amplia variedad de terapias y prácticas que varían entre países y entre regiones (OMS 2016).

La OMS estima que alrededor del 80% de la población mundial, ubicada en regiones con bajo desarrollo e ingresos limitados, hace uso de la medicina tradicional como alternativa de atención primaria de varios problemas de salud, utilizando procedimientos que involucran el uso de extractos de plantas o sus principios activos ya que son accesibles y más baratos que los productos farmacéuticos (Bermúdez et al., 2005; Schlaepfer y Mendoza-Espinoza., 2010). México es considerado como uno de los países con mayor diversidad de biota en todo el mundo, posee el cuarto lugar en cuanto a su diversidad de plantas fanerógamas, con aproximadamente 30,000 especies que representan entre el 10 y 12% del total mundial (Alanís et al., 2004).

Las plantas han desarrollado diversas estrategias para combatir las condiciones de estrés biótico y abiótico, tales como el daño ocasionado por heridas y el ataque por insectos o microorganismos patógenos, éstas sintetizan enzimas que degradan la pared celular de microorganismos, además, tienen la capacidad de inactivar tóxicos de origen microbiano. Otra estrategia utilizada es la protección química, en la cual la planta produce metabolitos secundarios (MS) con actividad antimicrobiana, en contra de herbívoros, o con actividad antioxidante (Croteau et al., 2000). Algunos de los metabolitos de las plantas presentan propiedades específicas que permiten que el hombre los utilice como agentes terapéuticos para tratar algunas enfermedades. Particularmente, algunos son activos contra parásitos, bacterias, levaduras y virus (Ávalos y Perez-Urria 2009).

El conocimiento, estudio y utilidad de estos metabolitos ha propiciado el desarrollo de la fitoquímica a través de la incorporación de nuevas técnicas de extracción, purificación e identificación de moléculas biológicamente activas, como materia prima para la fabricación de productos farmacéuticos, cosméticos, nutracéuticos y agropecuarios (Pabón y Hernández, 2012).

En la actualidad se conocen aproximadamente 20,000 estructuras de metabolitos secundarios que por su composición química son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los metabolitos secundarios que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los Metabolitos Secundarios no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos, y fenilpropanoides (Sepúlveda et al., 2003).

Dentro de los compuestos fenólicos, los flavonoides son uno de los más grandes grupos de metabolitos secundarios, se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes de la planta por encima de la superficie del suelo. Los flavonoides son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza. Se han identificado más de 5000 flavonoides diferentes (Martínez et al., 2002). Al consumirlos obtenemos de ellos propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorales, anticancerígenas y antioxidantes (Escamilla et al., 2009).

La familia Bombacaceae comprende 20 géneros y alrededor de 180 especies. Un ejemplo de estas propiedades se encuentra en la especie *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia* la cual se distribuye en varios estados de la república Mexicana como: Guerrero, Morelos, Puebla, Oaxaca, Tabasco y Yucatán (Reyes et al., 2004). Se han realizado estudios de las propiedades fitoquímica, sin embargo, son escasos.

La corteza de esta especie es utilizada por los pobladores de la localidad de San Rafael, Coxcatlán, en la medicina tradicional en el tratamiento de la diabetes, enfermedades renales, tumores, gastritis y para aliviar heridas (Canales et al., 2005). Por lo que se ha considerado como una de las especies de importancia económica. Además, se reportan 12 usos diferentes, entre la gente de las comunidades de San José Tilapa, San Rafael y Coxcatlán, Puebla, de las cuales destacan el uso: comestible (raíces, semillas y flores) y forraje.

En la actualidad, la población local en el Valle de Tehuacán se consumen semillas, raíces y flores de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*. Además, el tallo y las ramas se utilizan como leña, las flores como cebo para cazar ciervos, fruto mesocarpio similar al algodón como relleno de almohadas y los picos de corteza para la elaboración de artesanías (Carranza, 2000).

Hay antecedentes sobre diferentes usos y formas en las que utilizan en general *Ceiba*, como su comprobada actividad antibacteriana, sin embargo, este es el primer trabajo que pretende corroborar científicamente el uso de *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia* sobre la regeneración epitelial y así tener un sustento científico que valide su uso tradicional.

Como se puede observar en el Cuadro 1, son escasos los estudios sobre especies del género *Ceiba* relacionado con sus propiedades medicinales.

En particular de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*, con respecto a sus propiedades medicinales. Sólo se han realizado 3 trabajos sobre sus propiedades antimicrobianas. Por lo antes mencionado, la relevancia del presente trabajo es contribuir al conocimiento sobre esta especie comprobando científicamente su actividad cicatrizante.

Cuadro 1. Antecedentes del género *Ceiba*

ESPECIE	PARTE UTILIZADA	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	LUGAR	REFERENCIA
<i>Ceiba pentandra</i> .	Extracto metanólico de la Corteza	Se registraron dos nuevas isoflavonas, pentandrin (1) y el glucósido pentandrin (2), se aislaron de la corteza madre de <i>Ceiba pentandra</i> junto con β -sitosterol y su 3- O - β - D -glucopiranosido, que se aisló por primera vez de esta planta.	Camerún	Ngounoua et al., 2000
<i>Ceiba pentandra</i>	Extracto acuoso de la Corteza	Se administró el extracto acuoso de la corteza a ratas diabéticas (inducida por estreptozotocina) y causó una reducción estadísticamente significativa en el nivel de glucosa. El extracto no fue tóxico.	Nigeria	Ladeji et al., 2003
<i>Ceiba aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i> rose	Extracto metanólico de corteza	Reportan la actividad antibacteriana del extracto metanólico de la corteza sobre: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Vibrio cholera</i> .	San Rafael Coxcatlán, Puebla	Canales et al., 2005
<i>Ceiba aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	-	Se realizó un estudio entonobotánico para conocer las formas de uso que se le da a <i>Ceiba aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i> , se reportó 12 maneras diferentes pero el consumo y comercialización de las semillas son los más importantes.	Valle de Tehuacán.	Avendaño et al., 2006
<i>Ceiba aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	Se realizó un extracto metanólico crudo y metanólico libre de compuestos no polares de la corteza	Se obtuvo actividad en cepas de bacterias (Gram positivas y Gram negativas) y no tienen actividad antifúngicas. Además, se identificaron: fenilpropanoides, cumarina, terpenoides e isoflavonas en las fracciones con actividad antibacteriana	San Rafael, Coxcatlán, Puebla	Orozco, 2010
<i>Ceiba aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	Extracto metanólico de la fibra del pochote	Se registró la actividad antimicrobiana de la fibra del "pochote" <i>Ceiba aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i> de San Rafael, Coxcatlán, Puebla.	San Rafael, Coxcatlán, Puebla	Franco, 2014

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿El extracto metanólico de *C. aesculifolia* subsp *parvifolia* tendrá un efecto cicatrizante?

HIPÓTESIS

Si la corteza de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* es empleada en la medicina tradicional para aliviar heridas infectadas, gastritis, úlceras y se ha comprobado científicamente que tiene actividad antibacteriana, entonces se espera que favorezca el proceso de cicatrización en un modelo murino de cicatrización.

OBJETIVO GENERAL

•Determinar la actividad cicatrizante del extracto metanólico de *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el rendimiento del extracto.
2. Corroborar la actividad antimicrobiana del extracto MeOH1 y fracción MeOH2.
3. Determinar la capacidad antioxidante.
4. Cuantificar el contenido de fenoles y flavonoides totales.
5. Determinar la composición química usando una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
6. Evaluar la capacidad cicatrizante mediante el método tensiométrico de Vaisberg.
7. Determinar la actividad cicatrizante a nivel histológico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Colecta del material vegetal

Las cortezas de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* fueron colectadas en San Rafael, Coxcatlán, Puebla (Apéndice 2), se depositó un ejemplar en el herbario IZTA para su identificación y número de colecta (RRL146).

Obtención de los extractos.

El extracto de la corteza se obtuvo por el método de maceración (Domínguez, 1979). Se pesó la corteza seca y se colocaron en trozos en un matraz, se obtuvo el extracto metanólico crudo (MeOH1) de la corteza, el cual se filtró y destiló a presión reducida en un rotavapor. El extracto se colocó en un recipiente de vidrio con la finalidad de completar la evaporación del solvente. Para obtener la fracción metanólica libre de compuestos no polares (MeOH2), el extracto crudo (MeOH1) se sometió a una partición con hexano. El rendimiento se determinó por diferencia de peso con relación al peso seco de la planta.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

En el cuadro 2 se muestra la lista de los microorganismos empleados.

Cuadro 2. Cepas utilizadas para evaluar la actividad antimicrobiana.

TIPO	CEPA	Clasificación, serotipos o donadas por:
GRAM +	<i>Staphylococcus aureus</i>	Donada por la CUSI caso clínico
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Donada por la CUSI caso clínico
	<i>Salmonella typhimurium</i>	Donada por las Fes Cuautitlán a través de la Profa. María de Jesús Sánchez Onofre
GRAM -	<i>Escherichia coli</i>	Donada por la CUSI caso clínico 1
	<i>Escherichia coli</i>	Donada por la CUSI caso clínico 2
	<i>Vibrio cholerae</i>	Caso clínico
LEVADURA	<i>Candida albicans</i>	ATCC 32354 laboratorio de análisis clínicos de la FESI

La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó de acuerdo con la técnica de difusión en agar de Kirby-Baüer (Apéndice 3), para las bacterias se utilizaron sensidiscos con 2 mg de ambos extractos (MeOH1 y MeOH2), como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con cloramfenicol (25µg por disco). Para las levaduras se utilizaron sensidiscos impregnados con nistatina (25µg por disco) y 2mg de ambos extractos (Cole,1994; Vanden Berghe y Vlietinck,1991; Beer y Sherwood,1945 y CLSI,2012)

Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó con el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH). Método modificado de Murillo (2006). Para la determinación de la Concentración Antioxidante Media (CA₅₀), se utilizaron las siguientes concentraciones: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 ppm. Como control positivo se utilizó quercetina a las mismas concentraciones que el compuesto problema. Como blanco se utilizaron pozos con 200 µL de MeOH grado HPLC y se determinó la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA (Okusa et al., 2007) (Apéndice 4).

Contenido de fenoles totales

Para el contenido de fenoles totales se midió por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, utilizando el reactivo de Follin-Ciocalteu como agente oxidante (Apéndice 5). Se realizó una curva de calibración de ácido gálico con las concentraciones: 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/mL. La concentración que se utilizó para el extracto fue de 50 µg/mL y se interpoló en la curva patrón de ácido gálico. Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 760 nm. Cada concentración se determinó por triplicado (método modificado de Singleton et al., 1999).

Contenido de flavonoides totales

La determinación del contenido de flavonoides totales se llevó a cabo por el Método de Dowd (Apéndice 6) se preparó una solución de AlCl₃ al 2%. Se realizó una curva patrón de quercetina a diferentes concentraciones (1-100 µg/mL) y una concentración del extracto de 0.2 mg/mL. Las absorbancias se determinaron a 415 nm. Los resultados se expresaron como equivalentes de quercetina/g de extracto (Ramamoorthy y Bono, 2007).

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se realizó en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Hewlett Packard, Agilent Technologies series 1100 con un detector de arreglo de diodos (DAD por sus siglas en inglés y equipado con el software Agilent Chem-Station for LC. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés), utilizando una columna Allsphere ODS-1, de 250 x 4.6 mm, tamaño de partícula de 5µm. Corrida isocrática con mezcla de MeOH-acetonitrilo-agua destilada y H₃PO₄ (25-25-50; 0.1%), flujo de 1mL/min. Detector de arreglo de diodos (DAD a longitud de onda de 280 nm con barrido completo de 200-400 nm). Se inyectan 30 µL y entran al aparato 20 µL (flop 20 µL).

EFECTO CICATRIZANTE

GRUPOS EXPERIMENTALES

Se utilizaron ratones machos (*Mus musculus*), de la cepa CD1 de 6-8 semanas de edad, se obtuvieron del Bioterio de la FES-Iztacala UNAM, se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos bajo la norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Los ratones fueron distribuidos en 7 grupos experimentales (n= 6 ratones por grupo), que fueron los mismos para todos los ensayos, los cuales fueron:

1. Piel sin lesión

Grupos con lesión

2. Sin tratamiento (sin gel, ni extracto)

3. Control positivo (Recoverón NC)

4. Control negativo con gel a base de carbopol.

5. Extracto metanólico MeOH1 al 20%

6. Extracto metanólico MeOH1 al 10 %

7. Extracto metanólico MeOH1 al 5%

Se evaluó el efecto cicatrizante por medio del método tensiométrico, para lo cual se les depiló con la crema depiladora Veet para piel sensible 24 horas antes del experimento. El día del ensayo, los ratones se anestesiaron inhalado Isoflurano al 5% en una cámara de anestesia (Hawk et al., 1999). Posteriormente se les practicó un corte de 1 cm. de largo aproximadamente en la piel depilada siguiendo la simetría del animal, utilizando un bisturí del número 5. La incisión se realizó considerando todas las capas de la piel (epidermis, dermis e hipodermis).

Las sustancias a evaluar (extracto y controles) se aplicaron de forma tópica, disueltos en gel a base de carbopol, en las concentraciones ya mencionadas, Para el caso del control positivo (Recoverón NC), este fue aplicado utilizando un hisopo estéril hasta cubrir la herida en su totalidad. Los tratamientos fueron aplicados cada 12 horas, durante 10 días.

La fuerza o tensión en gramos en que abre la herida en el proceso de cicatrización, fue medida utilizando un dinamómetro con escala de 100 y 500 g. Para lograr la medición se utilizaron ganchos de metal, los cuales fueron insertados en la piel periférica a la herida, a los que se sujetó el dinamómetro que se tensó hasta observar la apertura de la herida y en ese momento se tomó la lectura del dinamómetro en gramos.

HISTOLOGÍA

Se obtuvieron las muestras de piel del área de la herida aproximadamente 1cm; posteriormente se fijaron en formol y se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente hasta llegar a etanol absoluto. Después, el tejido se pasó por solventes intermediarios como xileno, en donde las muestras suelen transparentarse, para después ser incluidas en parafina, constituyendo así los bloques histológicos que fueron cortados con el micrótopo. Los cortes fueron de 4 micras y se colocaron en el portaobjetos pasándolos por un baño de flotación para estirar el tejido.

Tinción Hematoxilina – Eosina

Para realizar la tinción, los cortes se colocaron 24 horas antes en un horno para ser desparafinados por medio de calor. Posteriormente se hidrataron los cortes realizando lavados con xilol y alcoholes en orden decreciente y finalmente con agua, después los cortes se dejaron 5 minutos en Hematoxilina, pasado ese tiempo, se hicieron lavados pasando por agua amoniacal y después se colocaron en Eosina por 5 minutos para continuar con la deshidratación de los cortes con alcoholes en forma creciente para finalmente ser montados y 24 horas después están listos determinar por microscopia la herida además de observar fotográficamente si cerró la herida de todos los tratamientos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizaron análisis estadísticos (ANOVA de dos vías) para determinar si existe alguna diferencia significativa, entre la actividad antimicrobiana de los extractos MeOH1 y MeOH2 de la corteza sobre bacterias Gram (+) y Gram (-) y (ANOVA de una vía) para las levaduras.

Para el análisis de la actividad antioxidante flavonoides, se realizaron regresiones, utilizando la línea de tendencia que tenga un mejor ajuste (R^2).

RESULTADOS

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

Las cortezas de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*, se colectaron durante el mes de Agosto del 2007, en San Rafael, Coxcatlán, Puebla. En el Cuadro 3 se muestran el rendimiento obtenido del extracto MeOH1 y los gramos colectados de la corteza.

Cuadro 3. Rendimiento del extracto MeOH1 de la corteza.

Material seco (g)	Peso del extracto (g)	Rendimiento
940.0	84.0	8.94%

En el Cuadro 4 se presenta la partición hexánica del extracto MeOH1 en donde se observa que, de la partición del extracto, MeOH2 tuvo un mayor rendimiento en comparación con la fase no polar (extracto hexánico), lo cual indica que el extracto presenta una mayor cantidad de compuestos de polaridad alta.

Cuadro 4. Rendimiento del extracto de la corteza.

Extracto crudo MeOH 1 (g)	Fracción MeOH 2		Fracción H	
	g	%	g	%
65.0	57.34	88.2	6.24	9.6

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto MeOH1 y MeOH2 de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* mostró que ambos extractos tuvieron actividad antimicrobiana siendo el extracto MeOH1 el que inhibió a un mayor número de cepas, ya que tuvo actividad sobre 4 de 6 cepas bacterianas en una concentración de 2mg, así como la actividad sobre la levadura como se observa en el cuadro 5.

En cuanto en el análisis realizado (Figura 2) se observa que sí hubo diferencias significativas con respecto al control (cloranfenicol), sin embargo, no hay diferencias entre los tratamientos ni para Gram (+) ni para Gram (-). Para la levadura, presentó diferencia significativa en comparación con el control (nistatina) y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Figura 3).

El análisis detallado para cada una de las cepas bacterianas, mostró que para *Staphylococcus aureus* si hubo diferencias significativas con respecto al control y entre tratamientos no presentó ninguna diferencia, es decir los halos de inhibición de MeOH1 y MeOH2 fueron similares para esta bacteria (Figura 4). Sin embargo, para *S. epidermidis*, si hubo diferencias significativas en comparación con el control y los tratamientos, MeOH1 mostró los mayores halos de inhibición (Figura 5).

Para las bacterias *Salmonella typhimurium* (Figura 6) y *Vibrio cholera* (Figura 7) en ambos casos existen diferencias significativas en cuanto al control, pero no en los tratamientos, es decir MeOH1 y MeOH2 producen halos de inhibición de diámetros similares.

Cuadro 5. Actividad antimicrobiana de los extractos metanólico MeOH1, MeOH2 de la corteza de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.

BACTERIAS	Halos de inhibición del extracto metanólico		
	MeOH1	MeOH2	Controles positivos
	2mg	2mg	Cloranfenicol
<i>Staphylococcus aureus</i>	9.0±0	9.0±0	30.0±0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6.0±0	N/A	30.0±0
<i>Salmonella typhimurium</i>	9.0±0	9.0±0	25.0±0
<i>Escherichia coli</i> (cc1)	N/A	N/A	N/A
<i>Escherichia coli</i> (cc2)	N/A	N/A	N/A
<i>Vibrio cholerae</i> (cc)	9.0±0	8.6±0.57	26.0±0
LEVADURA	2mg	2mg	Nistatina (mm)
<i>Candida albicans</i>	10.3±0.57	10.0±0	21.0±0

N/A: no presentó actividad.

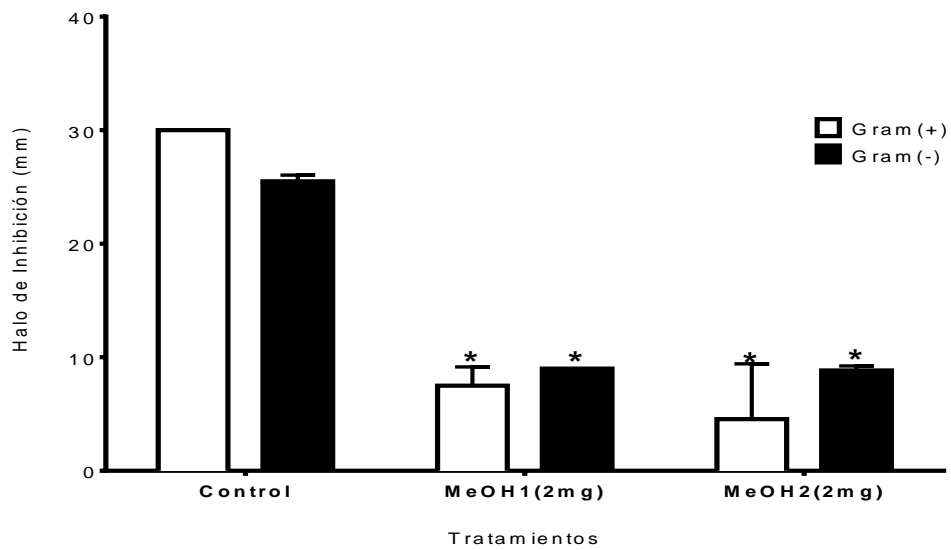


Figura 2. Efecto del extracto MeOH1 y MeOH 2 de *C. aesculifolia* subsp.*parvifolia*. sobre bacterias Gram (+) y Gram (-).

* diferencia significativa con respecto al control, no hay diferencias entre los tratamientos ni para GRAM+ ni para GRAM-.

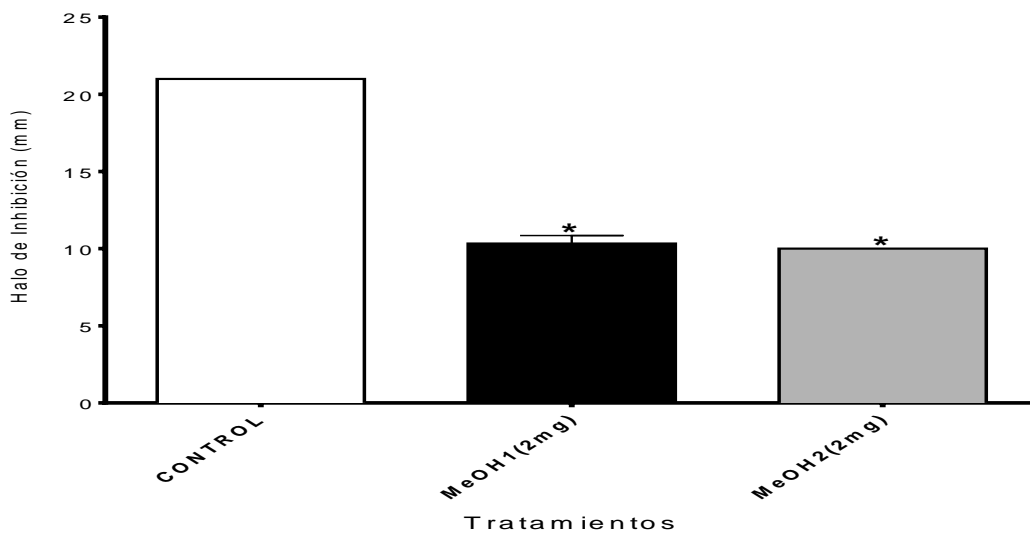


Figura 3. Efecto del extracto MeOH1 y MeOH 2 de *C. aesculifolia* subsp.*parvifolia*. sobre una levadura (*Candida albicans*).

* diferencia significativa con respecto al control, no hay diferencias entre los tratamientos.

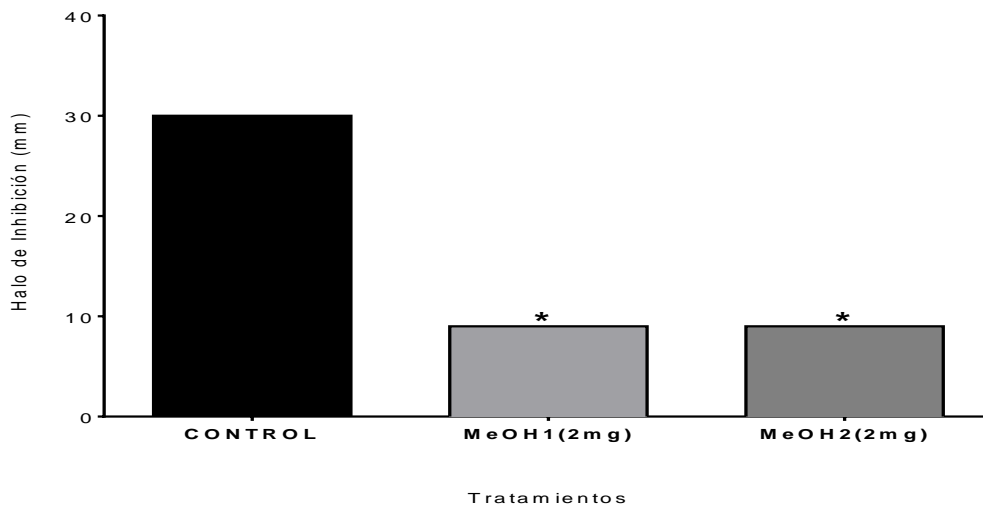


Figura 4. Efecto del extracto MeOH1 y MeOH2 sobre *Staphylococcus aureus*.

* diferencia significativa con respecto al control, no hay diferencias entre los tratamientos.

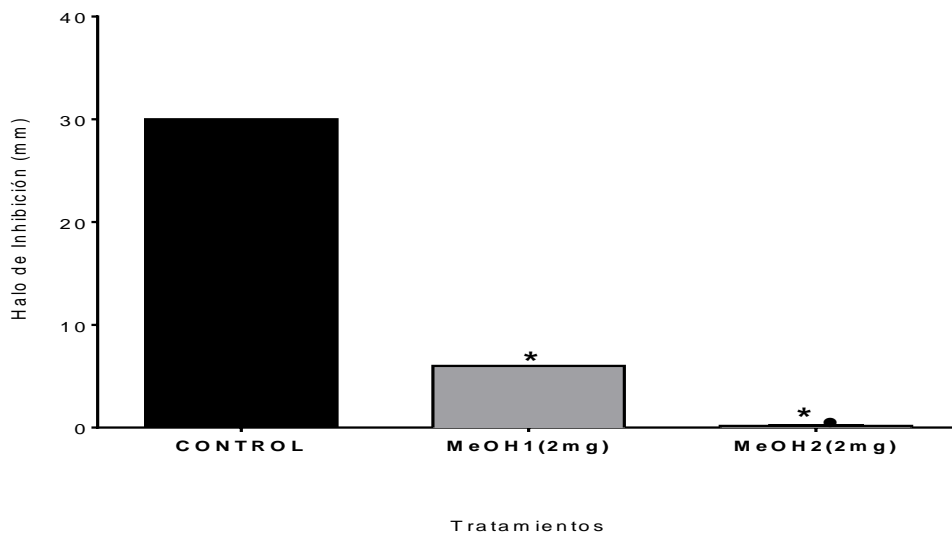


Figura 5. Efecto del extracto MeOH1 y MeOH 2 sobre *Staphylococcus epidermidis*.

* diferencia significativa con respecto al control.

*si hay diferencia significativa entre los tratamientos.

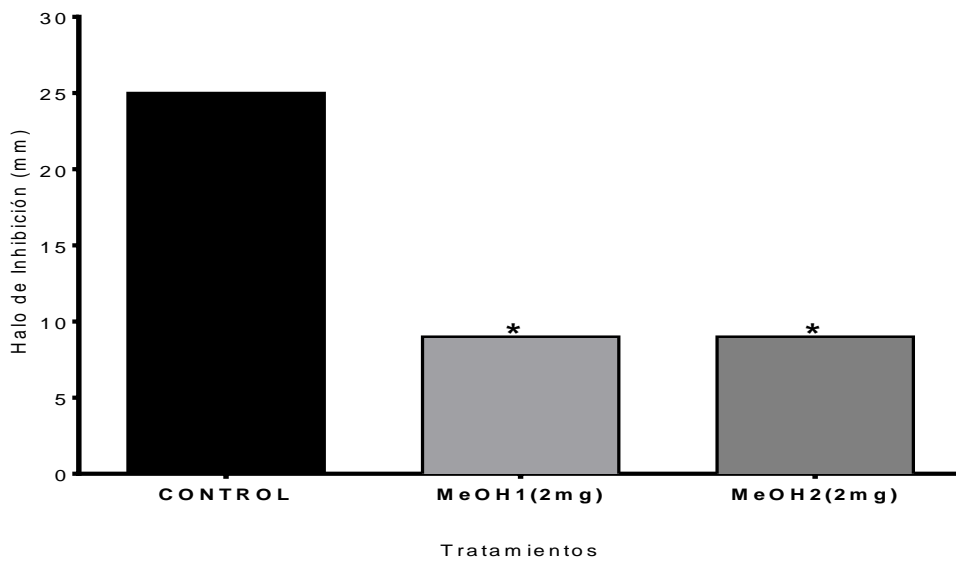


Figura 6. Efecto del extracto MeOH1 y MeOH 2 sobre *Salmonella typhimurium*.

* diferencia significativa con respecto al control, no hay diferencias entre los tratamientos.

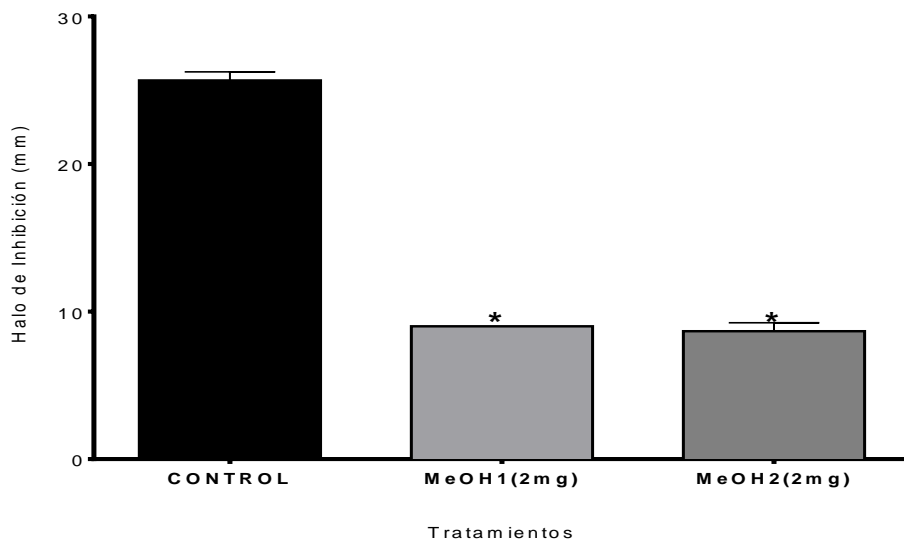


Figura 7. Efecto del extracto MeOH1 y MeOH 2 sobre *Vibrio cholera*.

* diferencia significativa con respecto al control, no hay diferencias entre los tratamientos.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos MeOH1 y MeOH2 de la corteza del pochote mediante el método de reducción de DPPH. Obteniendo los siguientes resultados: *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* MeOH1 obtuvo una CA₅₀ de 13.72 µg/mL y MeOH2 una CA₅₀ de 16.72 µg/mL (Figura 15,16). Como control positivo se utilizó quercetina (Figura 17), el cual es un antioxidante conocido, mostrando una CA₅₀= 3.02 µg/mL. Podemos observar que ambos extractos presentaron reacción para reducir el DPPH y además su actividad antioxidante es fuerte de acuerdo al criterio de Scherer y Teixeira (2009), en donde se menciona que si el valor del IAA (índice de actividad antioxidante) es entre 1.0 a 2.0 la capacidad es fuerte. En comparación con la quercetina, que al ser un compuesto puro y un flavonol, presentó un IAA de 9.93 considerada entonces su capacidad antioxidante como muy fuerte (IAA >2.0).

Cuadro 6. Capacidad antioxidante de ambos extractos.

Extracto	CA₅₀ (µg/mL)	IAA
MeOH1	13.72	2.18
MeOH2	16.72	1.79
Quercetina	3.02	9.93

CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES

El resultado obtenido al cuantificar los fenoles totales de los extractos de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Cantidad de fenoles de los extractos

EXTRACTO	mg (eAG)/g
MeOH1	440
MeOH2	440

CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

La concentración total de flavonoides del extracto MeOH1 fue de 6.0 mg eQ/g y MeOH2 5.3 eQ/g (equivalentes de quercetina por gramo de extracto). En el cuadro 8, se muestra la relación que existe entre la concentración de fenoles y flavonoides con respecto a la capacidad antioxidante.

Cuadro 8. Resultados obtenidos de las tres pruebas realizadas

Extractos	MeOH1	MeOH2
Fenoles totales	440 mg (eAG)/g	440 mg (eAG)/g
Flavonoides totales	6.0 mg eQ/g	5.3 mg eQ/g
CA ₅₀	13.72 µg/mL	16.72 µg/mL

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

De acuerdo con los resultados del HPLC, con base a los tiempos de retención y el espectro de absorción bajo luz UV, el extracto presentó catequina.

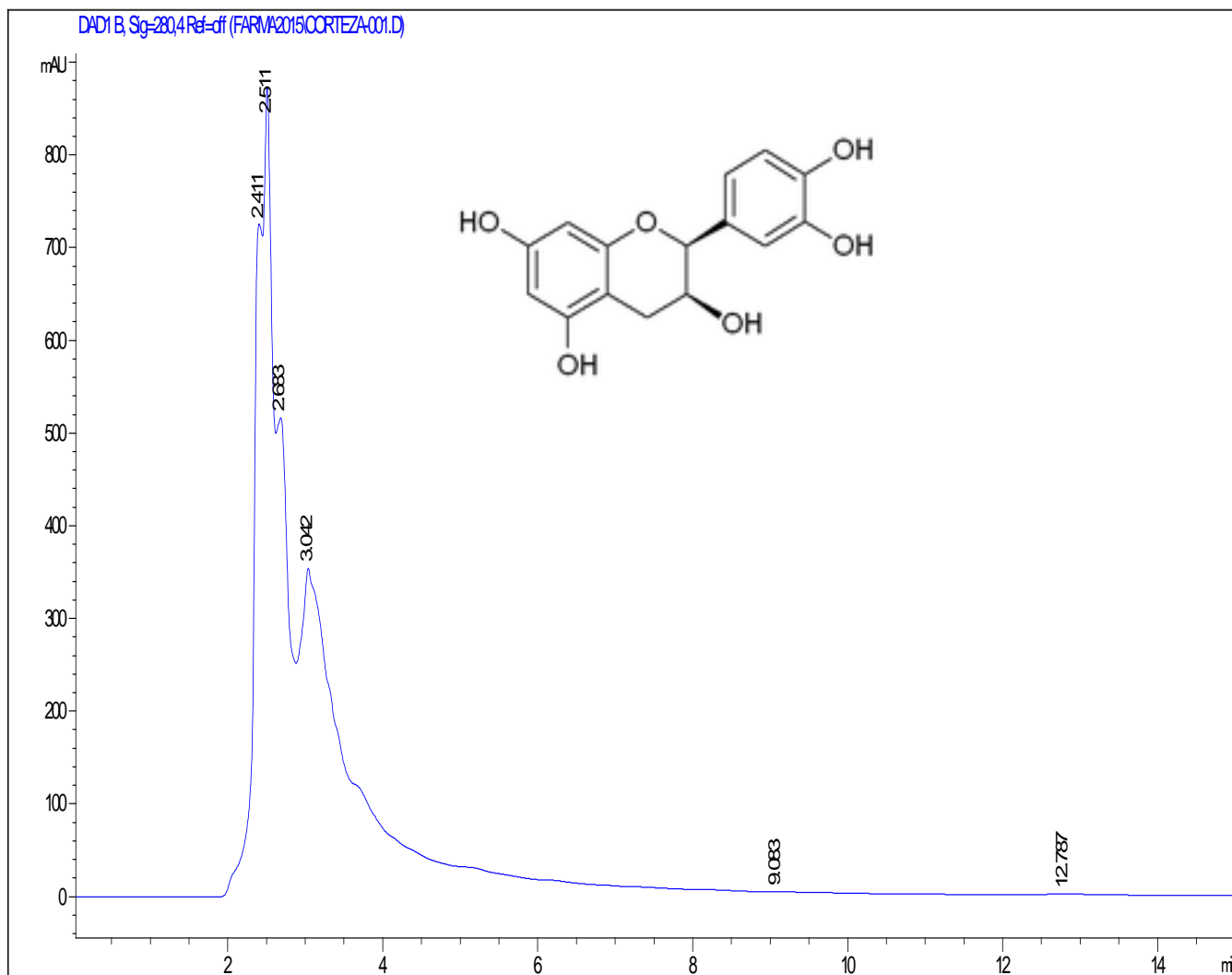
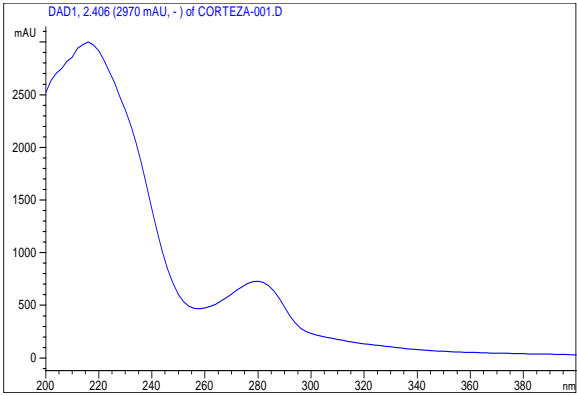
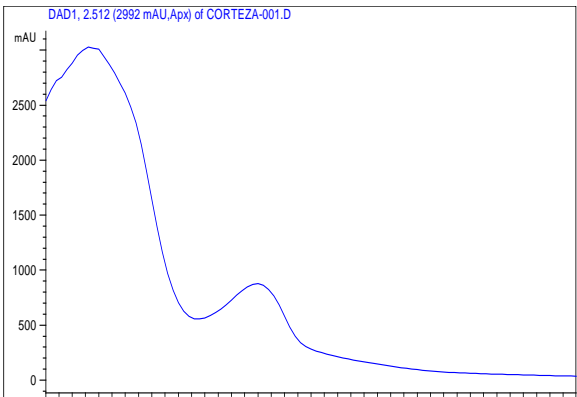
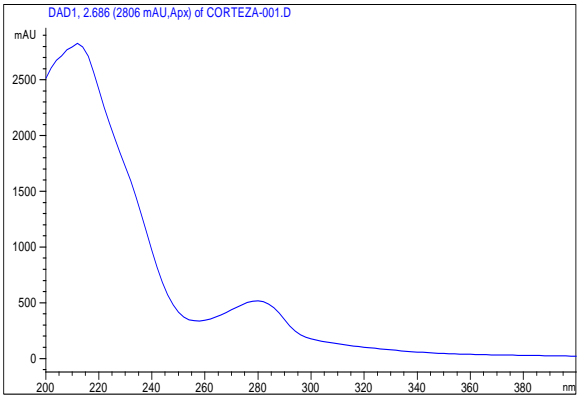
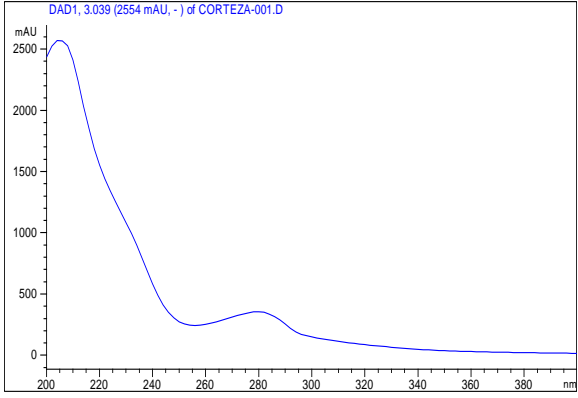
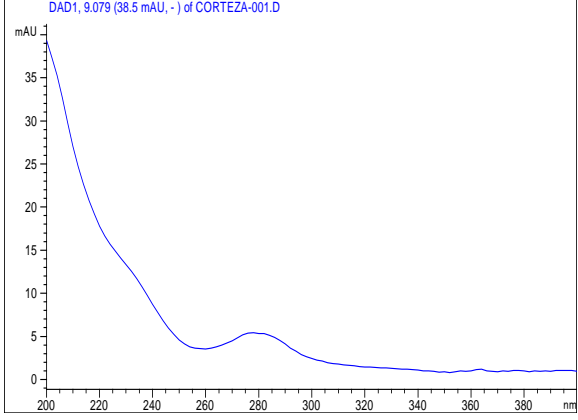
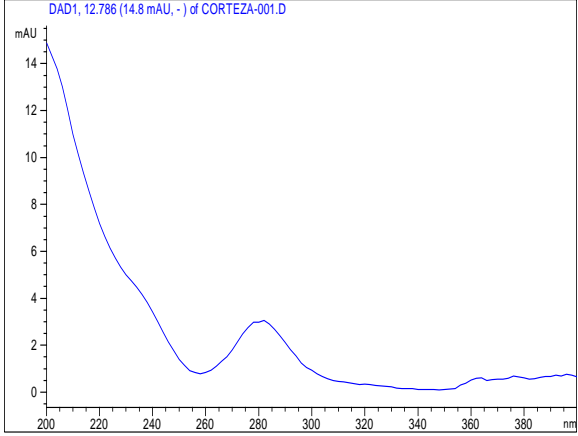


Figura 8. Cromatograma del análisis del HPLC del extracto MeOH1 de *C.aesculifolia.subsp.parvifolia*

Cuadro 9: Picos de absorbanca

Espectro	Tiempo de retención (min)	Compuesto	Intensidad (mAU)
 <p>DAD1, 2.406 (2970 mAU, -) of CORTEZA-001.D</p>	2.406	Catequina	720
 <p>DAD1, 2.512 (2992 mAU, Apx) of CORTEZA-001.D</p>	2.512	Catequina	870
 <p>DAD1, 2.686 (2806 mAU, Apx) of CORTEZA-001.D</p>	2.686	Catequina	520

 <p>DAD1, 3.039 (2554 mAU, -) of CORTEZA-001.D</p>	3.039	Catequina	350
 <p>DAD1, 9.079 (38.5 mAU, -) of CORTEZA-001.D</p>	9.079	Catequina	20
 <p>DAD1, 12.786 (14.8 mAU, -) of CORTEZA-001.D</p>	12.786	Catequina	10

MÉTODO TENSIOMÉTRICO DE VAISBERG.

Evaluación de la eficacia cicatrizante.

Se observó que para las tres concentraciones utilizadas (5%,10%,20%) se necesitó de una mayor fuerza medida en gramos para abrir la herida, en comparación con control positivo Recoverón, entre las tres concentraciones sólo la de 5% y 10% tuvo diferencias estadísticamente significativas, es decir, que estas concentraciones presentaron mejor eficacia cicatrizante. En comparación con el control positivo y control negativo (gel) no presentaron diferencias significativas, es decir, que el gel con el cual se disuelve el extracto, no intervino en el proceso de cicatrización (Fig.9).

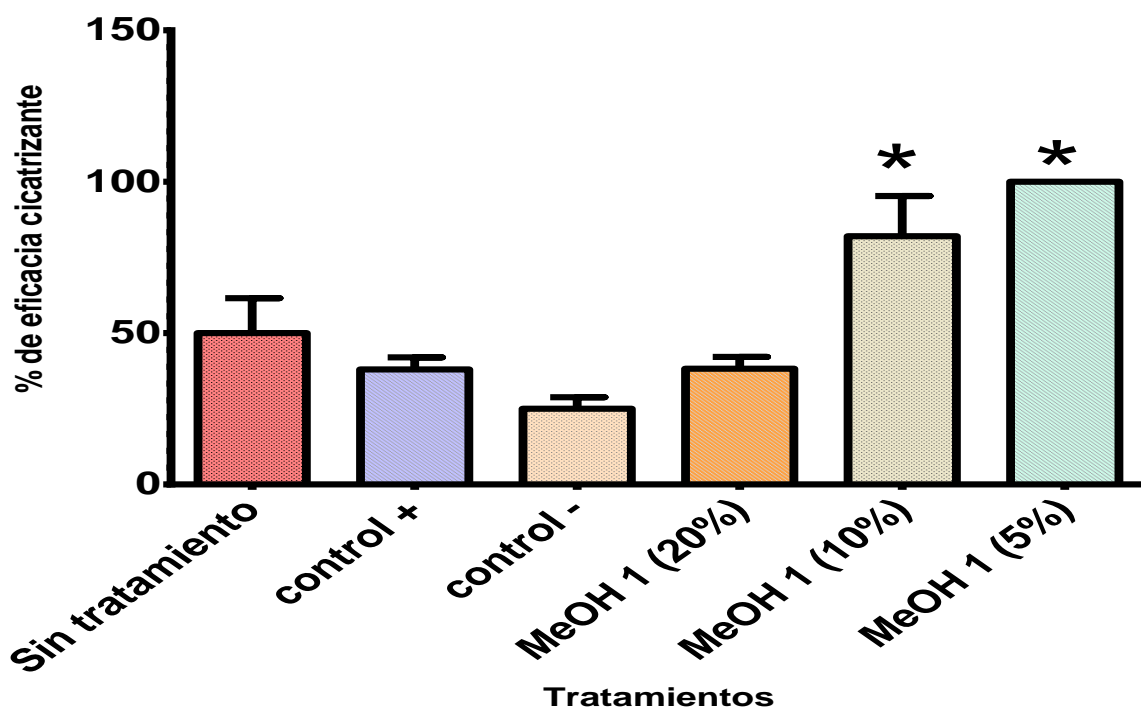


Figura.9 Eficacia cicatrizante del extracto MeOH1 de *C. aesculifolia* subsp.*parvifolia*.

* diferencias significativas en comparación con el control positivo

HISTOLOGÍA

Se obtuvo una visión general de la herida de los diferentes tratamientos, en estos se observaron las estructuras básicas, (Figuras 10 y 11), en la piel sana (A) se apreciaron las tres capas de la piel bien definidas (epidermis, dermis e hipodermis) así como un buen arreglo celular, por otro lado, en los tratamientos C y D se presentó una regeneración completa de la epidermis y de igual manera la formación de los vasos sanguíneos, de manera contraria, en el control negativo (B) se observó la formación de la costra en la zona epidérmica, y como consecuencia la herida no cerró en este tratamiento.

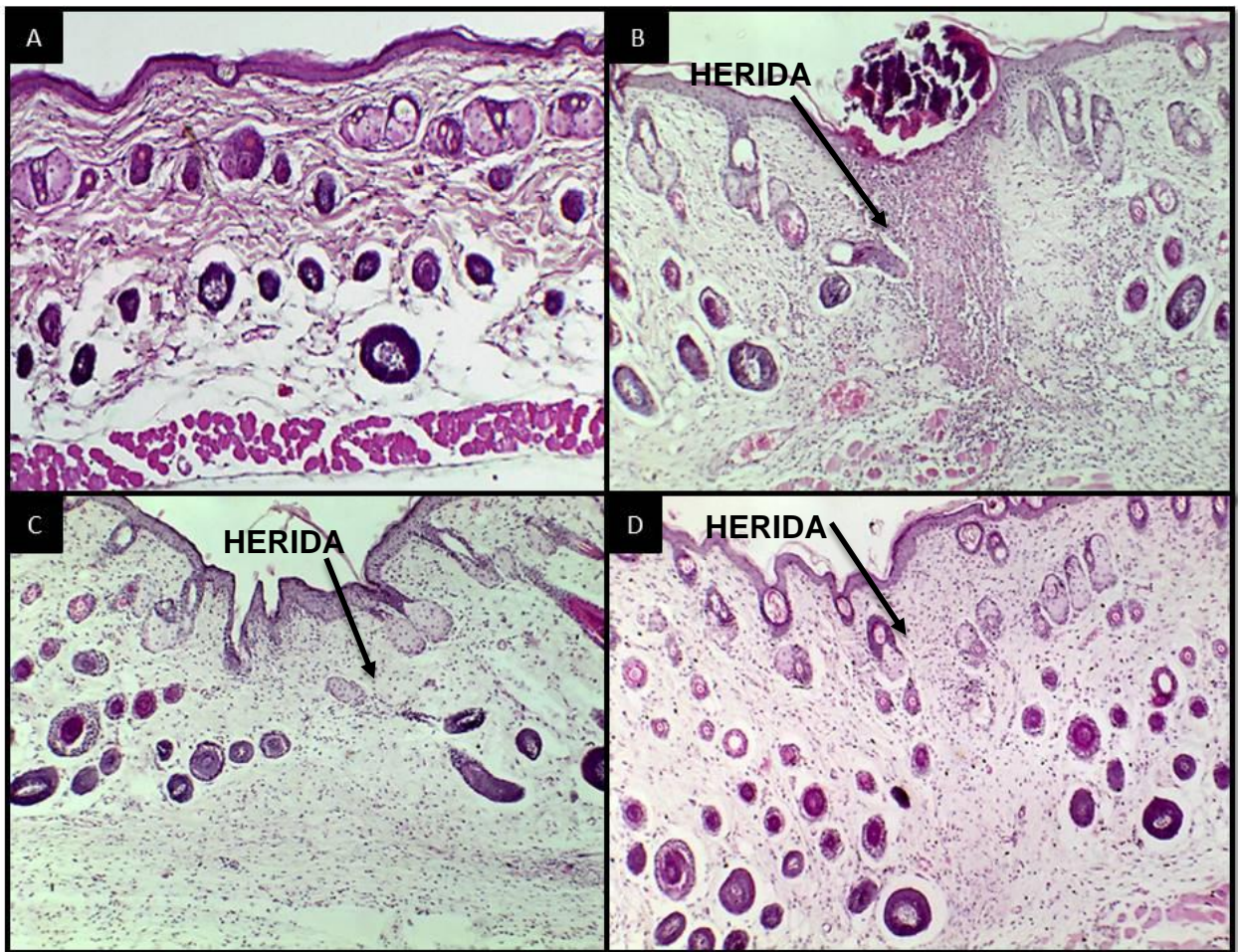


Figura.10 Cortes histológicos vistos a (10X) tinción hematoxilina eosina: **(A)** Piel sana, **(B)** control negativo **(C)** control positivo, **(D)** Sin tratamiento.

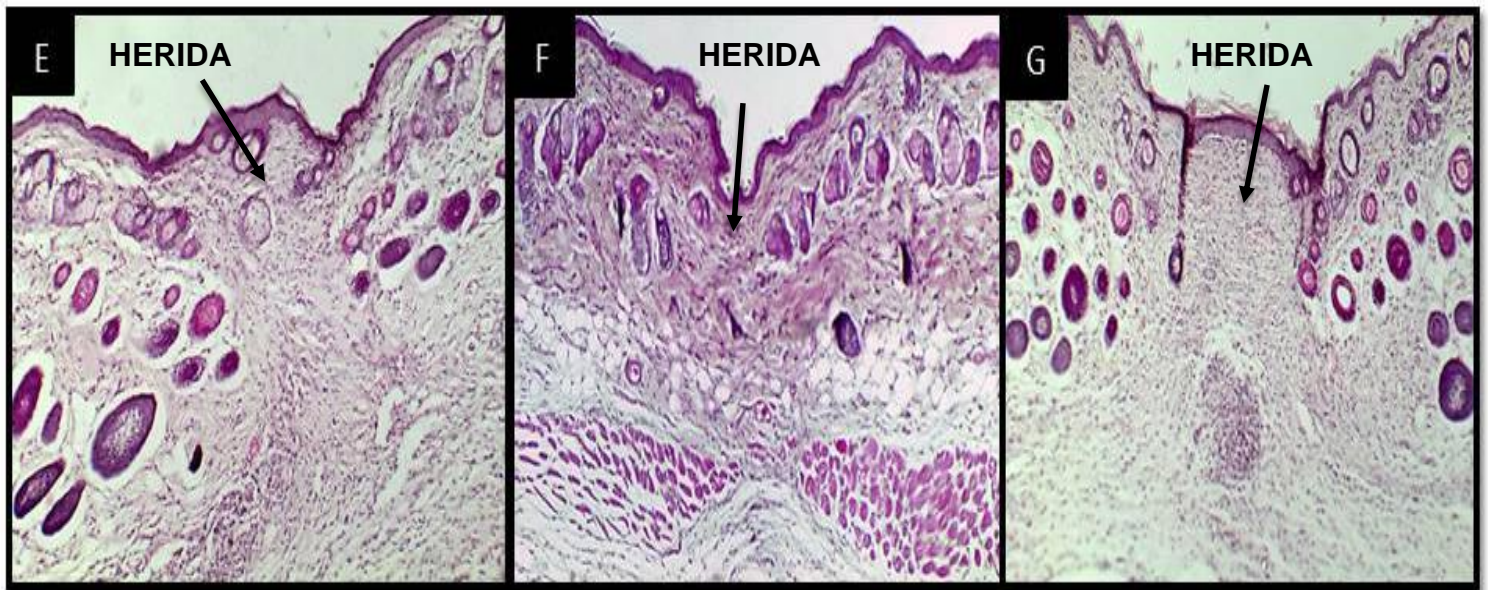


Fig.11 Se observan cortes histológicos de las tres concentraciones de MeOH1 de *C. aesculifolia* subsp.*parvifolia* vistos a 10x tinción hematoxilina eosina: **(E)** 20%,**(F)** 10%,**(G)** 5%.

En cuanto a las tres concentraciones del extracto MeOH1 (20,10 y 5%) en la concentración 20% (E) y 5%(G) aún no se distinguen bien la formación celular sin embargo podemos decir que el proceso de cicatrización está retrasado por eso aún no se observan las estructuras celulares. En el tratamiento 10%(G) se obtuvo visiblemente un cierre más estético como se aprecia en el registro fotográfico realizado durante el tratamiento (Apéndice 12).

En el tratamiento de 10% (F) hay un mejor arreglo celular ya que presenta epidermis dermis e hipodermis completa, así como la presencia de vasos sanguíneos en comparación con la piel sana.

DISCUSIÓN

Los extractos elaborados a base de solventes orgánicos a partir de diferentes partes de la planta como tallos, hojas, frutos, corteza, raíces, contienen una mezcla de metabolitos secundarios que poseen propiedades medicinales, por lo que su uso ha sido validado científicamente (Paiva et al., 2010). En el presente trabajo se comparó la actividad antimicrobiana, antioxidante, contenido de fenoles y flavonoides, así como la realización de una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para obtener los compuestos que ayudaron a obtener una mejor eficacia cicatrizante y observarlos a nivel histológico, así como la fuerza medida en gramos que se necesitó para abrir la herida, tratando de validar de manera científica su uso etnomedicinal.

La importancia de este trabajo radica en que por primera vez se ha evaluado científicamente el extracto de la corteza de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* en el proceso de cicatrización, concordando con el uso aplicado por los pobladores de San Rafael Coxcatlán, ya que emplean la infusión del pochote aplicado de manera tópica para curar heridas. Sin embargo, los pobladores llegan a confundir las cortezas de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* (Pochote) y *J. adstringens* (Cuachalalate), ya que en algún momento de su desarrollo las cortezas de ambas especies presentan ornamentaciones similares, provocando un uso medicinal similar para el tratamiento de diabetes, dolor de riñones, tumores, gastritis y aliviar heridas (Canales et al., 2005). Por lo que en ocasiones utilizaron *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia* en lugar de *J. adstringens* (cuachalalate).

Las cortezas se colectaron en San Rafael, Coxcatlán, Puebla, en el mes de agosto del 2007, los resultados del rendimiento del extracto MeOH1 fue del 8.94% (cuadro 3), a este extracto se le realizó una partición teniendo así que el extracto MeOH2 fue el que tuvo mayor rendimiento con un 88.2% en comparación al extracto hexánico con 9.6% (Cuadro 4). Estos datos muestran que el extracto de la corteza del pochote presenta una mayor cantidad de compuestos de naturaleza polar.

Se evaluó la capacidad antibacteriana que poseen los extractos MeOH1 y MeOH2 sobre bacterias Gram positivas y negativas, (Figura 2) así como una levadura, (Figura 3) ya que la gente de San Rafael utiliza la corteza para curar heridas y dolor de riñones (Canales et al., 2005 y 2006). Se registró actividad antibacteriana sobre las cepas *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Candida albicans* y *Staphylococcus epidermidis* como se observa en el cuadro 5, lo cual concuerda con los resultados de Orozco et al., 2010 donde los extractos MeOH1 y MeOH2 obtuvieron la misma actividad antibacteriana sobre las cepas antes mencionadas. El hecho de comprobar que el extracto del pochote inhiba el crecimiento de bacterias es muy importante, ya que al presentarse una herida y exponerse al medio ambiente se corre el riesgo de contraer una infección y microorganismos como las bacterias, se pueden multiplicar, invadir, dañar tejidos, retrasar el proceso de cicatrización y es necesario intervenir para que la situación no empeore y facilitar la cicatrización de la herida (WUWHS 2008).

Desde finales del siglo XIX se sabe que los patógenos principales asociados a la infección de las heridas son *Staphylococcus aureus*, especies de *Streptococcus*, y *Pseudomonas aeruginosa* (EWMA 2005). Aunque sólo dos de estas bacterias estén ligadas a problemas de la piel (*Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*), (Figura 4 y 5) a las demás bacterias (*Salmonella typhimurium* y *Vibrio cholerae*) (Figura 6 y 7) no se les resta importancia ya que también corroboran los diferentes usos reportados por Canales et al. (2005) ya que es utilizado para curar otras enfermedades como diabetes, dolor de riñones, tumores y gastritis. Se quiso corroborar que el extracto mantuviera esa capacidad antibacteriana y evitar una posible infección debido a bacterias. La infección de heridas es un tema de importancia en la actualidad por diferentes motivos: la gravedad de las consecuencias clínicas, la amenaza creciente de los microorganismos resistentes a los antibióticos y los daños producidos en el proceso de cicatrización. Por lo tanto, es necesario obtener opciones terapéuticas basados en la medicina tradicional las cuales benefician el control de adquirir una posible infección. Además de que el acceso a medicamentos de patente en algunos casos suele ser de costos muy elevados e inalcanzables para poblaciones de poco o nulo acceso (EWMA 2005).

Por otro lado, los radicales libres producidos en cantidades moderadas en el organismo pueden ser neutralizados por el propio sistema. Ante un determinado proceso oxidativo, los organismos suelen adaptarse rápidamente, en general, una agresión oxidante de baja intensidad hace que una célula pueda resistir posteriormente condiciones más oxidantes (Quintanar y Calderon 2009). En el cuerpo humano los procesos metabólicos normales producen especies reactivas del oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) como subproducto para llevar a cabo los procesos fisiológicos normales, los principales organelos que los producen son las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas, así como la membrana nuclear, citoplásmica y del retículo endoplásmico (Majid et al., 2015).

En condiciones fisiológicas normales, el organismo neutraliza las ERO a través de varios mecanismos antioxidantes que involucran la producción de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y otras, para prevenir el daño oxidante (Maldonado, 2010). Al presentarse la herida se dice que ha ocurrido un daño oxidativo y a su vez un exceso de radicales libres que causará un daño celular por lo que la regulación de la reducción y la oxidación es crítica para la viabilidad celular, la proliferación y la función del órgano (Birben et al., 2012). Los radicales libres son útiles contra bacterias y virus, pero actúan sobre el organismo aún después de haber concluido sus funciones en el metabolismo normal y en la lucha contra las infecciones. Sin embargo, el exceso de radicales libres se neutraliza gracias a los mecanismos de defensa naturales del cuerpo (OPS, 2016).

La pérdida en este balance de óxido-reducción lleva a un estado de estrés oxidativo y este estado se caracteriza por un aumento en los niveles de radicales libres y especies reactivas, que no alcanza a ser compensado por los sistemas de defensa antioxidantes causando daño y muerte celular. Esto ocurre en patologías degenerativas, de tipo infeccioso, inmune, inflamatorio, (Martínez, 2003). Por lo que, durante los estados de infección, los macrófagos y los polimorfonucleares ejercen su papel de defensa mediante un sistema enzimático de oxidación y reducción presente en la membrana, responsable de la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno son

particularmente indispensables en la defensa antimicrobiana, debido a que logran destruir los microorganismos mediante su capacidad oxidativa. Durante la inflamación aguda, las grandes cantidades de dichas especies liberadas permiten activar los fagocitos, promover la vasodilatación e inducir citotoxicidad (Lozada y García 2009).

Las especies reactivas en general, participan en algunas funciones biológicas (proliferación celular, diferenciación celular, fagocitosis, metabolismo, reacciones inflamatorias y se encuentran involucradas en diversas patologías) (Quintanar y Calderón, 2009). Estos procesos están estrechamente involucrados en diversas patologías como son los padecimientos crónico-degenerativos, procesos infecciosos e inmunitarios. Por lo tanto, la capacidad antioxidante celular está dada por mecanismos a través de los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres. Estos mecanismos son adecuados a la muy corta vida media de los radicales libres y comprenden moléculas pequeñas, endógenas y exógenas con capacidad antioxidante estas reacciones químicas de los radicales libres se dan constantemente en las células de nuestro cuerpo y son necesarias para la salud, este proceso debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante (Avello y Suwalsky, 2006).

En cuanto a la capacidad antioxidante del pochote, el extracto MeOH1 presentó una $CA_{50}=13.72 \mu\text{g/mL}$ y el MeOH2 mostró $CA_{50}= 16.72 \mu\text{g/mL}$, mientras que la capacidad antioxidante del control positivo (quercetina) fue de $CA_{50}=3.02 \mu\text{g/mL}$. De acuerdo al criterio de Al-Fatimi et al., (2007), el cual menciona que las concentraciones menores a $96.9 \mu\text{g/mL}$ se consideran con buena capacidad antioxidante, en este trabajo, ambos extractos entran en este criterio, además es importante mencionar que el control positivo utilizado, es un compuesto puro y los extractos son una mezcla de varios compuestos.

Estos resultados están directamente relacionados con la presencia de fenoles y flavonoides, los cuales son reconocidos por presentar diversas propiedades biológicas como antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes, entre otras (Escamilla et al., 2009).

Los fitoquímicos desempeñan un papel único en evitar efectos nocivos de los radicales libres. Los polifenoles son excelentes limpiadores de radicales libres y los inhibidores de la peroxidación lipídica (Majid et al., 2015). Los polifenoles, constituidos por un amplio grupo de compuestos químicos, son investigados actualmente por atribuírseles una variada actividad farmacológica, en general, asociada a la capacidad de actuar como agentes antioxidantes y barredores de radicales libres. A estos antioxidantes naturales, especialmente los flavonoides, flavonoles, flavonones, catequinas, antocianinas y poliflavonoides que son polifenoles, se les reporta como responsables de los siguientes efectos biológicos: antibacterial, antiviral, antiinflamatorio y vasodilatador (Araujo, 2002).

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidróxidos. Como antioxidantes, los polifenoles pueden proteger las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres. Los resultados muestran que ambos extractos contienen el mismo porcentaje de fenoles del 44%, con una concentración para MeOH1 y MeOH2 de 0.044 mg (eAG)/mL de fenoles presentes en 1 g de extracto (Cuadro 7). Por lo tanto, la concentración de compuestos fenólicos, a su vez está relacionada con la actividad antioxidante, de cada extracto, con el cual se fundamenta su uso medicinal y farmacológico (Gutiérrez et al., 2008). Entre los compuestos fenólicos más importantes se encuentran los flavonoides los cuales, además de su comprobada actividad antioxidante, se les ha atribuido una gran cantidad de efectos terapéuticos, tales como actividades cardiotónicas, antiinflamatoria, hepatoprotectora, antineoplástica, antimicrobiana, entre otras. son una clase de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes y quelantes significativas (Gutiérrez et al., 2008).

La concentración total de flavonoides de los extracto del pochote que se obtuvo fue para MeOH1 de 6.0 mg EqQ/g y MeOH2 5.3 EqQ/g (equivalentes de quercetina por gramo de extracto) (Cuadro 8). Los flavonoides han sido de interés debido a sus efectos biológicos observados *in vitro* tales como captadora de radicales libres, la modulación de la actividad enzimática, la inhibición de la proliferación celular, así como su utilidad potencial como antibióticos, antialérgicos, antidiarreico, antiulceroso y agentes antiinflamatorios (Ross y Kasum, 2002). Neutralizan oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, hidroperóxidos y peróxidos lipídicos. Bloqueando la acción deletérea de estas sustancias sobre las células. Por todo lo anterior la eficacia de nuestro extracto, en las primeras etapas del proceso resulta favorable ya que el extracto será capaz de neutralizar el estrés oxidativo provocado por la presencia de una posible infección y así llevarse a cabo una eficiente inflamación y activar las demás fases para llegar a la restauración de la herida.

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, además de la inhibición de las oxidasas: lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno (Escamilla et al., 2009), por lo que se justifican estos datos ya que en conjunto les confiere capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana lo que favorecerá que se pueden proteger las células contra el daño oxidativo y retirarán oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, hidroperóxidos y peróxidos lipídicos. Y se ha corroborado la protección antioxidante de los flavonoides en: queratinocitos, fibroblastos dérmicos, ganglios sensoriales, endotelio, tejido nervioso y en lipoproteínas de baja densidad (Escamilla et al., 2009), por lo que se puede inferir que el extracto MeOH 1 aplicado a las diferentes concentraciones ayudó eficazmente al cierre de la herida.

En el presente estudio mediante el análisis HPLC se determinó la presencia de un compuesto polifenólico identificado como catequina, el cual tiene un buen potencial antioxidante y proporciona un muro de defensa fiable contra los radicales libres. (Figura 8). Este compuesto proporciona protección contra los trastornos neurológicos, la inflamación y la apoptosis (Majid et al., 2015), por lo que podemos inferir que este puede ser el compuesto que favoreció la cicatrización de los tres grupos experimentales, aunque puede haber la presencia de más compuestos. Pero sirvió como una barrera para neutralizar los radicales libres generados por la herida.

El efecto cicatrizante del extracto MeOH1 se evaluó, por el método tensiométrico para determinar la fuerza en gramos necesaria para abrir la herida de todos los grupos experimentales (Figura 9). En las tres concentraciones utilizadas del extracto MeOH1 (20 %,10 %,5%) se necesitó de una mayor fuerza medida en gramos para abrir la herida, se presentó un porcentaje de eficacia cicatrizante del 38, 82 y 100% en comparación con el control positivo Recoverón que fue del 38 %, por lo que las tres concentraciones actúan de manera similar, sin embargo, las concentraciones del 5% y 10 % si presentaron diferencias estadísticamente significativas sobre el Recoverón. El control negativo a base de carbopol no tuvo diferencias significativas con respecto al testigo (piel con herida sin ningún tratamiento) por lo que no intervino en el proceso.

Con respecto al análisis histológico, se realizaron cortes histológicos para comparar el arreglo celular de los diferentes grupos experimentales. Se observó que las tres concentraciones favorecen el proceso de cicatrización, sin embargo, en tratamiento del 5% mostró un mejor arreglo celular en comparación con la piel sana (Fig. 10 y 11), además de la realización del registro fotográfico donde se observa notoriamente el cierre de los diferentes tratamientos aplicados (Apéndice 12).

CONCLUSIONES

- Los extractos MeOH1 y MeOH2 presentaron actividad antibacteriana
- Los extractos MeOH1 y MeOH2 presentaron actividad antioxidante
- Los extractos MeOH1 y MeOH2 presentaron flavonoides y fenoles.
- El extracto MeOH1 presentó un alto porcentaje en cuanto a la eficiencia cicatrizante.
- A nivel histológico la concentración del 10% del extracto MeOH1 presentó mejor arreglo celular.

APÉNDICES

APÉNDICE 1

Descripción botánica de *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia* Rose

Esta especie pertenece a la familia Bombacaceae, la cual comprende árboles, con troncos espinosos, presenta hojas caducas, digitadas o simples. Sus flores pueden ser de diferentes tamaños, a menudo bractioladas, con 5 pétalos y de 5 estambres o más unidos en la base de la mitad hacia abajo. Sus frutos son secos o carnosos de celdas dehiscentes o indehiscentes, con 2 o más semillas por celda. La familia Bombacaceae comprende unos 20 géneros y alrededor de 180 especies. La mayoría de las especies habitan en los densos bosques lluviosos de Sudamérica y en las sabanas africanas, pocas al sur de Asia y algunas en Madagascar (Reyes et al., 2004).

Clasificación:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malvales

Familia: Bombacaceae

Género: *Ceiba*

Especie: *Ceiba aesculifolia*

Subespecie: *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia* Rose

Nombre común:

Pochote, pochotle, ceiba, pochote de

Secas (Reyes et al., 2004; Canales et al., 2005

y 2006; Avendaño et al., 2006).

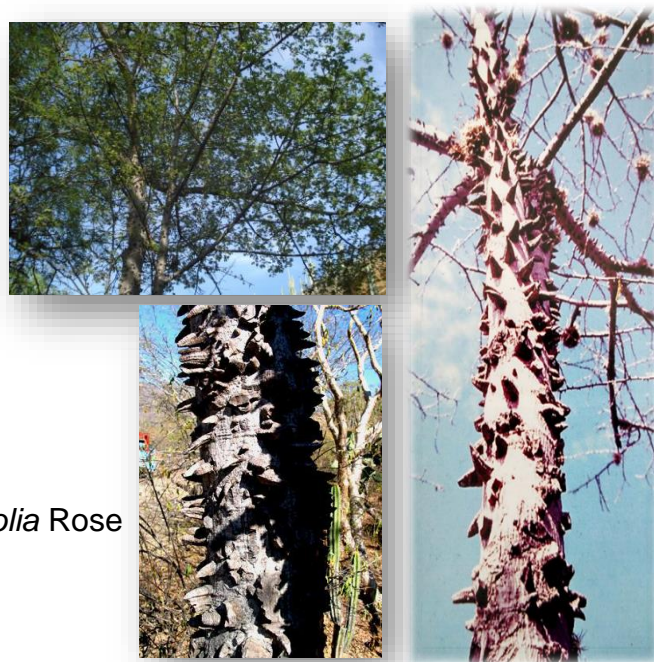


Figura 12. Árbol y corteza de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*

Tipos de vegetación: bosque tropical caducifolio, bosque de galería y manglar (Diego-Pérez y Gómez-Campos, 2013), matorral xerófilo (Rzedowski, 1978).

Fenología

Florece de Noviembre a Enero. Las flores tienen pétalos carnosos y olor poco agradable, por lo que son principalmente polinizadas por murciélagos (Osorno, 2001) de los cuales se han registrado más de 36 tipos para la reserva de Tehuacán-Cuicatlán (CONANP, 2014). Fructificación de Diciembre a Febrero (Rosas, 2003).

Distribución

Esta especie se distribuye en la República Mexicana en los estados de Chiapas, Guerrero, Morelos, Oaxaca, Puebla (Diego-Pérez y Gómez-Campos, 2013).



Figura 13. Distribución de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*

Etnobotánica:

La corteza del Pochote se utiliza para hacer pequeñas figuras artesanales. Las flores son preparadas en guisos. En tiempos prehispánicos la fibra del fruto se empleaba para confeccionar telas para príncipes y reyes, también es usada para rellenar cojines, almohadas, colchones y otros artículos de mueblería. Las almohadas tienen especial demanda para enfermos de asma o con padecimientos de alergia. Las semillas inmaduras son comestibles y además proporcionan aceite que puede usarse en la fabricación de jabón (Avendaño et al., 2006). En San Rafael, Coxcatlán, Puebla la corteza se toma en infusiones para tratar diabetes, dolor de riñones, tumores, gastritis y para curar heridas se utilizan en forma de apósitos (Canales et al., 2005).

Historia

Se reporta el uso de las raíces y semillas de “pochote” por la gente del Valle de Tehuacán-Cuicatlán desde hace aproximadamente 8,500 años. Este registro se tiene debido a la presencia de los restos en coprolitos, los cuales presentaron el doble de abundancia, al igual que el maíz y fueron 20 veces más abundantes que el frijol, lo que sugiere la intensa y especializada colecta durante las fases arqueológicas de El Riego (5000-6500 a.C) y Coxcatlán (3500-5000 a.C) (MacNeish, 1967).

APÉNDICE 2

Zona de colecta

La corteza de *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia* se colectó en el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, al sureste de Tehuacán en el valle de Tehuacán-Cuicatlán, entre 18°12' y 18°14' de latitud norte, así como 97°07' y 97°09' de longitud oeste, con un rango de altitud de 957 a 1400 m.s.n.m (Canales, 2006).

La población de San Rafael Cuenta con 49 localidades y una población total de 19 764 habitantes (INEGI, 2009); la mayoría de las unidades familiares se dedica principalmente al cultivo de la caña y diversas especies en huertos y, en menor escala, al cultivo de maíz, melón y sandía, además de que recolectan diversos productos en su entorno natural (Medina-Sánchez, 2000; Blanckaert, 2001; Rosas-López, 2003; Blanckaert et al., 2004; Lira et al., 2008).

Ubicación geográfica del poblado de San Rafael

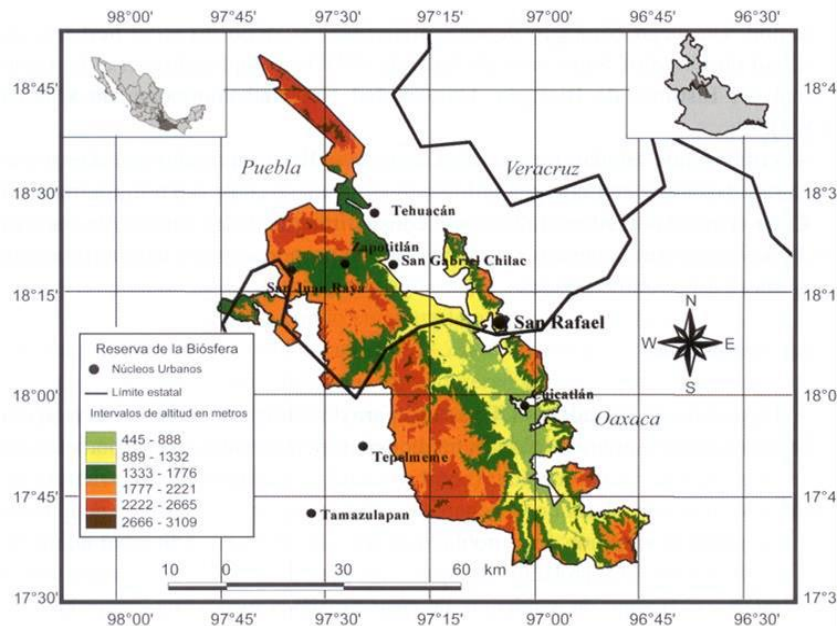


Figura 14. Ubicación geográfica del poblado de san Rafael Coxcatlan Puebla.

Clima

El clima es de tipo Bs₁ (h') w" (w) de acuerdo con la clasificación de Koeppen, modificado por García (1981), el cual corresponde a un tipo seco o árido con lluvias en verano y temperatura media anual de 14-26 °C, (INEGI 2009) variando entre 25 °C en abril y mayo, y 18 °C en enero (Medina, 2000). Valiente (1991) calcula una precipitación anual de 364.6 mm para la zona; cerca de los 386.57 mm registrada en 1988 en la estación climática Tilapa, situada a 3.25 Km al sur de la zona de estudio. En 1998 los 763.7 mm de precipitación casi duplicaron el promedio anual, concentrándose en los meses de junio a noviembre.

Hidrografía

El sureste de Puebla se encuentra irrigado por el Río Salado. La parte sur del Valle de Tehuacán-Cuicatlán es drenado por el Río Grande o Tomellín, que fluye al norte desde Oaxaca; uniéndose cerca de Quitepec los dos forman el Río de Santo Domingo, el cual corta la Sierra Madre de Oaxaca en dirección este y eventualmente se vuelve el Río Papaloapan. El Río Tehuacán encuentra su camino al oeste del Cerro Colorado, para entrar en el Valle de México cerca de San Diego, Chalma. Este pequeño río el cual se convierte en el Río Salado, se une por un número de cortas ramificaciones alcanzando la Sierra Madre de Oaxaca en el noreste (Salcedo-Sánchez, 1997).

Edafología

El origen del suelo data del periodo Cuaternario, era Cenozoica. Los suelos en las regiones están pobremente desarrollados y pueden ser en diferentes tipos: xerosoles háplicos. Regosol (53%), Leptosol (16%), Cambisol (15%), Luvisol (13%) y Fluvisol (1%).

Vegetación

La vegetación predominante es un bosque tropical caducifolio, donde *Escontria chiotilla* (F. A. C. Weber) Rose y *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg son particularmente abundantes (Valiente-Banuet et al., 2000). Fernández (1999), reconoció por nivel topográfico los siguientes tipos de vegetación en San Rafael:

- Cordonal de *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg, que se caracteriza por el predominio de cactáceas columnares (cardones).
- Chiotillal de *Escontria chiotilla*, en el nivel próximo al cauce del río, sobre niveles de terreno de 0.7 a 1.5 m por encima del nivel basal de esta región, con una alta densidad arbustiva.
- Cuajiotal con especies dominantes como *Bursera morelensis* (Ramírez), *Mimosa polyantha* (Brandege), *Fouqueiria formosa* (Kunth), así como arbustos y hierbas como *Sanvitalia fruticosa* (Helms), localizada aproximadamente a 1.5-3.5 m por encima del nivel basal.
- Fouqueria con especies dominantes como: *Fouqueria formosa*, *Bursera aptera* (Ramírez), *Mimosa polyantha*, *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia* (Rose), *Manihotoides pasiflora* (Brandege), *Senna wisliseni* (DC), *Mimosa luisiana* (Brandege) y *Sanvitalia fruticosa*. Localizada en el nivel más alto, de 3.5 a 5 m por encima del nivel basal. La densidad de plantas en los estratos arbustivos y herbáceos es muy baja, dominado en su totalidad por *Sanvitalia fruticosa*.

En un estudio etnobotánico realizado en San Rafael (Rosas, 2003), se determinó un total de 374 especies pertenecientes a 249 géneros y 87 familias botánicas, de las cuales 368 especies fueron registradas con uno o más usos (18% son usadas como plantas medicinales). Las familias con un mayor número de especies fueron Asteraceae, Cactaceae, Solanaceae, Araceae y Euphorbiaceae, que corresponden a las familias más representativas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

Población

La comunidad de San Rafael se fundó a principios del siglo XX y en ese momento contaba con 298 habitantes (151 mujeres y 147 hombres) (Secretaría de Salud, 2001). La mayor parte de la población era nativa de San Rafael y la actividad económica más importante era la agricultura, cuyo principal ingreso provenía del cultivo de la caña de azúcar. También se dedicaban a la cría de ganado caprino, la recolección de frutos, semillas, leña y madera para diversos fines. (Rosas, 2003).

Método de difusión en agar

(Beer y Sherwood, 1945; VandenBerghe y Vlietinck, 1991; CLSI, 2012).

Ésta técnica es empleada para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana y antifúngica (levaduras), de un extracto puro o de los compuestos de un extracto, los cuales se difunden a través del agar desde el disco de papel. El crecimiento del microorganismo comienza y los compuestos se alejan del disco de acuerdo a un gradiente de dilución, de modo que a mayor distancia del disco menor concentración, formándose un halo de inhibición circular donde la sustancia no alcanza a inhibir el crecimiento y cuyo diámetro es proporcional a la potencia de la sustancia frente al microorganismo.

Medio: para el ensayo con bacterias se prepara medio de cultivo Müller-Hinton ya que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos y agar Papa Dextrosa (PDA) para levaduras. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los antibióticos tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor disolución del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición. Se debe dejar incubar las cajas 24 horas previas a realizar la prueba de susceptibilidad para verificar la ausencia de contaminación del agar.

Inóculo: Con un asa de siembra se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias. Se sumerge el asa en 10 mL de caldo Müller-Hinton para el ensayo en bacterias y en caldo Sabouraud para levaduras, se enjuaga bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa, el tubo de cultivo se incuba a 37°C durante aproximadamente 18 a 24 horas para bacterias y 48 hrs. para levaduras, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N° 0.5 de MacFarland.

Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL. El estándar 0.5 de MacFarland se prepara añadiendo 0.5 mL de sulfato de bario (BaSO_4) a 99.5 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.36 N. La comparación de la turbidez entre el estándar y el caldo con el organismo en estudio se puede efectuar con un espectrofotómetro a 660 nm.

Una vez logrado esto, se sumerge un hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión de bacterias o levaduras, antes de retirarlos se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocula la superficie de una placa con agar de Müller-Hinton para bacterias y con agar Papa Dextrosa (PDA) para levaduras. Previamente, se deja que la placa alcance temperatura ambiente; es aconsejable mantener la tapa entreabierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie de agar. Finalmente, se siembra mediante estría en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

Preparación de sensidiscos

Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel whatman del N° 5, para posteriormente aplicar la sustancia a evaluar en la prueba de susceptibilidad (extracto o fracción).

Extracto: se hacen diluciones necesarias utilizando como vehículo metanol, para que los sensidiscos lleven 2 mg de cada extracto de la sustancia por sensidisco.

Control negativo: se preparan sensidiscos a los que se les agregan $10 \mu\text{L}$ del solvente empleado para disolver el problema.

Control positivo: se evalúa la sensibilidad de las cepas bacterianas experimentales con sensidiscos impregnados con $25 \mu\text{g}$ de cloramfenicol y con $25 \mu\text{g}$ de Nistatina para levaduras. Posteriormente se deja evaporar el solvente de los discos impregnados durante 12 horas.

Prueba de susceptibilidad

Los discos impregnados con las sustancias a ser evaluadas se colocan manualmente sobre la superficie del agar, utilizando una pinza estéril.

Una vez preparadas las placas para la prueba de susceptibilidad, se colocan en una incubadora a 36 °C, sin mayor tensión de CO₂. Es preciso evitar presión de CO₂ debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del agar, provocando un descenso de pH. El desarrollo de algunos microorganismos es debido al pH ácido, lo cual tiende a estrechar falsamente la zona de inhibición. Así mismo, la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída del pH, produciéndose diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones de las zonas de inhibición.

Interpretación de resultados

En el caso de existir zonas de inhibición se reporta el extracto o fracción como activa. Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en milímetros. La prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio.

APÉNDICE 4

Actividad antioxidante (Método modificado de Murillo , 2006 Okusa et al., 2007)

Se pesaron 5 mg de extracto metanólico MeOH1 y MeOH2 de *Ceiba aesculifolia* de subsp. *parvifolia* y se disolvieron en 5 mL de MeOH grado HPLC (Solución stock). Se utilizaron las siguientes concentraciones a partir del stock para la curva de actividad antioxidante.

Cuadro 10: Concentraciones en ppm de extracto para la curva de actividad antioxidante.

[ppm]	μL stock	μL MeOH
1	1	999
2	2	998
3	3	997
4	4	996
5	5	995
6	6	994
7	7	993
8	8	992
9	9	991
10	10	990
20	20	980
30	30	970
40	40	960
50	50	950
60	60	940
70	70	930
80	80	920
90	90	910
100	100	900

En una placa de ELISA se adicionaron 50 µL de las diferentes concentraciones (1-100 ppm) por triplicado, posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionaron 150 µL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final fue de 0.004 g/100 mL; inmediatamente se protegió de la luz. Una vez transcurrido el tiempo se determinaron la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA SLT Spetra; el blanco consistirá en 200 µL de metanol y como control positivo se usó quercetina a las mismas concentraciones que el compuesto problema.

Cálculo del porcentaje de reducción

Los resultados son reportados obteniendo el porcentaje de reducción y se calcularán con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = \frac{(C - E)}{C} \times 100$$

En donde:

C= Absorbancia del DPPH.

E= Absorbancia del experimento (Mezcla DPPH + (extracto o quercetina)).

Cálculo de la capacidad antioxidante media (CA₅₀)

Se graficó la concentración contra el porcentaje de reducción, se realizó una regresión lineal para obtener la ecuación de la gráfica con la que se realizó un despeje para obtener la concentración del extracto que se requiere para reducir al DPPH en un 50 %.

APÉNDICE 5

Método para la determinación de fenoles totales (Método modificado de Singleton et al.,1999).

La concentración de fenoles totales se mide por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utiliza es el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Curva de calibración

Se preparó una curva de calibración con ácido gálico utilizando una solución estándar de este (0.2 mg/mL). A partir de esta solución se tomaron alícuotas seriadas de ácido gálico (0.00625, 0.012, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL), a cada una se le agregó el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen de 1mL.

Preparación de la muestra problema

Se preparó una solución estándar (0.2mg/mL); se tomó una alícuota de 250 μ L y se agregó 750mL de agua destilada para obtener un volumen final de 1mL a una concentración de 0.05 mg/mL.

Se tomó 1mL de cada una de las concentraciones (ácido gálico y extracto) y se pasaron a un tubo de ensayo con 7mL de agua destilada, a continuación, se adicionaron 500 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de cinco minutos se añadió 1.5 mL de una solución de Na_2CO_3 (200 g/L) y agua hasta completar un volumen de 10mL.

Cuadro. 11 Concentraciones para preparar las soluciones problema para determinar fenoles totales.

Tubo	Ácido gálico (mg/mL)	Patrón (ácido gálico μL)	Agua destilada (μL)	Agua destilada (mL)	Folin-Coicalteu (μL)	Na₂CO₃ (mL)
Blanco	-----	-----	-----	7	500	1.5
1	0.00625	31.25	968.75	7	500	1.5
2	0.0125	62.5	937.5	7	500	1.5
3	0.025	125	875	7	500	1.5
4	0.05	250	750	7	500	1.5
5	0.1	500	500	7	500	1.5
6	0.2	1000	0	7	500	1.5
Problema	-----	250	750	7	500	1.5

Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente, se determinará la absorbancia a 760nm. Cada concentración se determinará por triplicado.

APÉNDICE 6

Flavonoides Totales (Método de Ramamoorthy y Bono, 2007)

El contenido de flavonoides totales se determinó usando una curva patrón con quercetina (0-100 mg/L). Preparación de solución Stock: 1 mg de quercetina/1 mL de MeOH. Considerando que el volumen total de solución stock es 1785 μ L, se emplearán 2 mg de quercetina en 2 mL de MeOH.

[] ppm	μ L STOCK	μ L MeOH	(AlCl ₃) al 2% mL
1	3	2997	3
2	6	2994	3
3	9	2991	3
4	12	2988	3
5	15	2985	3
6	18	2982	3
7	21	2979	3
8	24	2976	3
9	27	2973	3
10	30	2970	3
20	60	2940	3
30	90	2910	3
40	120	2880	3
50	150	2850	3
60	180	2820	3
70	210	2790	3
80	240	2760	3
90	270	2730	3
100	300	2700	3
Problema	3 mL	0	3

Preparación del extracto en solución:

0.2 mg –1 mL de MeOH

X - 3mL de MeOH

X= 0.6 mg de extracto a probar en 3 mL de MeOH

- Para el análisis de flavonoides totales del extracto se prepararon 3 mL de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 2% en metanol, se mezcla con 3 mL de extracto en solución a probar (0.2mg/mL).
- La prueba se realizará por triplicado.

Preparación del blanco:

- 3 mL del extracto en solución con 3 mL de metanol sin (AlCl_3).

Lectura:

- Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se determinará la absorbancia a 415 nm.
- Los resultados se expresarán como equivalentes de quercetina/g de extracto.

APÉNDICE 7

Método tensiométrico (Vaisberg et al., 1989).

Evaluación de la Eficacia Cicatrizante

Las sustancias a evaluar (extracto y controles) se aplicaron de forma tópica, disueltos en gel, en las concentraciones ya mencionadas, Para el caso del control positivo (Recoverón NC), este fue aplicado utilizando un hisopo estéril hasta cubrir la herida en su totalidad. Los tratamientos fueron aplicados cada 12 horas, durante 10 días. Posteriormente los ratones fueron sacrificados utilizando una cámara de CO₂, y se midió la fuerza con la que se abre la herida utilizando un dinamómetro para evaluar que tan efectivo es el proceso de cicatrización.

La fuerza o tensión en gramos en que se abrió la herida en el proceso de cicatrización, se midió utilizando un dinamómetro con escala de 100 y 500 g. Para lograr la medición se utilizaron ganchos de metal, los cuales fueron insertados en la piel periférica a la herida, de los cuales se sujetó el dinamómetro que se tensó hasta observar la apertura de la herida y en ese momento se tomará la lectura del dinamómetro en gramos.

Con los datos así obtenidos, se calculará la eficacia de cicatrización en porcentaje, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Eficacia de cicatrización (\%)} = [(GC)/GS] \times 100$$

Dónde: GC = gramos en que abre la piel cicatrizada.

GS = gramos para abrir la piel sana.

De los resultados obtenidos se calculó la media de cada uno de los grupos y el error estándar de la media. Para determinar la significancia entre los tratamientos aplicados, se utilizará la prueba "t de Student" para una $p < 0.05$

APÉNDICE 8

Técnica histológica.

a) Deshidratación

Sumergir el tejido en formol al 4%, después pasar el tejido en alcohol etílico.

No	Acción	Porcentaje (%)	Tiempo
1	Sumergir en alcohol etílico	70	2h
2	Sumergir en alcohol etílico	80	2h
3	Sumergir en alcohol etílico	90	2h
4	Sumergir en alcohol etílico	100	1h

Nota: En alcohol absoluto no dejar más de 1 hora en cada uno o se endurecerá el tejido.

b) Impregnación en el solvente (aclaración o aclaramiento).

No	Acción	Tiempo
5	Sumergir en butanol I	1h
6	Sumergir en butanol II	1h

Nota: No sobrepasar el tiempo ya que endurecerá el tejido

c) Infiltración

No	Acción	Tiempo
7	Meter las muestras en parafina I	24h
8	Meter las muestras en parafina II	24h

Nota: Se quedaron en parafina II hasta que se incluyan

Formación de bloques de parafina

Se llenó el molde con parafina de inclusión caliente, con una pinza se calentó en el mechero se tomó el tejido orientándolo verticalmente hacia la base del molde, se sumergió y cubrió totalmente con parafina.

Cortes en el micrótomó

Se preparó el baño de flotación antes de cortar (agua destilada + gelatina). Se colocó la navaja en el micrótomó, ajustando el portabloques, el bloque se refrigeró antes de colocarlo, evitando así que se calentara rápido con la fricción de la navaja. Se rebajó el bloque hasta alcanzar el tejido, los cortes finales se obtuvieron con un grosor de 4 micras, una vez obtenidos los cortes se colocaron en un portaobjetos y se agregó alcohol al 50 % para extender el tejido. El corte se colocó en el baño de flotación para extender el tejido y se pescará con el portaobjetos.

Tinción con Hematoxilina-Eosina

Colocar las muestras (portaobjetos) en canastillas y desparafinarlas en la estufa durante 3 horas aproximadamente, después someterlas al tren de alcoholes.

NO.	alcohol	tiempo
1	Xilol I	5 minutos
2	Xilol II	10 minutos
3	Alcohol etílico 100%	10 lavados
4	Alcohol etílico 90%	10 lavados
5	Alcohol etílico 80%	10 lavados
6	Alcohol etílico 70%	10 lavados
7	Agua corriente	10 lavados
8	Hematoxilina	5 minutos
9	Agua corriente	10 lavados
10	Alcohol acido	1 lavado
11	Agua corriente	10 lavados
12	Carbonato de litio	Hasta que vire
13	Agua corriente	1 lavado
14	Alcohol etílico 100%	10 lavados
15	Eosina	7 minutos
16	Alcohol etílico 70%	10 lavados
17	Alcohol etílico 80%	10 lavados
18	Alcohol etílico 90%	10 lavados
19	Alcohol etílico 100%	10 lavados
20	Xilol I	10 lavados
21	Xilol II	Hasta que se monte

APÉNDICE 9

Gráficas de la actividad antioxidante

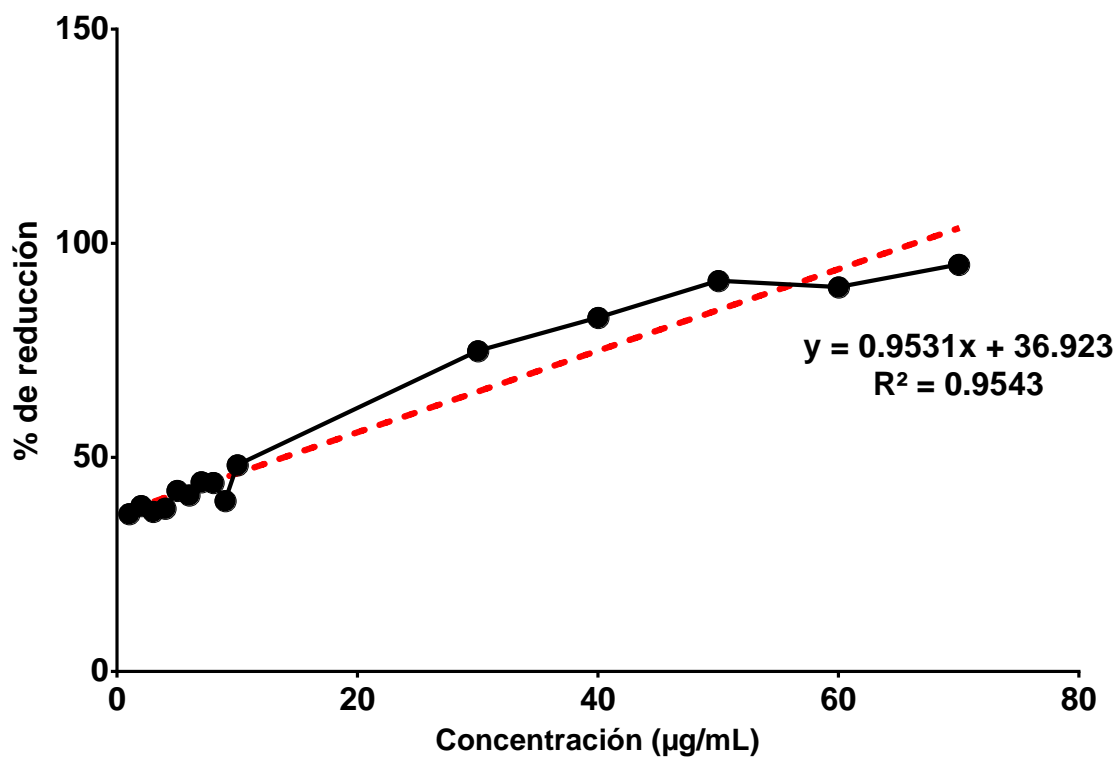


Fig.15 Actividad antioxidante del extracto MeOH1 de *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia*

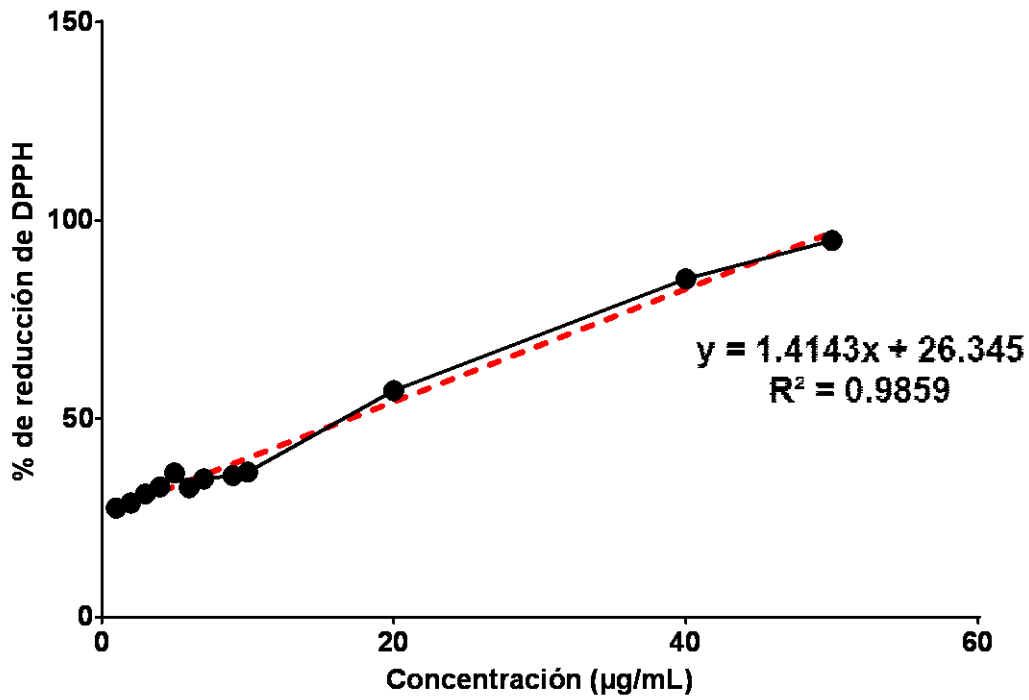


Fig.16 Actividad antioxidante del extracto MeOH2 de *Ceiba aesculifolia sub.parvifolia*

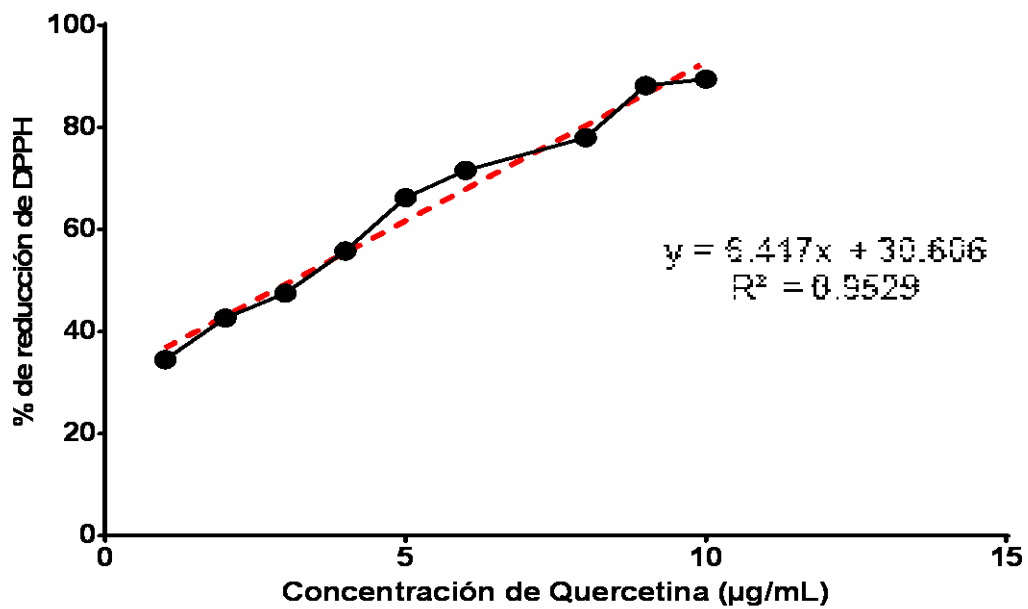


Fig.17 actividad antioxidante de la quercetina.

APÉNDICE 10

Gráfica para la cuantificación de fenoles

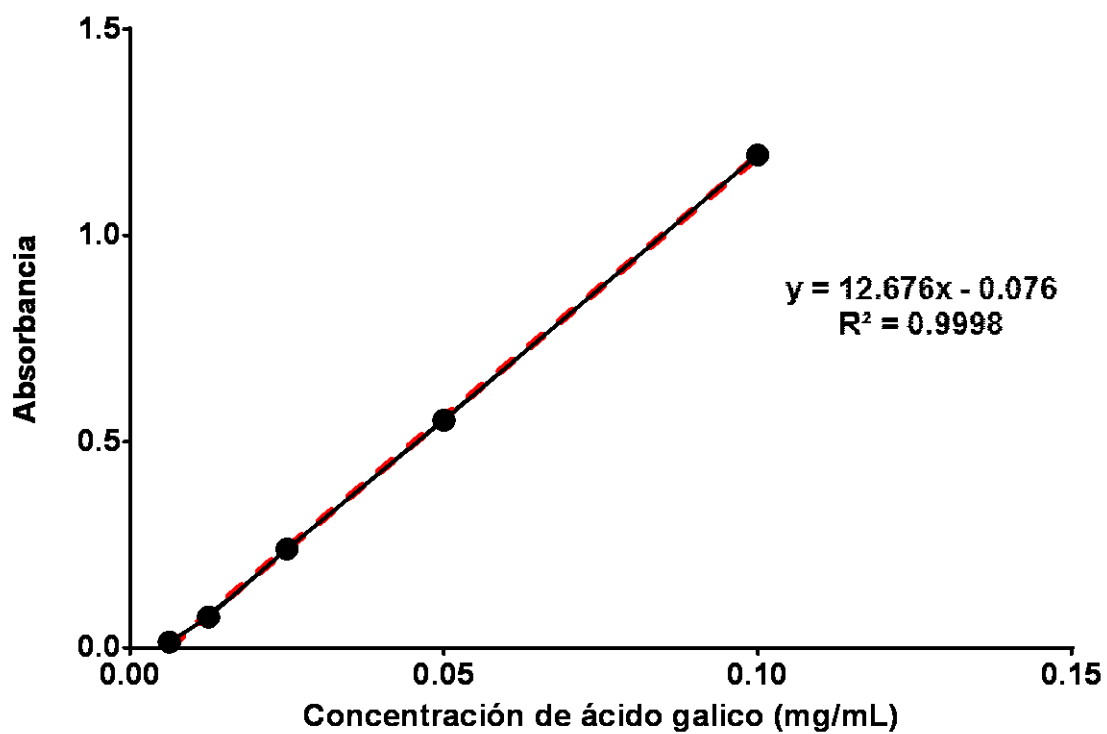


Fig. 18 Curva patrón de ácido gálico

APÉNDICE 11

Gráfica para la cuantificación de flavonoides

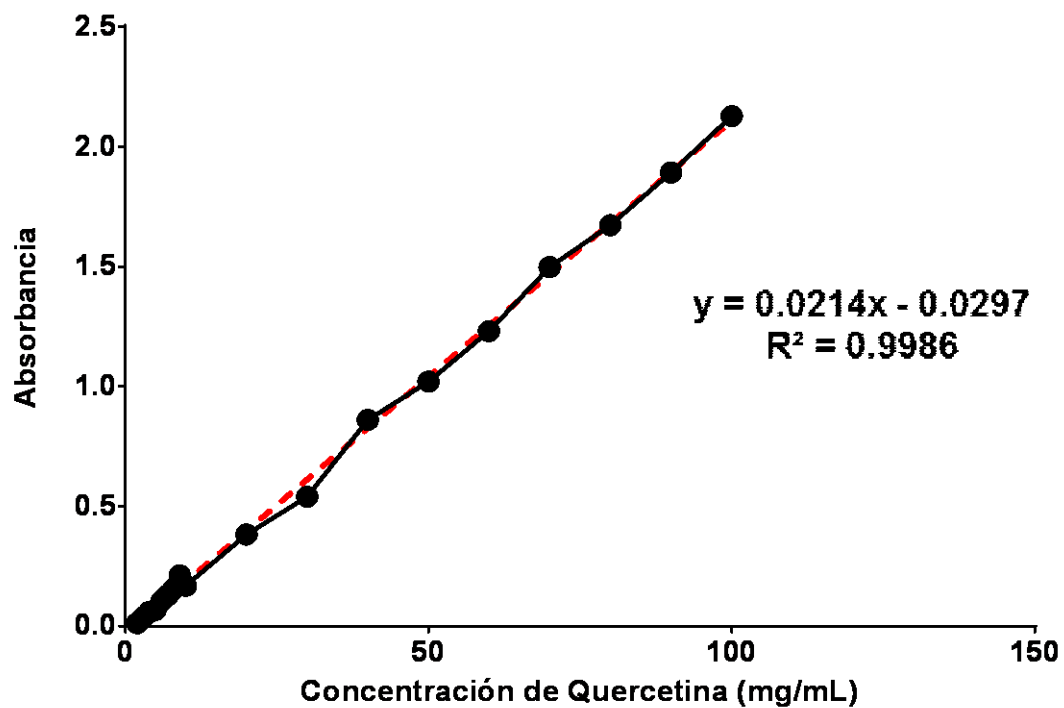























Fig. 19 Curva patrón de quercetina.

APÉNDICE 12

Registro fotográfico de los diferentes tratamientos

TRATAMIENTO	DÍA 1	DÍA 5	DÍA 10
PIEL SANA			
SIN TRATAMIENTO			
CONTROL NEGATIVO (gel)			

<p>CONTROL POSITIVO (Recuperón N)</p>			
<p>EXTRACTO MeOH1 20%</p>			
<p>EXTRACTO MeOH1 10%</p>			
<p>EXTRACTO MeOH1 5%</p>			

REFERENCIAS

- Alanís, G.J., Velazco, C.G., Foroughbakhch, P.R., Valdez, T.V., Alvarado, V.M.A., 2004. Diversidad florística de Nuevo León: Especies en categoría de riesgo. *Ciencia UANL*.7, 209-218.
- Al-Fatimi. M., Wurster. M., Schröder. G., Lindequist. U., 2007. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants of Yemen. *Journal of Ethnopharmacology*. 111, 657-666.
- Anduaga, S.E., Sánchez, S.L., 2005. Antibióticos Tópicos. *Dermatología Peruana*. 15, 7-20.
- Araujo, L., Buitrago, D., Marquina, M., Morales, N., Méndez, G., Pernía, T., Sosa, M., 2002. Comparación de la actividad anti-inflamatoria de los polifenoles presentes en las frutas; Mora (*Rubus fruticosus* B.), Fresa (*Fragaria vesca* L.) y Grapefruit (*Citrus paradisi* M). *Revista de la facultad de farmacia*.44,64-69.
- Ávalos, A. y Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie de Fisiología Vegetal* 2(3): 119-145
- Avendaño, A., Casas, A., Dávila, P., Lira, R., 2006. Use forms, management and commercialization of "Pochote" *Ceiba aesculifolia* (H.B. & K.) Britten & Baker f. subsp. *parvifolia* (Rose) P.E. Gibbs & Semir (Bombacaceae) in the Tehuacán Valley, Central, México. *Journal of Arid Environments*.67,15-35.
- Avello, M., Suwaslsky, M., 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Facultad de ciencias químicas. Universidad de la Concepción, Chile. 161-172.
- Beer, E.J., Sherwood, M.B., 1945. The paper-disc agar-plate method for the assay of antibiotic substances. *The Wellcome Research Laboratories* 459-467.
- Bermúdez, A., Oliveira, M.A., Velázquez, D., 2005., La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*. Redalyc.30, 453-459.
- Blanckaert, I., 2001. An ethnobotanic survey of homegardens in San Rafael Coxcatlán, valley of Tehuacán-Cuicatlán, México. Master of science in tropical agriculture. Katholieke Universiteit, Leuven. 83.
- Blanckaert, I., Swennen, R.L., Paredes, F.M., Rosas, L.R., Lira, S.R., 2004. Floristic composition, plant uses and management practices in homegardens of San Rafael Coxcatlán, Valley of Tehuacán-Cuicatlán, México. *Journal of Arid Environments*. 57,39-62.

Birben,E., Murat, S.U.,Sackesen,C.,Erzurum.S.,Kalayci,O., 2012.Oxidative Streess and antioxidant Defense.World Allergy Organization Journal. 5, 9-19

Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Durán, A., Lira, R., 2005. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. Journal of Ethnopharmacology. 97, 429-439.

Canales, M.M., Hernández, D.T., Caballero, N.J., Romo de V.R.A., Durán, D.Á., Lira S.R., 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla.México Acta Botánica Mexicana.75, 21-43.

Callen,O.,1967.Analysis of Tehuacán Coprolites.En D. S. Byers, ed., The Prehistory of the Tehuacán Valley.Environment and Subsistence.University of Texas Press, Austin, Texas. 1, 261–280

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute., 2012.,Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. Tech. Rep.M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Pennsylvania, USA.184.

Carranza, E., 2000. Flora del Bajío y Regiones adyacentes. Instituto de Ecología A.C. fascículo. 90,15.

Cole, M.D., 1994.Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays- a critical review. Biochemical Systematic and Ecology. 22,837-856.

CONANP. 2014. [En línea]: <http://tehuacan-cuicatlan.conanp.gob.mx/index.php> [Consulta: 16 de marzo 2015].

Corredor, C.G., Santamarina, Q.P., Parra, N.S., 2013. Proceso de Cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas Fisioterapia. Universidad Nacional de Colombia. Departamento del Movimiento Corporal. 61,441-448.

Croteau, R., Kutchan, T.M., and Lewis, N.G., 2000. Natural products (Secondary metabolites).Biochemistry and Molecular Biology of Plants.American Society of Plant Physiologists.Maryland,USA.24,1367.

Diego-Pérez, N., Gómez-Campos, A., 2013. Flora de Guerrero. Bombacaceae. Prensas de Ciencias México. 54, 34.

Domínguez, X.A., 1979. Métodos de la Investigación Fitoquímica. Ed.Limusa. México. 45-47.

Escamilla, J.C., Cuevas, M.Y., Guevara, F.J., 2009. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Medigrafic*.52, 73-75.

European Wound Management Association (EWMA)., 2005. Identificación de los criterios de infección en heridas. Medical Education Partnership LTD, London.

Franco, B.M., 2014. Actividad Antimicrobiana de la Fibra Del "POCHOTE", *Ceiba aesculifolia subsp. parvifolia* de san Rafael, Coxcatlán, Puebla. Tesis de Licenciatura. FES Iztacala. UNAM. México.

Fernández, B.M., 1999. Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje en la zona semiárida de Coxcatlán, Puebla. Tesis de Maestría. UNAM. México. 98.

García, M.E., 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Universidad Nacional Autónoma de México. 252.

Gómez, D.O., Sesma, S., Becerril, M.V., Knaul, F.M., Arreola, H., Frenk, J., 2011. Sistema de salud de México. 53, S220-S232.

Gutierrez, A.D.M., Ortiz, G.A.C., Mendoza, C.A., 2008. Medición de Fenoles y Actividad antioxidante en malezas usadas para la alimentación animal. simposio de metrología. Querétaro. 1-5.

Hawk, T.C., Leary, S.L. y Morvis, T.H., 1999. Formulary for Laboratory Animals. Blackwell Publishing. 2,167.

INEGI., 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Coxcatlán, Puebla.

Ladeji, O., Omekarah, L., Solomon, M., 2003. Hypoglycemic properties of aqueous bark extract of *Ceiba pentandra* in streptozotocin-induced diabetic rats. Elsevier. *Journal of Ethnopharmacology*. 84, 139-142.

Lira, R., Rodríguez, L., García, H., Cervantes, C.M., Flores, J., Vázquez, I., Peñalosa, L., Hernández, M., Urzúa, M. Moreno., G. Avila, T. Hernández, M. Canales., A. M. García-Bores, R. Serrano, O., Coronado y M. López., 2008. 2o Informe del proyecto Conservación de Plantas Útiles de San Rafael Coxcatlán, a Través de Bancos de Semillas y Propagación, MGU/Useful Plants Project (UPP) - México, KEW Royal Botanic Gardens/FES Iztacala, UNAM, México. 20.

Lozada, M.S., García, L., 2009. Estrés oxidativo y antioxidantes: como mantener el equilibrio. Servicio de dermatología. Universidad del valle. Colombia. 17,172-178

MacNeish, R.S., 1967. A Summary of the Subsistence. The Prehistory of the Tehuacan Valley. Environment and Subsistence. University of Texas Press. Austin, Texas. 1, 290–331.

Majid, M., Rashid, k.M., Ali, S.N., Ul, H.I., Asad, F.M., Ullah, S., Sharif, A., Zahra, Z., Younis, T., Sajid, M., 2015. Studies on phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic activities of *Euphorbia dracunculoides*. BioMed Central. 15, 349.

Maldonado, O., Jiménez, E., Guapillo, M., Ceballos, G. y Méndez, E. 2010. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. Revista Médica de la Universidad Veracruzana. Diciembre 2010

Martin-Puzon, R.J.J., Rivera, W.L. 2015., Free-radical scavenging activity and bioactive secondary metabolites from various extracts of *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC. (Molluginaceae) roots, stems and leaves. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 5, 711-71.

Martínez, F.J., González, G.J., Culebras, M.J., Tuñón, M.J., 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes, Nutrición Hospitalaria. Departamento de fisiología. 17, 271-278.

Martinez, D.C., Rugerio, V.C., Rivas, S., 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración. Facultad de medicina UNAM. 46, 231-235.

Medina, S.J., 2000. Determinación del vigor y el estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) a lo largo de una cronosecuencia edáfica en un abanico aluvial en Coxcatlán, valle de Tehuacán. Tesis, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, UNAM, Tlalnepan, Estado de México. 48 p.

Murillo, F. 2006. Actividad antioxidante «in vitro» de las bebidas de frutas. Revista Tecnológica. Alfa Editores Técnicos. 27 pp.

Ngounoua, F.N., Melia, A.L., Lontsia, D., Sondengama, B.L., UrRahman, A., Choudhary, M.I., Malik, S., Akhtar, F., 2000. New isoflavones from *Ceiba pentandra*. Phytochemistry .54, 107-110.

Organización Mundial de la Salud. Medicina tradicional. [En línea] 2016. http://www.who.int/topics/traditional_medicine/es/index.html [Consulta: 21 de abril 2016]. N°134.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). Enfermedades producidas por radicales libres. Revista panamericana de la salud pública. 1, 400-402

Orozco, M.J., 2010. Estudio comparativo de algunas actividades biológicas de las cortezas de *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia*, *Juliana adstringens* y *Cyrtocarpa*

procera de San Rafael Coxcatlán, Puebla. Tesis de Maestría. FES-Iztacala. UNAM. México. 128.

Osorno, S., 2001. Biología de la polinización de *Ceiba aesculifolia subsp parvifolia* Rose. (Bombacaceae) en el Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.

Okusa, P. N., Penge, O., Devleeschouwer, M., Duez, P., 2007. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 112: 476-481.

Pabón, C.L., Hernández, R.P., 2012. Importancia química de *Jatropha curcas* y sus aplicaciones biológicas, farmacológicas e industriales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 17, 194-209.

Paiva, P.M.G., Gomes, F.S., Napoleño, R.A., Sa, R.A., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., 2010. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. *Formatex*. 396-406.

PNS (Programa Nacional de Salud) 2007-2012. Por un México sano: construyendo alianzas para una mejor salud Primera edición. D.R. Secretaría de Salud México, D.F. 23-24.

Quintanar, E.M.A., Calderón, S.V.J., 2009. Capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Redalyc*. 28, 89-101.

Ramamoorthy, P.K. y Bono, A., 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology* .2, 70-80.

Reyes, S.J., Brachet, I.C., Pérez, C.J. Y Gutiérrez, R.A., 2004. Cactáceas y otras plantas nativas de la cañada Cuicatlán, Oaxaca. Ed. UNAM México. 193.

Rodríguez, R.R., González, T.J.H., 2011. Métodos alternativos para el tratamiento de pacientes con heridas infectadas. *Medisan* .15, 503.

Romero, M., 2014. Bases para el manejo sustentable de *Ceiba aesculifolia* (H.B. & K.) Britten & Baker f. *subsp. parvifolia* (Rose) P.E. Gibbs & Semir a través de un análisis poblacional. Tesis de licenciatura, Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Rosas, L.R., 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis de Licenciatura. FES-Iztacala. UNAM. México. 94

Ross, J.A., Kasum, C.M., 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*. 22,19-34.

Rzedowski, J., 1978. *Vegetación de México*. Ed. Limusa. México. 432.

Salcedo-Sánchez, B., 1997. *Insectos precortesianos de la cuenca de Coxcatlán, del Valle de Tehuacán, Puebla*. Tesis de licenciatura, Biología, UNAM. Facultad de Ciencias. 6-10.

Schlaepfer, L. y Mendoza-Espinoza, J., 2010. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* .41,18-27.

Secretaría de Salud. Censo de Población., 2001. Casa de salud de la comunidad. Instituto Mexicano del Seguro Social Ayuntamiento de Coxcatlán, Puebla, México. 10.

Secretaría de Salud. Rendición de Cuentas en Salud 2012. México, D.F Secretaría de Salud, 2012.

Sepúlveda, S., Carolis, V., 2005. Cicatrización normal. *Cirugía Plástica Esencial*. Departamento de Cirugía Hospital Clínico de la Universidad de Chile. 226,17-29

Sepúlveda, J.G., Porta D.H., Rocha S.M. 2003. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21, núm. 3, 355-363.

Seymour I., Schwartz, M.D., 2000. *Principios de la cirugía*. Mc Graw-Hill. 1. México.

Scherer, R., Teixeira, G.H. 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*. 658, 654-658.

Singleton, V.L., Orthofer, R. Lamuela-Reventós, R., 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of FolinCiocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*. 299, 152-178.

Teller, P. White, T.K ., 2016. *Fisiología de la cicatrización de la herida: de la lesión a la maduración*. Elsevier. 89, 599-610.

Vaisber, A.M., Milla, M. Planas, J. Cordova, J.E., Agusti, R. Ferreyra, M. Mustiga, L. Carlin, G., 1989. Taspine is the cicatrizant principle in sangre de grado extracted from *Croton lechleri*. *Planta medica* .55, 117-234.

Valencia, B.C., 2010. Cicatrización: proceso de reparación tisular: aproximaciones terapéuticos. *Investigaciones Andina*. 12, 100.

Valiente-Banuet, A., Alcantara, A., Dávila, P., Flores-Hernández, N., Arismendi, M. C., Ortega-Ramírez, J., Soriano, J.A., 2000. La vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 67, 25-75.

Valiente, B. L. 1991. Patrones de precipitación en el valle semiárido de Tehuacán, Puebla, México. Tesis. UNAM. México 65 pp.

Vanden Berghe, D. A., Vlietinck, A. J., 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. En: Methods in plant biochemistry. Vol. 6 "Assays for Bioactivity". Hostettmann, K. Series editor Dey, P. M. Academic Press. New York, USA. 47-71.

Wirtz, J.V., Serván, M.E ., Heredia, I.,2013.Factores asociados con la utilización y el gasto en medicamentos en México. Centro de Investigación en Sistemas de Salud, Instituto Nacional de Salud Pública. México.S112-S122.

World Union of Wound Healing Societies (WUWHS). Principios de las mejores prácticas: La infección de las heridas en la práctica clínica. Consenso internacional. London: MEP Ltd, 2008.

