



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS
LABORATORIO FARMACOGNOSIA



**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE DEL ACEITE
ESENCIAL DE *Bursera schlechtendalii* ENGLER.**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de

BIÓLOGO

Presenta:

Octavio Canales Alvarez.

Directora de tesis:

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez.

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. México. 2017.



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.

Reconocimiento.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) y en el laboratorio de Inmunobiología en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Fue dirigido por la Dra. Ma. Margarita Canales Martínez.

Fue revisado por el siguiente jurado:

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla.

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez.

Dr. Óscar de Jesús Nieto Yáñez.

M. en C. Ana Bertha Hernández Hernández.

Para la realización de esta tesis se contó con el financiamiento del proyecto UNAM PAPIIT 212317

Octavio Canales Alvarez recibió la beca UNAM PAPIIT 212317 para la conclusión de estudios.

Dedicatorias.

A mis padres Pedro y Eloisa, si no fuera por ustedes y todos los sacrificios que han hecho para sacarnos adelante no estaría redactando esto. Me faltarían palabras para describir todo lo que son para mí. Siempre dando más del 100% para sacarnos adelante a mi hermano y a mí. Sin duda alguna este gran paso en mi vida es por ustedes. Gracias por todos sus esfuerzos, siempre serán mi más claro ejemplo de las personas que dejan todo por sus seres queridos. Los quiero.

A mi hermano Pedro, aunque en algunos momentos no hemos sido los hermanos más cercanos, sé que siempre estarás para mí como yo para ti. Espero que sigamos saliendo adelante juntos.

A mi abuelita Margarita, que desde pequeño siempre ha estado a mi lado apoyándome o regañándome, eres como una segunda madre para mí, gracias por todo abuelita, gracias por enseñarme a ser como soy.

A ti Alma, por estar a mi lado en los momentos donde más te he necesitado, quisiera darte las gracias por todo lo que has hecho por mí, pero me llevaría mucho tiempo y espacio. Muchas gracias por todo flaca, sin duda eres la mejor persona que pude conocer en la carrera y me siento muy agradecido de que seas mi novia. Sabes que estaré contigo para lo que sea y te ayudaré en todo lo que pueda, así como tú lo has hecho conmigo. Te amo.

A mis tíos Natalia, Irma, Margarita y Marco, muchas gracias por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida académica, gracias por preocuparse por mí. Pero en especial a mi tía Maga y mi tío Marco, gracias por darme esta oportunidad de entrar a su grupo de trabajo, gracias por darme todo lo que está a su alcance para verme salir adelante y sobre todo gracias por confiar en mí.

A mis primos Mario, Marco, Dono, Jack, Isack, Alejandro y Héctor; aunque, con algunos ya no somos tan cercanos, siempre han sido un ejemplo a seguir para mí y más que mis primos los considero como mis hermanos, Gracias por todo.

A mi prima Jessica, a mi pseudoprimo Néstor jaja y a mi abuelito Braulio, aunque no nos veamos mucho, sé que siempre estarán para nosotros como nosotros para ustedes, muchas gracias por todo.

A ti Less, eres la chava con la que me he acoplado más para trabajar, gracias por tus enseñanzas, por todo lo que hemos pasado ya sean enojos, ratos chistosos, pero si no fueran por tus enseñanzas no hubiera sido posible la realización de este trabajo. Gracias por todo Lessliana.

A ustedes Carlos, Fonsi, Jair y Marisol por siempre apoyarme durante toda la carrera, por ser mis mejores amigos durante esta etapa tan genial y por haberme soportado tanto tiempo jaja, algunos 4 años y algunos otros 2 años. Sigán así campeones, gracias por todo.

A Mara, José, Michael y Fanny por ser los más cercanos a mí en los laboratorios, por los buenos momentos que hemos pasado, pero sobre todo por sus enseñanzas, gracias por orientarme y asesorarme cuando llego a tener dudas. Gracias por todo.

Al laboratorio de Inmunobiología por aceptarme en su equipo de trabajo a Mario, Óscar, Nelly, Alonso, Gus, Rubén, Judith, Dany y Pili, gracias por todo porque de alguna manera he aprendido un poco de cada uno de ustedes, gracias por las buenas historias contadas y los momentos divertidos que hemos pasado en el laboratorio.

Al laboratorio de Farmacognosia que me recibieron siempre con los brazos abiertos, gracias por todos los momentos chistosos, gracias por todas sus enseñanzas. Gracias a Rebe, Ana, Karlita, Jenny, Rodrigo, Uriel, Hatziri, Michael, Judith y José Manuel, aunque con algunos no me llevo del todo bien aun así gracias porque algo he aprendido de ustedes.

Índice.

Introducción.	11
Antecedentes.	15
Objetivo general.	16
Objetivos particulares.	16
Materiales y Métodos.	16
Área de estudio.	17
Recolecta de material biológico.	17
Actividad antibacteriana.	18
Capacidad antioxidante.	18
Toxicidad aguda.	19
Edema auricular.	20
Eficacia de cicatrización.	21
Velocidad de cierre.	21
Histología	22
Fuerza de cierre.	22
Resultados.	24
Discusión	42
Conclusiones.	49
Referencias.	82

Índice de Figuras.

Figura 1. <i>B. schlechtendalii</i> .	14
Figura 2. Ubicación geográfica de San Antonio Nanahuatipam, Oaxaca.	17
Figura 3. Cromatograma del aceite esencial.	25
Figura 4. Actividad antimicrobiana de aceite esencial.	30
Figura 5. Comparación de velocidad de cierre en los tratamientos.	33
Figura 6. Porcentaje de inflamación en los tratamientos.	36
Figura 7. Comparación de velocidad de cierre en los tratamientos.	38
Figura 8. Comparación de tratamientos en eficacia de cierre.	39
Figura 9. Distribución geográfica de <i>B. schlechtendalii</i> .	51
Figura 10. Fruto de <i>B. schlechtendalii</i> .	52
Figura 11. Microfotografía de piel.	57
Figura 12. Capas de la piel.	59
Figura 13. Formación de los precursores de terpenos.	60
Figura 14. Representación de aceites esenciales.	67
Figura15. Extracción del aceite esencial.	68
Figura16. Cromatógrafo de gases y espectrómetro de masas.	69
Figura17. Isoflurano y aplicador estandarizado para el proyecto.	73
Figura18. Biopsy punch.	74
Figura19. Fármaco aplicado en el tratamiento.	76
Figura 20. Modelo de tensiométrico utilizado en el proyecto.	81

Índice de cuadros.

Cuadro 1. Datos taxonómicos de la especie <i>Bursera schlechtendalii</i> Engler.	14
Cuadro 2. Grupos de trabajo para Toxicidad aguda.	19
Cuadro 3. Grupos de trabajo para Edema auricular.	20
Cuadro 4. Grupos de trabajo para Eficacia de cicatrización.	21
Cuadro 5. Grupos de trabajo para Fuerza de cierre.	23
Cuadro 6. Peso y Rendimiento del aceite esencial.	24
Cuadro 7. Estructura química de los compuestos con mayor proporción en el aceite de <i>B. schlechtendalii</i>	26
Cuadro 8. Actividades biológicas reportadas para los compuestos del aceite esencial.	28
Cuadro 9. Comparación visual de los halos de inhibición en las bacterias.	31
Cuadro 10. Comparación de la capacidad antioxidante.	32
Cuadro 11. Comparación fotográfica de las heridas durante el tratamiento.	32
Cuadro 12. Experimento de toxicidad aguda a nivel histológico.	35
Cuadro. 13. Seguimiento fotográfico del tratamiento de aceite esencial al 50 %	37
Cuadro. 14. Comparación fotográfica de los tratamientos a nivel histológico	41
Cuadro. 15. Flora utilizada en la comunidad de San Antonio Nanahuatipam, Oaxaca.	54

Cuadro. 16. Clasificación de Terpenos.	61
Cuadro.17. Nombre y estructura química del Isoflurano.	72
Cuadro.18. Estructuras químicas de los principios activos de Recoverón NC	76

Índice de Apéndices.

Apéndice 1. Datos generales de <i>B. schelechtendalii</i> .	50
Apéndice 2. Datos generales de San Antonio Nanahuatipa, Oaxaca.	51
Apéndice 3. Histología de la piel.	56
Apéndice 4. Terpenos.	60
Apéndice 5. Aceites esenciales	64
Apéndice 6. Estudios realizados sobre el género <i>Bursera</i> .	67
Apéndice 7. Método de hidrodestilación.	68
Apéndice 8. Composición química del aceite esencial	69
Apéndice 9. Método de difusión en agar Kirby-Baüer.	70
Apéndice 10. Isoflurano (Anestesia inhalada)	72
Apéndice 11. Biopsy punch.	74
Apéndice 12. Recoverón NC.	75
Apéndice 13. Velocidad de cierre.	77
Apéndice 14. Técnica histológica.	78
Apéndice 15. Tinción hematoxilina y eosina (H y E)	79
Apéndice 16. Método tensiométrico	80

RESUMEN.

En la región de San Antonio Nanahuatipam, Oaxaca, México. El uso etnobotánico atribuido a *Bursera schlechtendalii* es como infusión para tratar heridas de difícil cierre y para problemas del tracto digestivo, pero con mayor frecuencia es utilizado como cicatrizante.

En el presente trabajo se obtuvo aceite esencial de la parte aérea de *Bursera schlechtendalii*, con el cual posteriormente se evaluó la actividad antioxidante, se corroboró la actividad antimicrobiana, así como la composición química a partir de una cromatografía de gases acoplada a un espectrometría de masas (CG-EM) para obtener los compuestos que se encuentran en mayor proporción en la muestra del aceite destacando α -Felandreno, β -Pino y (-)-Limoneno los cuales en sinergia con los compuestos de baja abundancia nos ayudaron para obtener una mayor eficacia de cierre y poderlo observar a nivel macroscópico y microscópico; además, de la fuerza medida en gramos que se necesitó para abrir la herida de las cuales el grupo de aceite esencial al 50% necesito 510g, el grupo de Recoverón NC fue de 580g y por último el grupo de solo herida necesito 455g . Se evaluó la toxicidad aguda por vía tópica para saber qué dosis es la adecuada para los organismos. Por otra parte, se realizaron experimentos de inflamación ya que, juega un papel muy importante en el proceso de cicatrización. Esto con el fin de validar científicamente su uso etnobotánico.

Durante los experimentos el aceite esencial al 50% destacó de manera excelente en la velocidad de cierre, actividad antiinflamatoria, en la actividad de regeneración en las capas de piel y su arquitectura celular actuando como el fármaco convencional y teniendo una tendencia a ser mejor que éste.

Palabras clave: *Bursera*, *Bursera schlechtendalii*, plantas medicinales, cicatrización, aceite esencial.

INTRODUCCIÓN

La cicatrización es el proceso normal que se presenta en los seres humanos para regenerar el tejido epidérmico y dérmico (Apéndice 3). Cuando un individuo presenta una herida (ruptura de un tejido intencional o accidental), una serie de eventos bioquímicos complejos se presentan para reparar el tejido dañado. Estos eventos se superponen entre sí temporalmente. Cuando la cicatrización es lenta o muy fuerte se puede considerar que el proceso de reparación es anormal o patológico (Redrobán, 2012).

Existen diferentes tipos de cicatrización en las heridas.

El primer tipo es el cierre primario donde la herida es cerrada dentro de horas de su producción. Este tipo de cicatrización es el ideal para tratar una herida; sin embargo, hay diversos factores que afectan este cierre primario, básicamente, la posibilidad de que la herida se infecte. La infección depende de varios factores entre los que se cuentan el huésped, la concentración bacteriana, la virulencia del germen infectante, etc. El segundo tipo es el cierre por segunda intención el cual no incluye cierre formal de la herida; la herida cierra espontáneamente por contracción y reepitelización. Como es lógico, estas heridas tardarán más para cicatrizar, la cicatriz será de mayor tamaño. En este tipo de cicatrización el índice de infección es mayor que en los cierres primarios. Para finalizar, el tercer tipo es el cierre terciario también conocido como cierre primario diferido, incluye desbridamiento (eliminación del tejido muerto, dañado o infectado) inicial de la herida y curaciones por un período extendido en una herida que se deja abierta para posteriormente generar el cierre formal generalmente con suturas, u otro mecanismo. Para que se produzca la cicatriz se lleva a cabo una serie de mecanismos continuos, llamados fases de reparación cutánea; estas fases son 3, inflamatoria, proliferación y remodelación (Benavides, 2008).

Fase inflamatoria: esta fase comienza en el momento en que se produce la herida, y puede estar formada por dos partes, una parte vascular en la cual actúan los diferentes factores que producen la coagulación para evitar la pérdida de sangre, y

por otra parte, la llamada celular, que implica la presencia de glóbulos blancos en la zona de la herida para evitar una posible infección. Esta fase puede durar de 24 a 48 horas dependiendo de la gravedad de la lesión producida (Hidalgo, 2010).

Fase de proliferación: En esta fase se producen varios procesos, siendo los más importantes: la proliferación de los fibroblastos, reepitelización que ocurre para reponer el tejido epitelial perdido durante la lesión, para esto se produce una migración de queratinocitos desde la matriz basal. El siguiente proceso que sucede es la angiogénesis que ocurre el segundo día luego de realizarse la herida, este proceso es absoluto en la cicatrización ya que una vez activado favorece a la migración de células, reparación del tejido endotelial y formación de nuevos vasos sanguíneos (Hidalgo, 2010).

El último proceso en la proliferación es la fibroplasia en donde se produce nuevo colágeno y otras proteínas que ayudan a formar la nueva matriz y granulación. Todos estos procesos se dan de los dos a los cuatro días de que se ha producido la lesión (Hidalgo, 2010).

Fase de remodelación: puede durar días, meses o años, consiste en la reparación del tejido hasta conseguir una similitud al tejido original (Hidalgo, 2010).

La inflamación es un proceso tisular formado por secuencia de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas, que puede dividirse en aguda o crónica en función de su duración. Al igual que el dolor, esta condición conduce a la pérdida de funcionalidad de la parte afectada (Robbin y Robbins, 1990). Ya que la inflamación juega un papel importante en contrarrestar la infección e inducir la fase de proliferación, es una parte necesaria de la cicatrización; pero, si esta dura demasiado, puede llevar a un daño tisular. El proceso de inflamación inicia con la dilatación de los capilares y arteriolas locales, provocada por mediadores químicos como histamina, prostaglandinas (PGE2, PGI2 PGE1) y el factor activador de plaquetas, producidos por las células del tejido circundante, lo que causa un exceso de flujo sanguíneo local, así el paso de proteínas aumenta la presión oncótica y la

salida de agua, lo que clínicamente provoca el edema que se localiza en el área de la lesión (Lüllmann y Mohr, 1992).

A lo largo del tiempo se han desarrollado varios fármacos utilizados con el fin de cicatrizar heridas, desde plantas como el matico, o la sábila, hasta medicamentos actuales como el β -sitosterol, corticoides, combinaciones con antiinflamatorios y antimicrobianos (Ramos y Miranda, 2007).

Los fármacos con actividad cicatrizante que existen en la actualidad realizan su efecto estimulando el proceso regenerativo del área afectada, o generando condiciones adecuadas para la misma; ya que, mantienen la herida libre de microorganismos lo cual favorece a un cierre más eficaz (Ivanovska *et al.*, 1993); la única desventaja de estos medicamentos es que su precio no es accesible para todo tipo de personas y las porciones por caja no son las suficientes para los tratamientos. Por lo tanto, los seres humanos han hecho uso de los productos de la naturaleza desde tiempos inmemoriales, no sólo para satisfacer su necesidad de alimento, sino también con el fin de sanar sus enfermedades, cicatrizar sus heridas y elevar su estado de ánimo (Hernández, 2010). Las comunidades indígenas poseen un profundo entendimiento de su medio ambiente y su ecología (Leonti *et al.*, 2003), tienen el conocimiento de los diferentes usos que se les pueden dar a las plantas, por ejemplo, como medicinas (Heinrich *et al.*, 1998). La medicina tradicional mexicana es una importante manifestación cultural, característica de la vida del país. Herederas de una larga tradición prehispánica, las culturas indígenas de México han preservado y difundido formas y procedimientos eficaces para resolver importantes problemas de salud de la población. Un ejemplo de estas es el uso de los copales que fueron conocidos y aprovechados ampliamente por las culturas prehispánicas para usos rituales, ceremoniales, festivos, terapéuticos, medicinales y como aglutinante. Su relevancia logró sobrevivir a la propia Inquisición, utilizándose hasta nuestros días entre numerosos pueblos indígenas y mestizos (Biodiversidad, 1996). De este modo, lo que se busca es brindar una alternativa para el tratamiento de cicatrización a un bajo costo, lo cual representaría una gran ventaja con respecto a un producto farmacéutico convencional (Vélez, 2015).

El presente trabajo presenta una nueva alternativa para el tratamiento de heridas causadas en pacientes sanos, basados en el conocimiento etnobotánico y las propiedades farmacológicas atribuidas a los metabolitos secundarios (Apéndice 4) del aceite esencial de *Bursera schlechtendalii* Engler (Figura 1), los datos taxonómicos de esta especie se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Datos taxonómicos de la especie *Bursera schlechtendalii* Engler.

REINO	Plantae	
SUBREINO	Tracheobionta	
DIVISION	Magnoliophyta	
CLASE	Magnoliopsida	
SUBCLASE	Rosidae	
ORDEN	Sapindales	
FAMILIA	Burseraceae	
TRIBU	Bursereae	
SUBTRIBU	Burserinae	
GÉNERO	<i>Bursera</i>	
ESPECIE	<i>Bursera schlechtendalii</i> .	

Figura 1. *Bursera schlechtendalii* (Foto tomada en agosto, 2016 en el lugar de colecta).

Aunque los estudios sobre este género de plantas son pocos se tienen registros del uso que se les ha dado desde la prehistoria hasta la actualidad (Apéndice 5). Un ejemplo es el uso etnobotánico como cicatrizante de heridas de difícil cierre que se le da a *B. schlechtendalii* en la comunidad de San Antonio Nanahuatipam, Oaxaca, México. Por lo cual se decidió evaluar la actividad cicatrizante en un modelo murino para sustentar científicamente su uso etnobotánico.

ANTECEDENTES.

En un estudio se demostró el uso de *B. morelensis* como antiinflamatorio, en este trabajo se obtuvo el extracto metanólico de las ramas de dicha especie y fue probado en ratones con edema inducido por carragenina. Los resultados del trabajo fueron los siguientes: el extracto metanólico tuvo una disminución del 28.01% a comparación de la Indometacina. La actividad biológica del extracto está dada por la mezcla de todos los compuestos fenólicos que contiene (50.5%), principalmente los fenilpropanoides y flavonoides. Las propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y analgésicas favorecen a la cicatrización de la herida y apoya el uso tradicional de *B. morelensis* en heridas agudas de piel (Serrano *et al.*, 2012).

López (2016) evaluó el efecto cicatrizante de diversos extractos (hexánico, hidroalcohólico y diclorometánico) obtenidos de las ramas de *B. glabrifolia* y *B. morelensis* mediante la capacidad para producir proliferación celular en cultivos de fibroblastos de piel humana, así como en modelos de incisión y escisión. Los resultados mostraron que los extractos hexánico y diclorometánico de la especie *B. glabrifolia* a 2 µg/mL, presentó los porcentajes más altos de proliferación celular a comparación de *B. morelensis*.

Son muy pocos los reportes que se han encontrado para *B. schlechtendalii*; Espinosa (2012) realizó un estudio comparativo de la composición química y la actividad antimicrobiana del aceite esencial de esta especie. Los resultados sobre los compuestos químicos de cada muestra fueron los siguientes: 3 Isopropenil-5, 5 dimetilciclopenteno, camfeno, limoneno, silvestreno, α-felandreno, α-pineno, β-felandreno, β-pineno, alcanfor, bergamol, cimenol, borneol entre otros y en lo que respecta a la inhibición de bacterias, *Streptococcus pneumoniae* fue la bacteria Gram positiva que presentó mayor inhibición en todas las muestras y *Escherichia coli* como la bacteria Gram negativa con mayor inhibición.

Por lo antes mencionado; se encuentran comprobados diversos usos para las burseras, sin embargo, este es el primer trabajo sobre *B. schlechtendalii* que

pretende evaluar científicamente su uso en el proceso de cicatrización y así poder tener un sustento científico que valide su uso tradicional.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la actividad cicatrizante del aceite esencial de *Bursera schlechtendalii*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Determinar la composición química del aceite esencial con una CG-EM.
2. Comprobar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de forma cualitativa por el método de difusión en agar Kirby-Baüer
3. Evaluar la capacidad antioxidante (método de reducción del radical DPPH).
4. Evaluar la toxicidad general del aceite esencial de manera tópica.
5. Evaluar la capacidad anti-inflamatoria (método de inducción de edema auricular inducido por Xilol).
6. Evaluar el efecto del aceite esencial sobre la eficacia de cicatrización en un modelo murino, determinando la velocidad y fuerza de cierre.
7. Describir la actividad del aceite esencial en el proceso de cicatrización a nivel histológico.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Colecta del material biológico.

El material vegetal necesario de *B. schlechtendalii* fue colectado en el mes de agosto de 2016 en San Antonio Nanahuatipam, Oaxaca, México.

Los ratones que fueron utilizados son de la especie *Mus musculus*, cepa CD-1 con un peso corporal de 20 ± 5 g y de 4 a 6 semanas. Los cuales fueron proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI). Los animales fueron almacenados en el laboratorio de Inmunobiología de la FESI, recibieron alimento estandarizado (Harlan 2018s) y agua durante el tiempo que duró su tratamiento, se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos bajo la norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (De Aluja, 2002).

Área de estudio.

San Antonio Nanahuatipam se encuentra localizado geográficamente entre 18°08' de latitud norte y los 97°07' de longitud oeste, con una altitud de 760 metros sobre el nivel del mar. Colinda al norte con el estado de Puebla; al sur con Santa María Tecomavaca; al este con Teotitlán De Flores Magón y con San Juan de los Cués; al oeste con Tepelmeme Villa de Morelos (Figura 2). Cuenta con una superficie total de terreno de 158.12 Km² y la superficie del municipio en relación al Estado es de 0.13%. El clima en la región es caluroso semidesértico con una temperatura promedio anual de 25 a 30 grados (Moreno-Bautista, 2008).

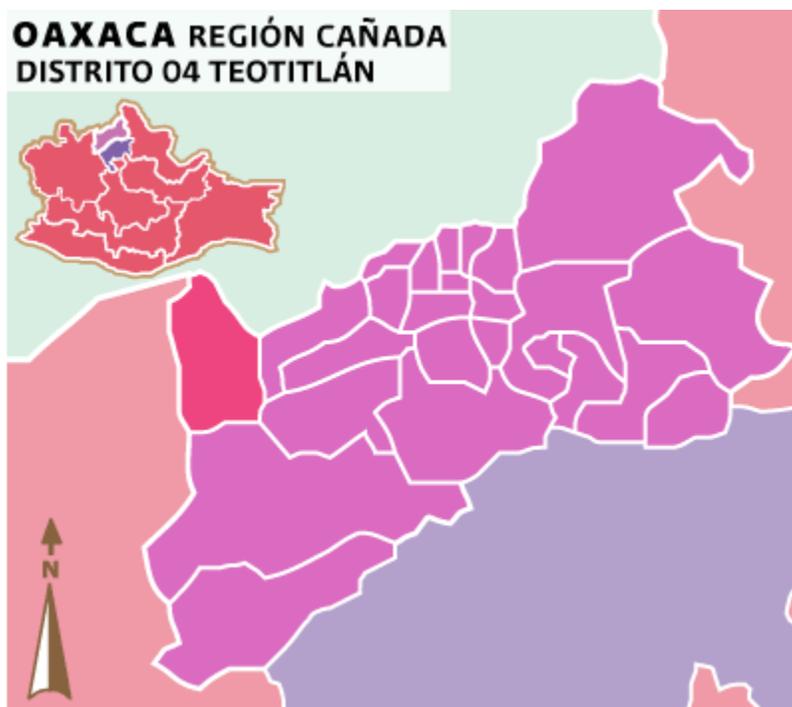


Figura 2. Ubicación geográfica de San Antonio Nanahuatipam (Imagen obtenida de INAFED, 2010).

Obtención del aceite esencial por hidrodestilación.

El aceite esencial (Apéndice 6) se obtuvo de la parte aérea (ramas) mediante la técnica de hidrodestilación (Domínguez *et al.*, 1973) (Apéndice 7) para posteriormente determinar su composición química con una cromatografía de gases

acoplada a espectrometría de masas (Apéndice 8) y su actividad cicatrizante en un modelo murino.

Actividad antibacteriana.

Se realizó de forma cualitativa por el método de difusión en agar Kirby-Baüer (Van den Berghe y Vlietinck, 1991) (Apéndice 9). Se utilizaron cepas de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*) y negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). Se empleó medio de cultivo Müller-Hinton. Con un asa de siembra se tocan las superficies de 4 o 5 colonias de cepas bacterianas y se sumerge en 10 mL de caldo Müller-Hinton, se enjuaga bien en el caldo para descargar todas las bacterias, se retira el asa y el tubo de cultivo se incuba a 37°C durante 24 horas.

Se sumerge un hisopo estéril y seco en la suspensión de bacterias, se elimina el exceso de líquido, con este hisopo se siembra por estría cerrada en tres direcciones de la placa de agar Müller-Hinton y para finalizar se colocan los sensidiscos impregnados con 10 µL de aceite esencial y otros sensidiscos impregnados de cloranfenicol (25 µg, control positivo). Cada ensayo se realizó por triplicado.

Capacidad antioxidante por el método del radical DPPH.

Se empleó el método de Brand-Williams *et al.*, 1995 con algunas modificaciones, 40 µL de muestra fueron adicionados a 960 µL de una solución metanólica de DPPH, se evaluó la capacidad de las muestras para atrapar el radical DPPH, por medio de la disminución en la absorbancia leída luego de 30 minutos de reacción a una longitud de onda de 517 nm, y se comparó el valor con la curva de referencia construida con Trolox como estándar, expresando los resultados como valores TEAC (µmol Trolox/100g de muestra). La absorbancia se midió en un espectrofotómetro y se calculó el porcentaje de inhibición (% Inh) usando la siguiente ecuación (Granados *et al.*, 2014).

$$\%Inh = \left[1 - \frac{A_{Muestra} - A_{Blanco}}{A_{Referencia}} \right] \times 100$$

Siendo A_{Muestra} la absorbancia del Aceite Esencial, para lo cual se preparó una solución de 10000 ppm, 50 mg en 5ml de Dimetil sulfóxido (DMSO, Merck), y a partir de ésta, soluciones diluidas a diferentes concentraciones (1, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 ppm), tomando en cada ensayo 40 μL y adicionando 960 μL de la solución del radical DPPH. A_{Blanco} es la absorbancia del Blanco, preparado con 40 μL de las concentraciones anteriores y 960 μL de MeOH, y $A_{\text{Referencia}}$ es la absorbancia de la Referencia, preparada con 40 μL de DMSO y 960 μL de la solución del radical DPPH• (Granados *et al.*, 2014).

Toxicidad aguda.

Se realizó según (Mulisa *et al.*, 2015) donde se utilizaron 10 ratones (5 machos y 5 hembras), los cuales fueron rasurados y depilados 24 horas antes del tratamiento, se utilizaron 2 concentraciones del aceite esencial las cuales fueron 10% y 50%, se administraron en 2 grupos de trabajo elegidos al azar (Cuadro 2).

Cuadro 2. Grupos de trabajo para Toxicidad aguda.

Concentración de 50%	Concentración de 10%
3 machos y 2 hembras	3 hembras y 2 machos

Los organismos se pesaron y se les aplicó una dosis única de 2000 mg/Kg a concentraciones del 10% y 50% utilizando como vehículo el aceite mineral.

Se colocaron 55 μL de las concentraciones del aceite esencial de *B. schlechtendalii* sobre el área depilada, posteriormente se colocó un apósito de algodón (impregnado con 200 μL de aceite mineral para saturar su nivel de absorción) las cuales serán sujetadas con ayuda de vendaje elástico sin causarle daño al organismo. El apósito se dejó durante 24 horas para evitar la volatilidad del aceite esencial de *B. schlechtendalii*. Se realizó un monitoreo diario durante 14 días observando posibles signos de toxicidad, tales como: irritabilidad, pasividad, anestesia, salivación, sangrado, diarrea, piloerección y convulsiones. Para el día 15 del tratamiento los organismos fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de piel

e hígado. Para el hígado se realizó una comparación de pesos contra hígados sanos; ya que, en el hígado se absorben la mayor parte de sustancias tóxicas para el organismo. Mientras que la piel fue retirada para realizar posteriormente la histología correspondiente.

Edema auricular inducido por Xilol.

Para la medición del efecto anti-inflamatorio agudo se realizó por el método del edema auricular inducido por Xilol (CYTED, 1995), se utilizaron 12 ratones machos de la cepa CD-1, mantenidos en ayuno de 4 a 6 horas y se agruparon al azar en tres grupos de cuatro individuos cada uno (Cuadro 3).

Cuadro 3. Grupos de trabajo para Edema auricular.

Xilol 50 µL del lado interno y 50 µL del lado externo de la oreja derecha
Xilol + diclofenaco 50 µL del lado interno y 50 µL del lado externo de la oreja derecha
Xilol + aceite esencial al 50% 30µL del lado interno y 50µL del lado externo de la oreja derecha

NOTA: En todos los grupos la oreja derecha sirvió como tratamiento; mientras que, la oreja izquierda fue el control o testigo (En todos los grupos se empleó una n=4).

Se anestesiaron a los ratones con 250 µL de Isoflurano (Hawk *et al.*, 1999) (Apéndice 10) posteriormente se les aplicó el Xilol por vía tópica en la parte interna tanto como en la parte externa de la oreja a todos los ratones, se dejó transcurrir 10 minutos para aplicar al grupo 2 el diclofenaco (50 µL del lado interno y 50 µL del lado externo de la oreja derecha) vía tópica. Para aplicar el tratamiento del aceite esencial de *B. schlechtendalii* al 50% se colocaron 20 µL, después de haber colocado 50 µL de Xilol en ambos lados.

Se dejó transcurrir 1 hora después de la aplicación de los tratamientos, se sacrificaron los ratones y con ayuda de un Biopsy Punch se realizó el corte de las orejas tanto la derecha como la izquierda en cada ratón; posteriormente se pesaron en una balanza analítica y se registrarán los pesos.

Los cortes de las orejas se colocaron en cassettes y se colocaron en formol al 10% para posteriormente realizar la técnica histológica.

Eficacia de cicatrización.

La eficacia de cicatrización para esta investigación fue evaluada tomando en cuenta dos parámetros: velocidad de cierre y fuerza de cierre.

Velocidad de cierre (Apéndice 13).

Para esta metodología se utilizaron 24 ratones los cuales fueron depilados 24 horas antes del inicio de su tratamiento para poder trabajar bien y evitar que la piel del organismo se irrite. Posteriormente los ratones fueron anestesiados con Isoflurano (Hawk *et al.*, 1999). Una vez anestesiados se procedió a realizar las heridas con el biopsy punch (Apéndice 11), en caso de ser necesario se utilizaron pinzas y tijeras. Para llevar a cabo esta parte del tratamiento es necesario la ayuda de 2 personas para estirar la piel y poder hacer la lesión sin ningún problema. Los grupos de trabajo se observan en el cuadro 4.

Cuadro 4. Grupos de trabajo.

Cantidad de ratones.	Tratamiento.
6 ratones con herida.	5 μ L de aceite esencial de <i>B. schlechtendalii</i> .
6 ratones con herida.	3mg de Recoverón NC (Apéndice 12).
6 ratones con herida.	Controles.
6 ratones sin herida.	Piel sana.

Los ratones con los tratamientos correspondientes y con la herida realizada con el biopsy punch fueron monitoreados y se tomó diario el diámetro de la herida con un vernier digital.

Los datos obtenidos fueron tratados en el programa GraphPad Prism 7, en donde se obtuvo el porcentaje de cierre de cada tratamiento y posteriormente se realizó un estadístico ANOVA de un factor para demostrar si los tratamientos tienen diferencias estadísticamente significativas.

Análisis por Histología.

Una vez terminado el tiempo del tratamiento se sacrificaron los ratones para poder retirar la lesión y realizó la técnica histológica (Apéndice 14) para posteriormente realizar la tinción de Hematoxilina–Eosina (H y E) (Apéndice 15).

Fuerza de cierre.

Para evaluar la fuerza de cierre se utilizaron 24 ratones organizados al azar en grupos (Cuadro 5) el ensayo se realizó con base en la técnica del ensayo tensiométrico (Apéndice 16). En el cual se aplicó el tratamiento durante 10 días donde se les hizo un corte longitudinal de 1 cm en la parte dorsal, para comenzar el experimento los organismos fueron sacrificados y se realizó la técnica y en este experimento no se recuperó el tejido para histología.

Cuadro 5. Grupos de trabajo para Fuerza de cierre.

Cantidad de ratones.	Tratamiento.
6 ratones con herida.	5 μ l de aceite esencial de <i>B. schlechtendalii</i> .
6 ratones con herida.	3 mg de Recoverón NC
6 ratones con herida.	Sin tratamiento.
6 ratones sin herida	Sin tratamiento.

RESULTADOS:

Obtención del aceite esencial.

Las ramas frescas de *B. schlechtendalii*, se colectaron durante el mes de agosto del 2016, en San Antonio Nanahuatipam, Oaxaca, México. En el cuadro 6 se muestran los gramos colectados de rama, gramos de aceite y el rendimiento del mismo.

Cuadro 6. Peso y Rendimiento del aceite esencial.

Peso de ramas (g).	Peso total del aceite (g).	Volumen total del aceite (mL).	Rendimiento (%).	Densidad del aceite (g/mL).
2485.3	12.989	18.60	0.522	0.698

Composición química.

Una vez obtenido el aceite se realizó la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Figura 3), de la cual se obtuvieron todos los compuestos del aceite esencial en donde destacan 13 por su contenido en la muestra (Cuadro 7), Con base en el tiempo de retención y patrones de fragmentación ubicados en la biblioteca versión 0.08 del NIST, se identificaron 3 compuestos mayoritarios; debido que, presentan un área mayor en el aceite y en el Cuadro 8 se pueden observar las actividades biológicas de cada compuesto consideradas importantes para este trabajo.

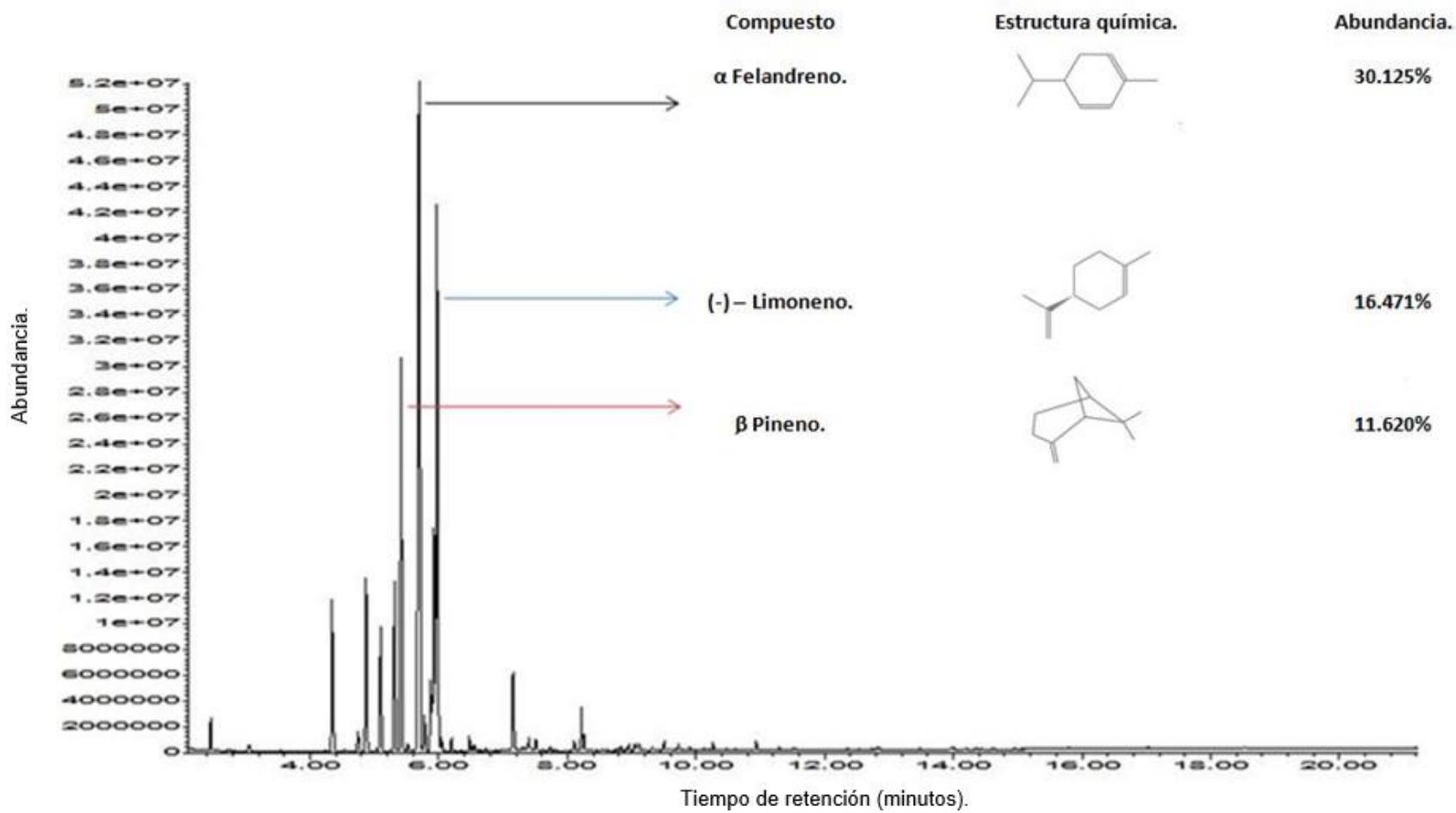
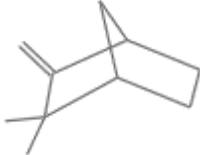
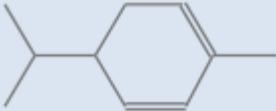
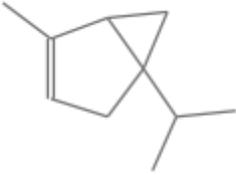
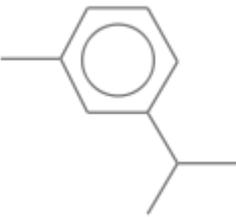
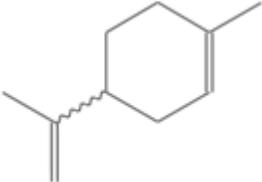
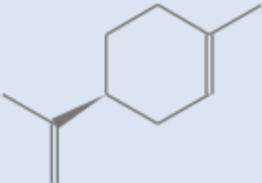
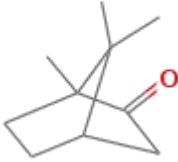


Figura 3. Cromatograma de la cromatografía de gases del aceite esencial de *B. schlechtendalii*

Cuadro 7. Estructura química de los compuestos con mayor proporción en el aceite de *B. schlechtendalii* (Los compuestos mayoritarios del aceite esencial se encuentran remarcados en color azul).

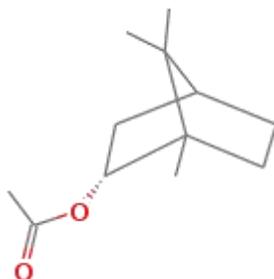
Compuesto	Estructura química.	Abundancia (%)	TR (min).
Nonano		4.953	4.347
Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, didehydro deriv		0.665	4.740
α Pineno.		5.276	4.868
Camfeno.		3.797	5.093
Sabineno		5.128	5.317
β -Pineno.		11.620	5.413

α -Felandreno.		30.125	5.694
α -Thujeno.		1.056	5.782
m-Cimeno.		2.351	5.878
Limoneno.		7.155	5.926
(-)-Limoneno.		16.471	5.974
(-)-Alcanfor.		2.201	7.161

Acetato de Bornilo.

0.962

8.219



Cuadro 8. Actividades biológicas reportadas para los compuestos identificados mediante la CG-EM del aceite esencial.

Compuesto.	Actividad biológica.	Referencia.
Nonano	Antimicrobiano	Espinosa 2012.
Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, didehydro deriv		
α -Pineno.	Antimicrobiano. Antioxidante. Antiinflamatorio.	Torres-Barajas <i>et al.</i> , 2013. Guala <i>et al.</i> , 2009. Dorantes y Maleny 2014.
Camfeno.	Antimicrobiano. Antioxidante. Antiinflamatorio.	Ji <i>et al.</i> , 1997. Tiwari y Kakkar 2009. Vendruscolo <i>et al.</i> , 2006.
Sabinene	Antimicrobiano. Antioxidante Antiinflamatorio.	Guerra-Boone <i>et al.</i> , 2015. Guerra-Boone <i>et al.</i> , 2015. Lira <i>et al.</i> , 2007.
β -Pineno.	Antimicrobiano. Antioxidante. Antiinflamatorio.	Leite <i>et al.</i> , 2007. El-Nekeety <i>et al.</i> , 2011. Mandegary <i>et al.</i> , 2004.
α -Felandreno.	Antimicrobiano. Antioxidante. Antiinflamatorio.	Cha <i>et al.</i> , 2007. El-Nekeety <i>et al.</i> , 2011. Dongmo <i>et al.</i> , 2010.

	Proliferativo.	Lin <i>et al.</i> , 2013.
α -Thujeno.	Antimicrobiano.	Guerra-Boone <i>et al.</i> , 2015.
	Antioxidante.	Guerra-Boone <i>et al.</i> , 2015.
	Antiinflamatorio.	Lira <i>et al.</i> , 2007.
m-Cimeno.	Antimicrobiano.	Asbaghian <i>et al.</i> , 2011.
	Antioxidante.	Asbaghian <i>et al.</i> , 2011.
	Antiinflamatorio.	Quintans <i>et al.</i> , 2013.
	Proliferativo.	Kanter <i>et al.</i> , 2003.
Limoneno.	Antimicrobiano.	Torres-Barajas <i>et al.</i> , 2013.
	Antioxidante.	Granados <i>et al.</i> , 2012.
	Antiinflamatorio.	Hirota <i>et al.</i> , 2010.
	Proliferativo.	Crowell <i>et al.</i> , 1994.
(-) – limoneno.	Antimicrobiano.	Torres-Barajas <i>et al.</i> , 2013.
	Antioxidante.	Granados <i>et al.</i> , 2012.
	Antiinflamatorio.	Hirota <i>et al.</i> , 2010.
	Proliferativo.	Crowell <i>et al.</i> , 1994.
(-) - Alcanfor.	Antimicrobiano.	Perea <i>et al.</i> , 2007.
	Antioxidante.	Perea <i>et al.</i> , 2007.
Borneol.	Antimicrobiano.	Cha <i>et al.</i> , 2007.
	Antioxidante.	Raja 2010.
	Antiinflamatorio.	Hajhashemi <i>et al.</i> , 2003.
	Proliferativo.	Dai <i>et al.</i> , 2009.

Actividad antibacteriana.

En el ensayo de actividad antibacteriana el aceite sólo produjo halos de inhibición de diámetro pequeño en las cepas empleadas (figura 4).

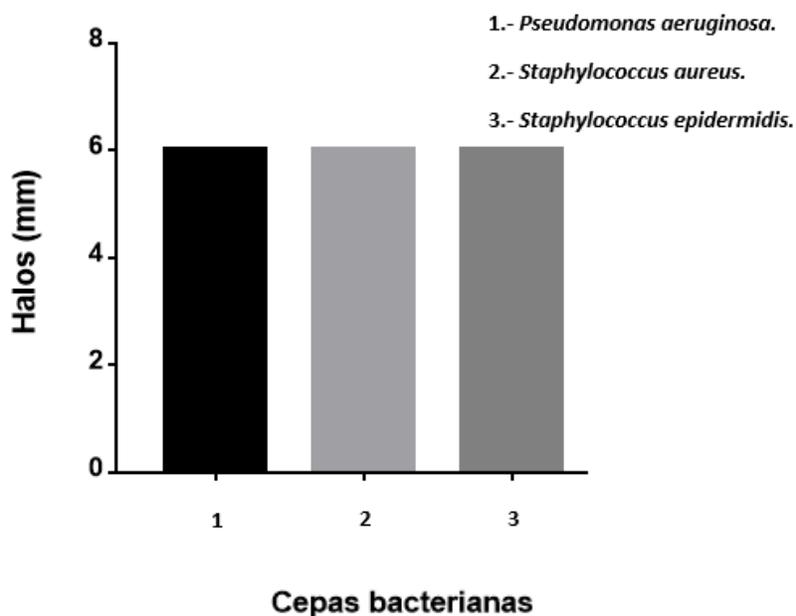
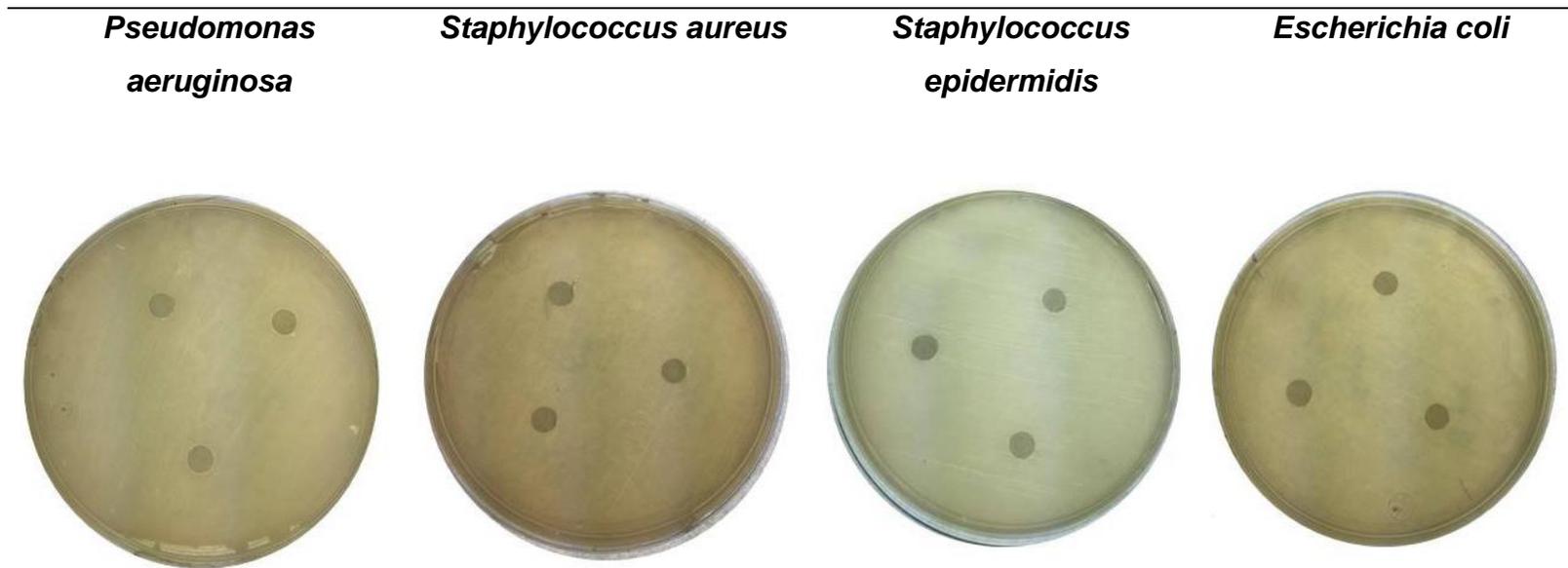


Figura 4. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *B. schlechtendalii*.

Siendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* las cepas que mostraron un halo de 6 mm en los 3 sensidiscos colocados, a comparación de *Escherichia coli* ya que no presentó actividad alguna con el aceite esencial (Cuadro 9).

Cuadro 9. Comparación visual de los halos de inhibición en la actividad antibacteriana.

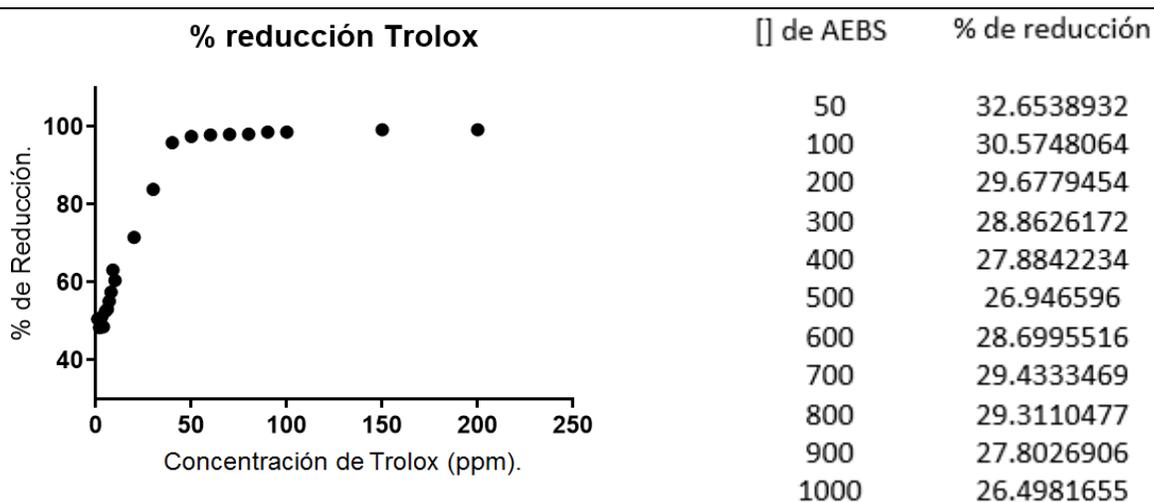


Nota. Todas las bacterias utilizadas en el trabajo fueron sensibles a un antibiótico de amplio espectro en este caso el Cloranfenicol.

Capacidad Antioxidante.

Para los resultados de capacidad antioxidante el aceite mostró una capacidad baja comparada con el compuesto puro, en este caso el Trolox (Cuadro 10). El aceite mostró que a cualquier concentración ya sea 1 o 1000 ppm reducirá un 28.24 ± 0.007 ; mientras que, el Trolox presenta una capacidad antioxidante media a 1 ppm.

Cuadro 10. Comparación de la capacidad antioxidante entre Trolox y aceite esencial.



Velocidad de cierre.

Las heridas de los ratones fueron medidas diariamente con la ayuda de un vernier electrónico. En el cuadro 11 se muestra una comparación de los tratamientos a lo largo del experimento en 3 tiempos diferentes.

Cuadro 11. Comparación de las heridas, fotos tomadas a lo largo del tratamiento.

Tratamientos/Día	1	5	9
Aceite esencial al 100%.			
Recoverón NC.			
Sólo herida.			

Al realizar el tratamiento de datos los resultados fueron los siguientes:

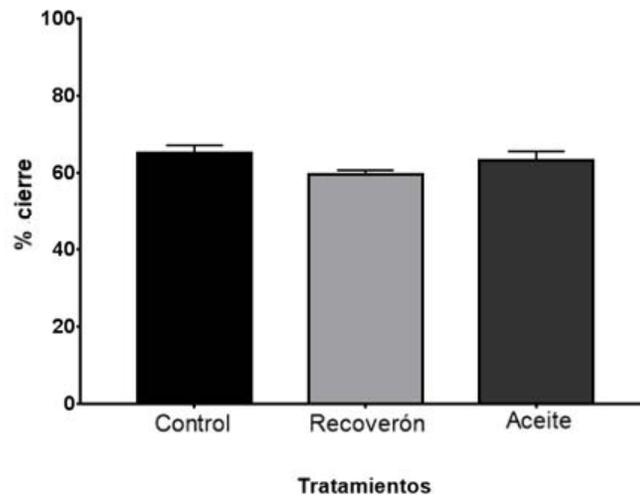


Figura 5. Comparación de velocidad de cierre en los tratamientos.

En este ensayo se permitió la regeneración completa del tejido durante 10 días, se mantuvo en observación macroscópica, en donde no se mostraron diferencias significativas ($P < .05$; $F = 2.052$), entre el aceite esencial, el Recoverón NC (Control positivo) y el tratamiento de sólo herida, aunque el tratamiento de aceite esencial presentó un caso de inflamación exacerbada en el séptimo día del tratamiento; mientras que en los otros 2 grupos no se presentó ningún proceso de inflamación en la herida o en el área circundante.

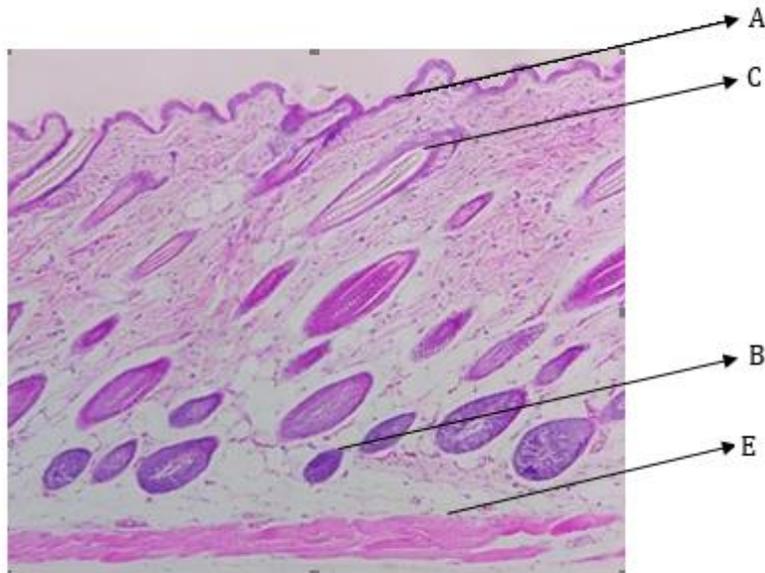
Toxicidad aguda

Debido a los resultados obtenidos en la velocidad de cierre, se dedujo que el aceite esencial de *B. schlechtendalii* en concentraciones altas puede llegar a ser tóxico para los organismos por lo cual se decidió realizar el método de toxicidad para probar diferentes concentraciones (10 y 50%) del aceite para así poder llegar a una dosis adecuada.

Al realizar el experimento los organismos no presentaron ningún síntoma asociado a la toxicidad, por ejemplo: irritabilidad, pasividad, anestesia, salivación, sangrado, diarrea, piloerección, convulsiones y/o muerte. Por último, al realizar la histología de la piel, no mostraron diferencia en la arquitectura celular teniendo un arreglo normal (Cuadro12)

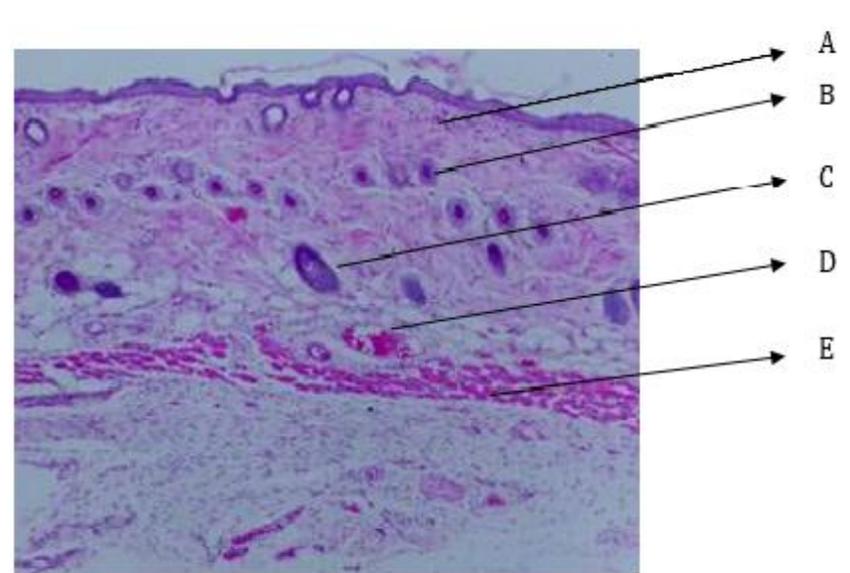
Cuadro 12. Experimento de toxicidad aguda a nivel histológico.

Histología con un arreglo celular normal sin aceite esencial.



10x

Histología con un arreglo celular normal con aceite esencial.



4x

Siendo "A" epidermis, "B" Glándulas, "C" Folículo piloso en desarrollo, "D" eritrocitos y "E" capa muscular.

Para evaluar la eficacia de cierre y evaluar la actividad antiinflamatoria con la concentración adecuada se eligió la concentración al 50% porque es la más acercada al uso etnobotánico que se le da en la Región de San Antonio Nanahuatipam, Oaxaca.

Edema auricular.

En este ensayo se permitió que el Xilol actuara como agente inflamatorio durante una hora, en los tratamientos de Diclofenaco y de Aceite esencial al 50% se colocó primero el Xilol y posteriormente los tratamientos para dejarlos actuar durante 1 hora. Al realizar el tratamiento de los datos y someterlos a un análisis de ANOVA de una vía ($P=0.05$), los resultados fueron los siguientes.

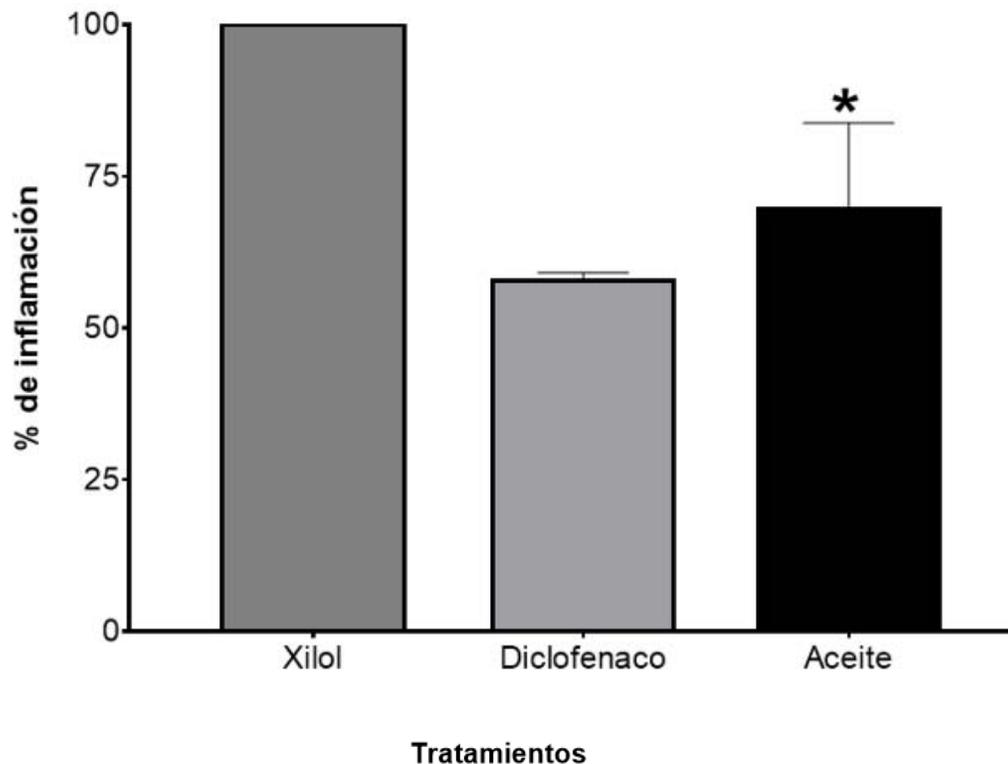


Figura 6. Porcentaje de inflamación en los tratamientos. En la gráfica el asterisco demuestra que el grupo de aceite presentó diferencias significativas contra el grupo de Xilol; ya que, el grupo de aceite desinflamó el 30.28%, tomando como 100% de inflamación el grupo de Xilol; mientras que, con el diclofenaco no presentó diferencias significativas ya que desinflamó 42.23%.

Velocidad de cierre.

Al realizar nuevamente el ensayo, pero con la concentración menor del aceite esencial, en este caso aceite esencial al 50% diluido en aceite mineral, se obtuvieron mejores resultados; ya que, las heridas mostraron un cierre más estético y no presentaron inflamación exacerbada a comparación del aceite al 100% (Cuadro 13).

Cuadro 13. Seguimiento fotográfico del tratamiento de aceite esencial al 50%

Tratamiento	Días		
	1	5	9
Aceite esencial al 50%			
Recuperón NC.			
Sólo herida.			

Al realizar el estadístico Anova de una vía con una $P= 0.05$, los resultados mostraron diferencias significativas entre el aceite y los controles en este caso contra el Recuperón NC y contra el grupo de herida sin tratamiento. Teniendo un 82.56% de

velocidad de cierre del aceite; mientras que, el Recoverón NC y la herida sin tratamiento mostraron tener un comportamiento similar con un $61.0 \pm 0.90\%$ de velocidad (Figura 7).

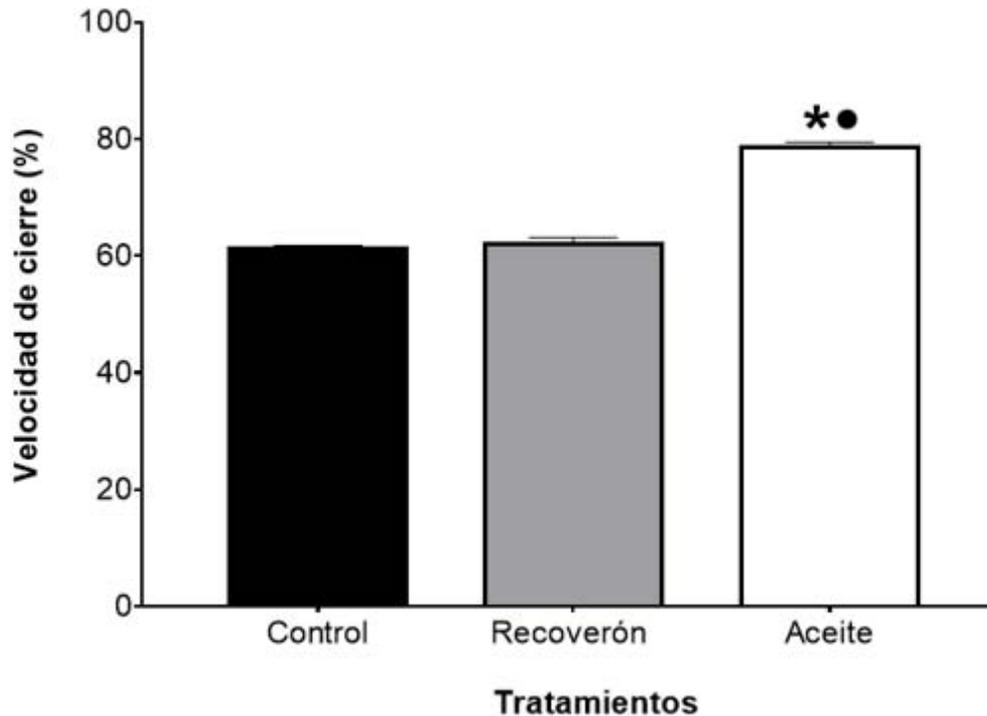


Figura. 7. Comparación de tratamientos en el ensayo de velocidad de cierre. En la gráfica el punto y el asterisco muestran que el grupo de aceite esencial tiene diferencias significativas al compararlo con el grupo control y el Recoverón NC, teniendo una mejor velocidad de cierre llegando al 80% de cierre comparado con el 60% de cierre de los otros 2 grupos de trabajo.

Fuerza de cierre.

Durante los diez días del tratamiento se observó que el tratamiento del aceite esencial tenía un cierre más estético a comparación del control y el Recoverón NC, a la hora de realizar el experimento el aceite y el Recoverón NC tuvieron un comportamiento semejante teniendo que utilizar una fuerza de 510g (5.001 N) en el grupo de aceite y 580g (5.687 N) en el grupo de Recoverón NC; mientras que, para piel con herida y sin tratamiento se utilizó 455g (4.462 N) para abrir la herida.

Aunque los tratamientos no tuvieron diferencias significativas el suministrar aceite o Recoverón NC si favorece a que la herida cierre con una fuerza mayor. Para el análisis estadístico los resultados fueron sometidos a un ANOVA de 1 vía ($P= 0.05$) los cuales se muestran en la figura 8.

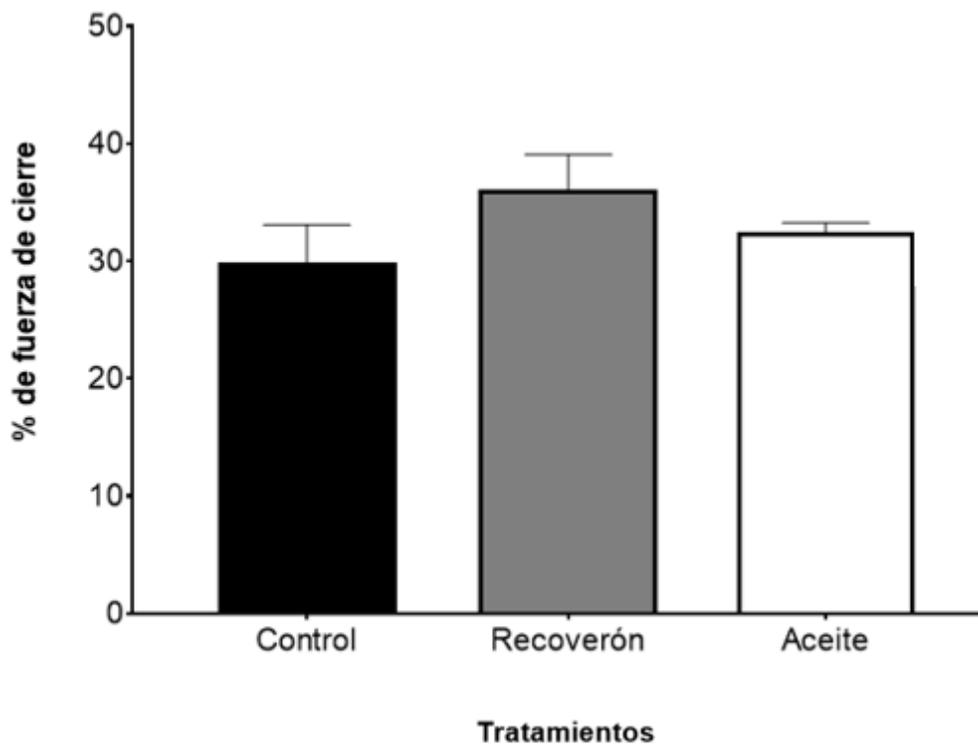


Figura.8. Comparación de tratamientos en fuerza de cierre.

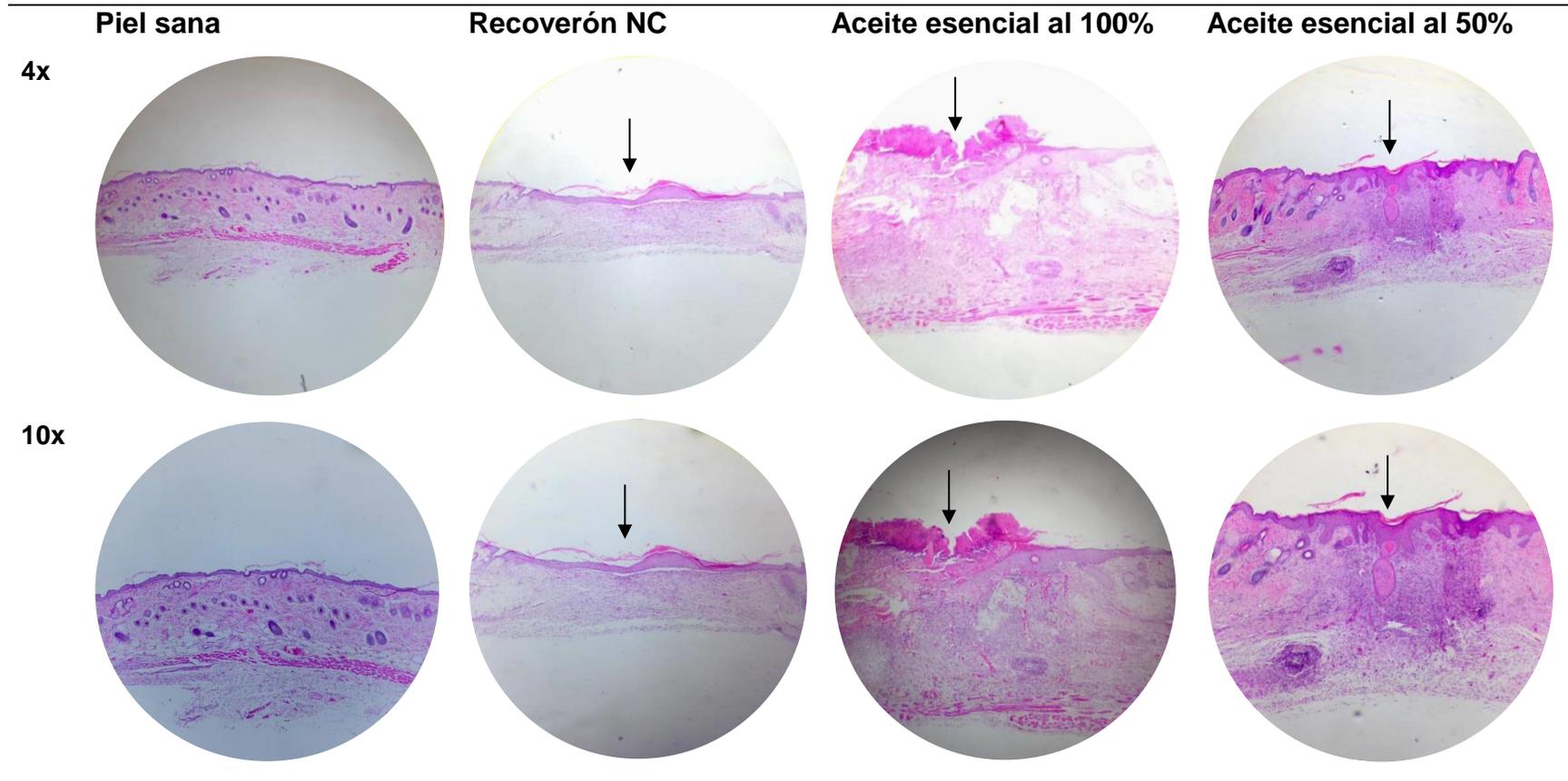
Histología.

Se observaron los cortes de 5 μm para poder analizar los tejidos. Si bien a lo largo del proyecto el aceite esencial se comportó de una manera similar al fármaco y en algunos experimentos destacó con su actividad, en el análisis de los cortes histológicos, la actividad del aceite destacó de una manera notable en comparación de los otros tratamientos.

Como se puede apreciar en el cuadro 14 el área señalada por la flecha es el área de la herida. En las fotografías del tratamiento con Recoverón NC se observa que favorece a la remodelación de la epidermis casi por completo; mientras que, la dermis y la hipodermis siguen sin tener una estructura celular bien definida. El aceite esencial al 100% aceleró el arreglo celular de las 3 capas de la piel, pero se observó la presencia de infiltrado, esto por la aparición de la inflamación exacerbada en el séptimo día del tratamiento.

Por otro lado, el aceite esencial al 50% fue el tratamiento que mostró mejor resultado a nivel histológico; esto porque, favorece a la remodelación de las capas dañadas y el arreglo celular, comparado con el tratamiento Control en el cual no muestra lesión y muestra un arreglo celular normal contando con algunos folículos pilosos, glándulas, células y eritrocitos. Los cuales también se presentan en el tratamiento de aceite esencial al 50%. Cabe mencionar que en este grupo de trabajo no se presentó ningún infiltrado y se obtuvo visiblemente un cierre más estético.

Cuadro 14. Comparación fotográfica de los tratamientos a nivel histológico.



Discusión.

La importancia de este trabajo radica principalmente en que por primera vez se evaluó de forma científica el uso del aceite esencial de *Bursera schlechtendalii* en un modelo de cicatrización, lo cual concuerda de una manera directa al uso etnobotánico que se le da en la región de San Antonio Nanahuatipam Oaxaca, México; ya que, el informante de confianza del grupo de trabajo (Rocío Rosas López) refirió que en esta región se le dan diversos usos a esta especie, los principales son infusiones, ungüentos, aceites, compresas, etc. para aliviar dolores del tracto digestivo y para ayudar a cicatrizar heridas de difícil cierre.

En el presente trabajo se evaluó la actividad antioxidante, se corroboró la actividad antimicrobiana con el trabajo realizado por Espinosa en el 2012, así como una cromatografía de gases acoplada a un espectrometría de masas (CG-EM) para obtener los compuestos que se encuentran en mayor proporción en la muestra del aceite y los cuales pueden ser los responsables de obtener una mayor eficacia de cierre y poderlo observar a nivel macroscópico y microscópico; además, de la fuerza medida en gramos que se necesitó para abrir la herida, se evaluó la toxicidad aguda por vía tópica para saber qué dosis es la adecuada para los organismos, por otra parte se realizaron experimentos de inflamación ya que este proceso, juega un papel muy importante en el proceso de cicatrización. Esto con el fin de validar científicamente su uso etnobotánico.

Por lo cual en este proyecto se dió un sustento científico al uso de las *Burseras* en este caso el uso del aceite esencial de *B. schlechtendalii* como cicatrizante.

Se obtuvo un rendimiento del 0.522% que a comparación de un extracto es un rendimiento bajo, pero comparado con otros aceites esenciales es un rendimiento relativamente bueno (Albado *et al.*, 2001).

Los aceites esenciales son mezclas complejas de líquidos que presentan una alta volatilidad, evaporándose al contacto con el aire a partir de diferentes partes de la planta ya sean flores, yemas, semillas, hojas, ramas, corteza, frutos y raíces (Granados *et al.*, 2014). Los aceites esenciales generalmente son mezclas

complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser, compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos. En la mayoría de los casos tienen un olor agradable, aunque se tiene reportados algunos aceites esenciales que contienen compuestos azufrados que pueden llegar a tener un olor relativamente desagradable (Martínez, 2001).

Una vez obtenido el aceite se realizó la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para saber que compuestos tiene el aceite, se obtuvieron 14 compuestos en mayor proporción, destacando 3 compuestos principales (α -Felandreno con una abundancia del 30.125% en la muestra, (-)-Limoneno con 16.471% y por ultimo β -Pinenos con 11.620%) de los cuales se hizo una búsqueda exhaustiva principalmente de 4 propiedades biológicas necesarias para este proyecto; como anti-inflamatorio, antioxidante, antibacteriano y proliferativo teniendo como resultado α -Felandreno y (-)-Limoneno reportados con las 4 actividades biológicas (Cha *et al.*, 2007, El-Nekeety *et al.*, 2011, Dongmo *et al.*, 2010, Lin *et al.*, 2013, Torres-Barajas *et al.*, 2013, Granados *et al.*, 2012, Hirota *et al.*, 2010 y Crowell *et al.*, 1994); mientras que, β -Pinenos sólo cuenta con 3 actividades las cuales son: antibacteriano, antioxidante y anti-inflamatorio (Leite *et al.*, 2007, El-Nekeety *et al.*, 2011 y Mandegary *et al.*, 2004).

Se realizó la corroboración de datos para la actividad antibacteriana del aceite esencial de *B. schlechtendalii*, para este experimento se utilizaron cepas tanto Gram positivas como Gram negativas dando como resultado halos de diámetro pequeño ante las siguientes especies: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 4). Lo cual concuerda con Espinosa en el 2012.

Realizar la corroboración de la actividad antimicrobiana del aceite es muy importante; ya que, en la comunidad de San Antonio Nanahuatipam se tiene reportado que las personas usan el “juguito” de la planta para ayudar a cicatrizar heridas de difícil cierre. Al presentarse una herida y exponerla al medio sin algún tratamiento es muy arriesgado, porque puede llegar cualquier tipo de microorganismo

patógeno a complicar la lesión. Vilar-Compte *et al.* (1999) muestra la incidencia de patógenos en heridas quirúrgicas en las cuales destacan *E. coli* presentándose un 22.5% de frecuencia, *Pseudomonas spp* con un 13%, *S. aureus* con 9.4%.

Otro motivo por el cual se decidió trabajar con estas cepas bacterianas es por el más reciente aviso de la OMS en febrero del año en curso (2017) en el cual menciona a *Pseudomonas aeruginosa* como principal cepa de importancia médica y *Staphylococcus aureus* con prioridad elevada, las cuales se han vuelto resistentes a la mayoría de los antibióticos (OMS, 2017)

Por otra parte, se realizó la evaluación de la actividad antioxidante por el método de DPPH modificado por Brand-Williams *et al.* (1995), en el cual se obtuvo como resultado que la actividad antioxidante no es dependiente de la concentración que se coloque del aceite; ya que 50 ppm o 1000 ppm del aceite de *B. schlechtendalii* mostró un porcentaje de reducción del 28.24 ± 0.007 ppm. Esto comparado con el Trolox (compuesto puro el cual presentó una capacidad antioxidante media a 1 ppm), es un resultado adecuado en comparación con Granados *et al.* (2014), pues los resultados obtenidos con el aceite esencial de *Myrcianthes leucoxylla* fueron menores al 15% de reducción, mostrando tener una baja capacidad antioxidante y mencionando que, para que una muestra de aceite esencial sea un buen antioxidante debe tener un porcentaje de reducción cercano o mayor a 30, esto por el método de DPPH.

Se sabe que los compuestos que tienen una capacidad antioxidante, como los flavonoides, deben contar con sólo dobles enlaces conjugados (como los presentes en los anillos aromáticos A y B de los flavonoides) y grupos OH en su estructura química (Heim *et al.*, 2002) por lo cual se realizó la búsqueda de los compuestos mayoritarios del aceite esencial y se obtuvo que nueve compuestos tienen doble enlace, uno tiene 3 dobles enlaces conjugados, pero ninguno contiene grupos OH. Es por eso que la actividad antioxidante no es dependiente de la concentración. Granados *et al.*, (2014) menciona que la técnica del radical DPPH muestra resultados bajos, si los compuestos que contiene la muestra son hidrofóbicos por lo cual sugiere realizar la técnica de ABTS

Otra característica importante para este proyecto es la actividad antiinflamatoria, la cual se realizó por el método de Edema auricular inducido por Xilol (CYTED, 1995). Según Villena y Arroyo (2012) mencionan que los flavonoides y triterpenos contribuyen al efecto antiinflamatorio debido a la inhibición de la prostaglandina sintetasa, reduciendo el nivel de prostaglandinas en el proceso inflamatorio. Con los datos del experimento, se realizó el estadístico ANOVA de una vía ($P= 0.05$), en el cual el tratamiento de aceite mostró diferencias significativas con el diclofenaco teniendo un 8.56% de inhibición a comparación del fármaco el cual tuvo un 26.29%; mientras que, el tratamiento de Xilol no mostró diferencias significativas con el aceite esencial, aunque, con el diclofenaco si se presentó. Al realizar la búsqueda bibliográfica de los compuestos mayoritarios obtenidos en la composición química del aceite esencial de *B. schlechtendalii*, sólo se identificaron monoterpenos y diterpenos. No se descarta la posibilidad de tener un compuesto triterpénico con baja abundancia en la composición química y posiblemente la poca actividad antiinflamatoria pueda estar relacionado con esto y la actividad sinérgica de los compuestos del aceite.

Teniendo antecedentes posiblemente favorables para la cicatrización, se evaluó la eficacia de cicatrización del aceite esencial de *B. schlechtendalii*. La eficacia de cicatrización está conformada por dos partes, velocidad de cierre y fuerza de cierre. Para la velocidad de cierre se realizó con un seguimiento diario en el cual se aplicó los tratamientos correspondientes a los organismos elegidos al azar (Cuadro 4). Se midieron con un vernier digital las heridas realizadas con el Biopsy punch.

El aceite esencial al 100% mostró una velocidad cicatrizante semejante a la obtenida por el Recoverón NC (Figura 5) aunque en el séptimo día del tratamiento los organismos tratados con el aceite presentaron un proceso de inflamación exacerbada; mientras que, en los otros 2 grupos no se presentó ningún proceso de inflamación en la herida o en el área circundante. Al realizar el tratamiento de datos arrojados y aplicarles estadístico ANOVA de una vía, los tratamientos no tuvieron diferencias significativas, aunque el tratamiento de aceite tuvo una pequeña inclinación a ser mejor que el Recoverón NC. Por lo cual, se decidió evaluar la

toxicidad aguda en los ratones para así encontrar una dosis adecuada que siga teniendo sus propiedades cicatrizantes, pero que, a la vez, no sea tóxico para el organismo.

La evaluación de toxicidad aguda se realizó con base a Mulisa *et al.*, (2015) donde se sometieron grupos de cinco ratones (Cuadro 2) a dos concentraciones del aceite esencial. Se comparó aceite esencial diluido al 10% y al 50% utilizando aceite mineral como vehículo, al realizar el experimento ninguna de las dos concentraciones tuvo efecto; debido a que, no presentaron ningún síntoma asociado a toxicidad tales como: irritabilidad, pasividad, anestesia, salivación, sangrado, diarrea, piloerección, convulsiones y/o muerte. Por otro lado, las muestras de hígado obtenidas de los ratones de los tratamientos no mostraron diferencias en el peso al compararlas con hígados de ratones sanos.

La toxicidad aguda ya sea oral o por absorción dérmica de la sustancia de prueba, tiene por objeto determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia. Usualmente, el punto final del estudio es la muerte del animal, aunque es muy importante la aparición de síntomas o manifestaciones que indiquen daño a la salud del animal de estudio, así como las variaciones de peso de los mismos. El peso de los animales en un estudio de toxicidad es una importancia vital, una variación significativa en este indicador sugiere un posible daño orgánico (López *et al.*, 2014). Por lo tanto, el aceite esencial de *B. schlechtendalii* no mostró ser tóxico a las concentraciones antes mencionadas. Para la continuidad de este trabajo se decidió utilizar la relación del aceite esencial diluido al 50% con aceite mineral, esta decisión fue tomada con base al uso etnobotánico que se le da en la Región de San Antonio Nanahuatipam, Oaxaca, México.

Con base a los resultados de toxicidad se realizó una vez más la eficacia de cicatrización con la diferencia en el grupo de aceite esencial; ya que, en este experimento sólo se utilizó aceite al 50%, el cual mostró una velocidad de cierre mayor a la del Recoverón NC (Figura. 7). Obteniendo diferencias significativas entre los tratamientos, teniendo al aceite esencial al 50% como el mejor tratamiento para la velocidad de cierre.

La fuerza cicatrizante del aceite esencial de *B. schlechtendalii* se evaluó por el método tensiométrico (modificado por el laboratorio de Inmuniobiología) esto para determinar la fuerza en gramos necesaria para abrir la herida de todos los grupos experimentales (Cuadro 5). En los 3 tratamientos comparados con el control de piel sana se necesitó menor fuerza medida en gramos para abrir la herida, se presentó un porcentaje de eficacia de 29% (piel con herida), 33% (tratamiento de aceite esencial) y 37% (tratamiento de Recoverón NC). Al realizar el análisis estadístico de los datos se obtuvo que los tratamientos no muestran diferencias significativas entre sí. Mulisa (2015), señala que para favorecer la fuerza de cicatrización es mejor llevar acabo contracción en la herida; ya que, al unir los 2 extremos hacia el centro disminuye el área de la herida facilitando la cicatrización, ésto dado por las actividades biológicas de los compuestos como antiinflamatoria y antioxidante, lo cual concuerda con las actividades biológicas de los 3 compuestos principales del aceite de *Bursera schlechtendalii*.

Con respecto al análisis histológico, el Recoverón NC se tiene reportado por National Center for Biotechnology Information en el 2005 que este farmaco favorece a la proliferación de fibroblastos y la disposición de las fibras de colágena dentro del mismo proceso biológico natural, pero de manera ordenada. Con los datos observados durante la histología se puede deducir que el Recoverón NC también favorece a la proliferación de queratinocitos los cuales sufren un cambio notable, migran a la herida, liberan proteínas y enzimas que facilitan su migración y finalmente reconstituyen la epidermis y la membrana basal dañada (Zavala *et al.*, 2009). En el registro fotográfico se puede apreciar que la epidermis esta reconstruida casi a su totalidad, pero la arquitectura de la dermis e hipodermis no se encuentran regeneradas (Cuadro 14).

El aceite esencial al 100% sí favorece el proceso de cicatrización hasta el proceso de angiogénesis; ya que, en los cortes se muestra una gran cantidad de eritrocitos, y migración celular, aunque cabe mencionar que en estos cortes se aprecian agentes infiltrados de gran tamaño por la inflamación presentada en el séptimo día del tratamiento

Los dos tratamientos de aceite esencial (100% y 50%) favorecen a la proliferación de fibroblastos y de queratinocitos actuando de una manera similar que el fármaco en uso. Aunque el aceite esencial de *B. schlechtendalii* a concentración del 50% favorece a la remodelación de la arquitectura de las tres capas de la piel y sin ningún infiltrado, cabe mencionar que a esta concentración ya se logran apreciar nuevas células, glándulas y folículos pilosos en los cortes histológicos. Lo antes mencionado, concuerda con Djemaa *et al.* (2016), quienes mencionan que se genera una regeneración epitelial más avanzada de las estructuras cutáneas cicatrizadas en los grupos experimentales a comparación de los controles.

Si bien el tratamiento de aceite esencial al 50% no tuvo diferencias significativas en los ensayos antibacterianos, antiinflamatorios y fuerza de cierre, mostró tener un comportamiento semejante al Recoverón NC en velocidad de cierre y en la histología mostró tener una mejor arquitectura en las capas de piel, por lo cual se pudo observar que el aceite esencial al 50% favorece al proceso de cicatrización de una forma más eficaz que el Recoverón NC.

CONCLUSIONES.

- El aceite esencial de *B. schlechtendalii* inhibe el crecimiento de bacterias.
- El aceite esencial de *B. schlechtendalii* presentó actividad antioxidante.
- El aceite esencial de *B. schlechtendalii* al 50% no es tóxico.
- El aceite esencial de *B. schlechtendalii* al 50% presentó poca actividad antiinflamatoria.
- El aceite esencial de *B. schlechtendalii* al 50% actúa de una manera semejante al Recoverón NC en la eficacia de cicatrización.
- En el proceso de histología el aceite esencial de *B. schlechtendalii* al 50% mostró una mejor arquitectura en las capas de la piel.
- El aceite esencial de *B. schlechtendalii* al 50% y al 100% favorece al proceso de cicatrización.

Apéndice 1. Datos generales de *B. schlechtendalii*.

El género *Bursera* es muy diverso y característico de la flora tropical mexicana, pero su conocimiento es incompleto, pues además de su sistemática complicada no se conoce bien la distribución de algunas de las especies (Rzedowski *et al.*, 2005).

México rebasa la cifra de 100 especies del género *Bursera*, actualmente se cuenta con registros en casi todos los estados a excepción de Tlaxcala. Los árboles de *Bursera* son abundantes e incluso dominantes en los bosques tropicales secos de México. Destacando tanto por el número de especies como por su abundancia, sobre todo en la vertiente del Pacífico y en la Cuenca del Balsas, donde se presentan unas 80 especies (Rzedowski y Kruse, 1979). Su distribución está estrechamente relacionada con la selva baja caducifolia (Miranda y Hernández, 1963) o bosque tropical caducifolio (Rzedowski y Huerta, 1978), cabe mencionar que es el bosque tropical seco de mayor extensión en México. Se ha vinculado la distribución y diversificación del género a la expansión del bosque tropical seco en el territorio nacional (Becerra, 2005).

El género *Bursera* cuenta con 120 especies descritas y aceptadas, de las cuales aproximadamente 100 se encuentra distribuidas exclusivamente en el continente americano (Biodiversidad, 1996) en las cuales destaca *B. schlechtendalii*, debido a que, es común en la Cuenca del Balsas y sobre todo en el estado de Oaxaca; en otras partes su papel es cuantitativamente mucho menos importante. Se localiza en los estados de Coahuila, Tamaulipas, Zacatecas, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Jalisco, Colima, Morelia, Puebla, Veracruz Guerrero, Oaxaca, Chiapas y Yucatán (Figura 9)

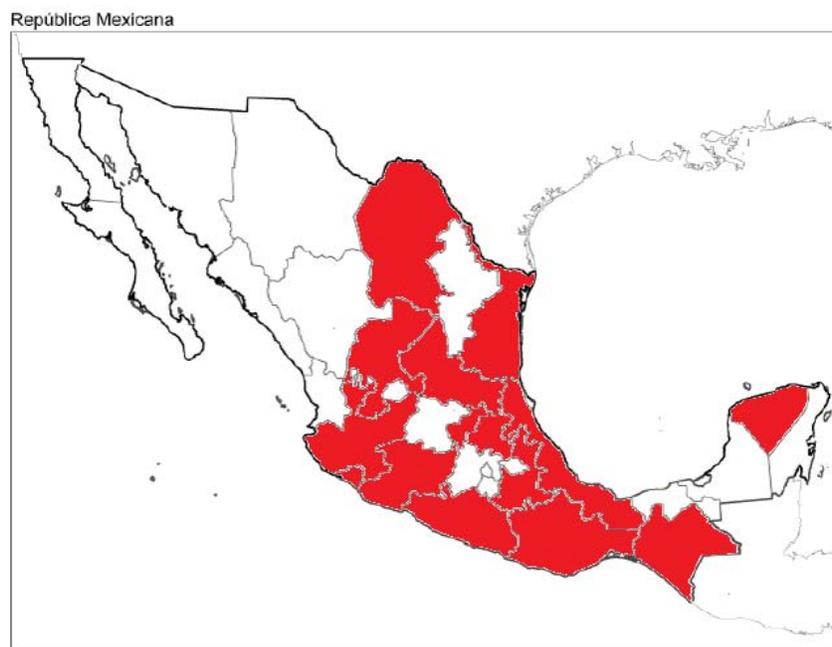


Figura 9. Distribución geográfica de *B. schlechtendalii* en el territorio nacional (Imagen obtenida de Google.com)

B. schlechtendalii es un arbusto o a veces árbol, dioico (es decir que las flores masculinas y femeninas son producidas por individuos diferentes y se desarrollan previa y simultáneamente a las nuevas hojas) (Biodiversidad, 1996) aunque se ha reportado que en algunos casos *B. schlechtendalii* puede ser hermafrodita, su tamaño va desde 0.5 hasta los 10 metros de alto, cuenta con un contenido abundante de resina aceitosa de olor fuerte en la corteza y las partes verdes, el diámetro del tronco es variable entre 20 y 30 cm, la corteza es de color rojo o rojo oscuro (Figura 10).

Forma parte de algunos matorrales xerófilos y del bosque tropical caducifolio de la parte central y nororiental, se le encuentra comúnmente en laderas empinadas de cerros calizos o de cerros constituidos por lutitas, se encuentra en lugares con una altitud que va de 600 a 1500 metros, aunque se ha reportado en una altitud máxima de 2000 metros. Todas las especies del género *Bursera* pierden sus hojas en la época seca del año y florecen al final de la misma. *B. schlechtendalii* florece en los

meses de marzo a junio y permanece solo con follaje de mayo a noviembre (Rzedowski y Guevara-Féfer, 1992).



Figura 10. *B. schlechtendalii* con fruto (Foto tomada en agosto, 2016 en el lugar de colecta).

Apéndice 2. Datos generales de San Antonio Nanahuatipam.

Según el INEGI en el año 2005 se tenía reportada una población de 1,298 habitantes. La población total del municipio representa el 0.04% con relación a la población total del estado (Oaxaca), la comunidad se encuentra con una mayor presencia de mujeres (717) en relación con los hombres (581) de acuerdo a los resultados que fueron presentados por el segundo Censo de Población y Vivienda en el 2005 (INEGI, 2005). Dentro del municipio, menos del 5 por ciento de la población habla una lengua ajena al español y dentro de este pequeño porcentaje la lengua nativa más común es el mazateco. Para la flora cuenta con extensiones de terrenos del municipio que se encuentran cubiertas por arbustos, árboles pequeños, mezquites, pochotes, cucharitos, uña de gato, verdolagas, etc. En el cuadro 15 se mencionan las plantas utilizadas en la comunidad.

Cuadro 15. Flora utilizada en la comunidad de San Antonio Nanahuatipam.

Flores	Plantas comestibles	Árboles	Frutos	Plantas medicinales	Plantas exóticas
Bugambilias, paragüitas, huele de noche, rosas, girasoles, lirios en los ríos, etc.	Pepinos, chile verde, melones, sandías, chayotes, tomate de cascara, jitomates, berros, alfalfa, calabaza y cachimba, cacayas, rabo de león, etc.	Guamúchil, huizaches, palo de agua, sauce, cuahulotes, mezquites, pochotes, árbol del pipe, guajes	Mangos, chicozapotes, cocos, limones, cactus, biznagas, nopales, guayabas, plátanos, perón.	Cola de iguana o de caballo, árnica, albahaca, ruda, peonia, uña de gato, hierba del sapo, etc.	Chille de perro, mala mujer, cocos enanos, etc.

La fauna de la comunidad está basada en 8 grupos principalmente: aves silvestres, animales salvajes, insectos, especies acuáticas, reptiles, animales domésticos, ganado y especies extrañas (se les denomina extrañas porque es muy difícil encontrarlas, pero aún se cuentan con registros de organismos presentes en la zona) (INAFED, 2010).

Topografía

Esta localidad cuenta con la presencia de cerros como el cerro Prieto, cerro Colorado, cerro Ceniza y cerro Tepesezongan, aunque no son tan elevados,

resultan representativos para la comunidad ya que por sus características presentan recursos naturales con posibilidad de explotación (Moreno-Bautista, 2008).

Hidrología.

El municipio de San Antonio Nanahuatipam pertenece al área hidrológica de la cuenca del Papaloapan clave RH28 y su ubicación con respecto a la región administrativa es al noroeste de la cuenca. El municipio pertenece a la sub cuenca del Río Grande o Santo Domingo. La microcuenca se encuentra establecida por el río Salado y el río Calapa. Esta es determinante en la producción agrícola ya que del río Salado se adquiere la mayor parte del agua para riego

Existen también 3 manantiales del cual en uno se toma el agua para riego, el manantial de más importancia es conocido como Ameyal y otro de igual importancia es el que se encuentra al este del municipio en las Salinas (Moreno-Bautista, 2008).

Apéndice 3. Histología de la piel.

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, que se encarga de recubrir y proteger órganos y tejidos del cuerpo, y cuya falta implica una riesgosa exposición a factores del ambiente externo que pueden producir daños al organismo (Hidalgo, 2010). Una piel sana posee un espesor de 2.2 mm y en un individuo promedio ocupa el 6% del peso corporal total (Arenas, 2015). En cuanto a su composición química, el 70% es agua; minerales como sodio, potasio, calcio, magnesio y cloro; carbohidratos como glucosa, lípidos, principalmente colesterol y proteínas como colágeno y queratina (Arenas, 2015). Se distinguen tres capas principales: epidermis, dermis e hipodermis o tejido subcutáneo.

Epidermis.

La epidermis es un epitelio plano estratificado queratinizado (Arenas, 2015), es la capa más superficial y se encuentra constituida por dos grupos de células: queratinocitos o células no dendríticas y células dendríticas (Navarrete, 2003).

Los queratinocitos a su vez se organizan en capas o estratos que, de la más superficial hacia adentro son:

- Estrato córneo
- Estrato lúcido
- Estrato granuloso
- Estrato espinoso
- Estrato basal o germinativo

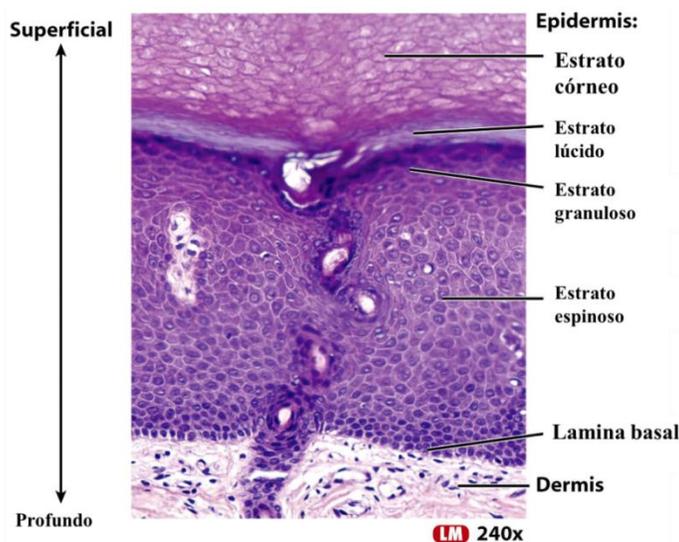
El estrato córneo está formado por células muertas aplanadas y sin núcleo, que contienen una proteína fibrilar, la queratina (Arenas, 2015). Por lo que con los colorantes de rutina (hematoxilina y eosina) se tiñe únicamente por la eosina. Su grosor varía de acuerdo al sitio anatómico, en las zonas como palmas y plantas es mayor.

El estrato lúcido es una línea intensamente eosinófila ubicada por debajo de la capa córnea y sólo se le identifica en piel muy gruesa; está formada por eleidina (Arenas, 2015; Navarrete, 2003).

El estrato granuloso está formado por células romboidales que tienen gránulos de queratohialina (precursor de la queratina), mismos que le dan su nombre y que se tiñen intensamente con la hematoxilina (Navarrete, 2003).

El estrato espinoso, lo constituyen células poligonales que poseen puentes intercelulares o desmosomas. El número de estas células también varía dependiendo de la región corporal de que se trate, en general es de cinco a siete hileras. Se tiñen pálidamente con la hematoxilina (Navarrete, 2003).

El estrato basal o germinativo, está formada por células cilíndricas que se disponen generalmente en una hilera, se tiñen intensamente con la hematoxilina. En el estrato basal se encuentra la melanina, pigmento normal de la piel, cuya cantidad varía de acuerdo al tipo de piel de cada individuo (Navarrete, 2003).



Microfotografía de una porción de piel humana

Figura 11. Microfotografía de piel. Imagen obtenida de Google, 2016.

Dermis.

La dermis está situada por debajo de la epidermis y está constituida por tejido conectivo, sustancia fundamental y células. El tejido conectivo a su vez está formado por tres tipos de fibras: colágenas, elásticas y reticulares. Las fibras colágenas son las más numerosas, la disposición y el grosor de las mismas, varía de acuerdo al nivel en que se encuentran: en la dermis superficial o papilar son fibras delgadas, a diferencia de la dermis media y profunda, donde son más gruesas y se disponen en haces casi paralelos a la superficie de la epidermis (Navarrete, 2003).

Las fibras elásticas se observan con tinciones especiales de orceína o resorcina-fuccina, son fibras delgadas de 1 a 3 micras de diámetro, el grosor al igual que el de la colágena y varía de acuerdo al nivel en que se encuentran: delgadas en dermis superficial y gruesas en dermis profunda. En la dermis papilar configuran un plexo: son las fibras de elastina y de oxitalán (Navarrete, 2003).

Las fibras reticulares también requieren de tinciones especiales para su observación. Miden de 0.2-1 micra de diámetro, son un tipo especial de fibra colágena de tipo III (Navarrete, 2003).

La sustancia fundamental de la dermis contiene glucosaminoglicanos o mucopolisacáridos ácidos (Arenas, 2015).

Hipodermis.

La hipodermis, llamada también panículo adiposo o tejido celular subcutáneo, está constituido por células grasas, que se conocen con el nombre de adipocitos, los cuales se disponen en lóbulos separados por tejido conectivo llamados septos o tabiques interlobulillares (Navarrete, 2003).

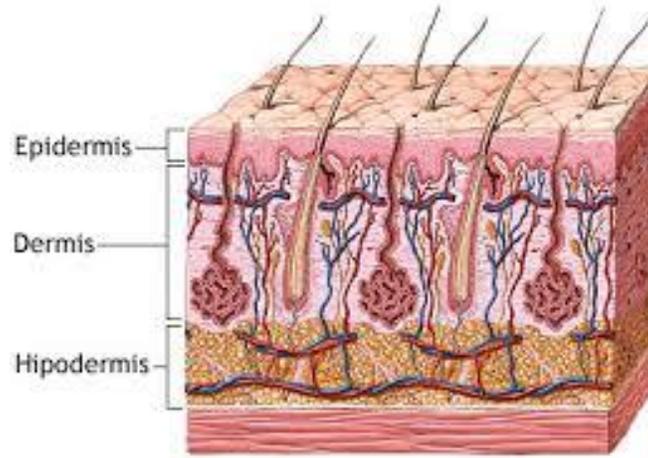


Figura 12. Capas de la piel. Imagen obtenida de Google 2016.

Apéndice 4. Terpenos.

Los terpenos son un amplio grupo de compuestos que se caracterizan por estar formados por la unión de unidades pentacarbonadas ramificadas relacionadas con el 2-metil-1,3-butadieno (isopreno). Según formen parte de su esqueleto hidrocarbonado, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 8 unidades pentacarbonadas (C₅), los terpenos se clasifican en hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos y tetraterpenos, respectivamente (Bruneton, 2001) (Cuadro 16).

Estos compuestos derivan biogenéticamente del ácido mevalónico (Figura 13), el cual, mediante una serie de reacciones orgánicas clásicas catalizadas por enzimas, va a dar lugar a los precursores de los principales tipos de terpenos (Bruneton, 2001).

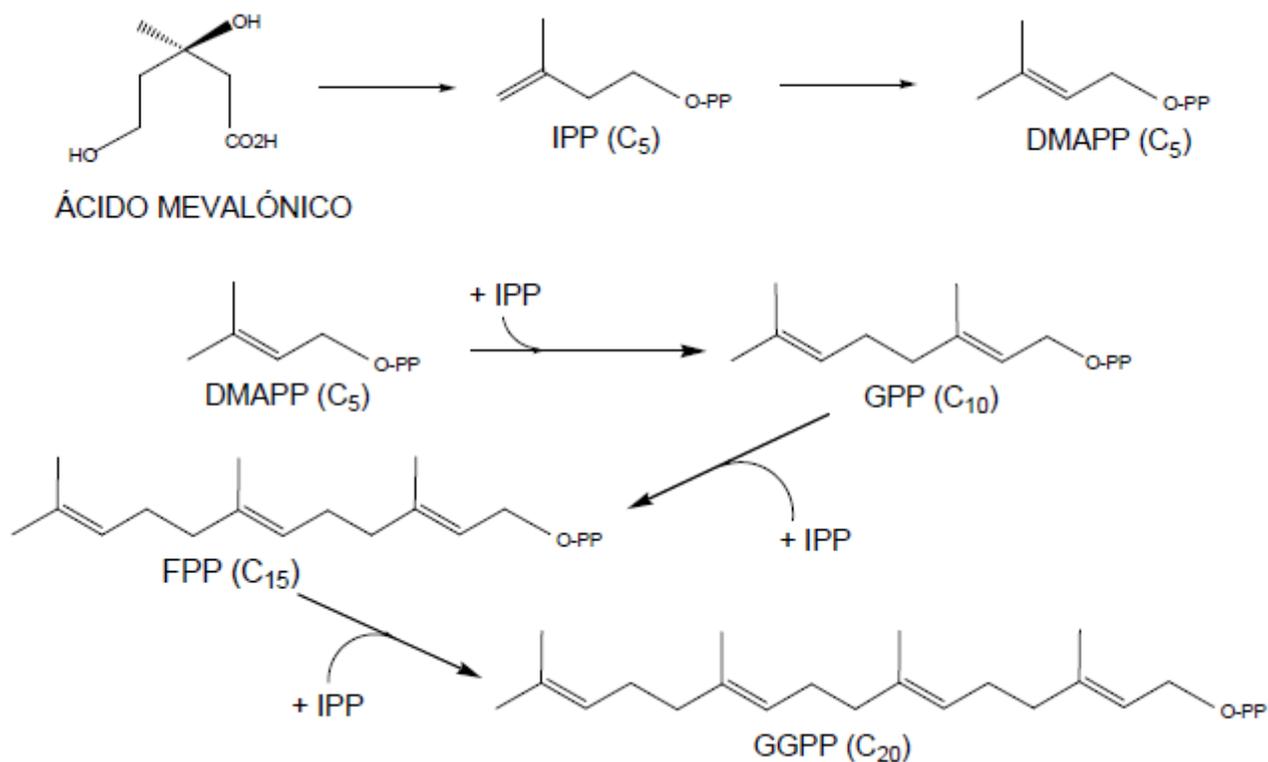
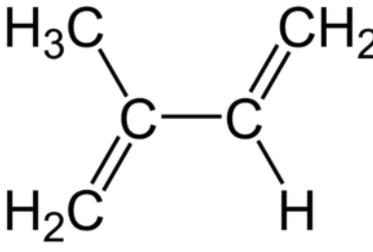
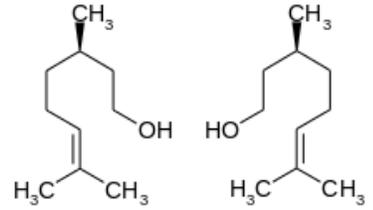
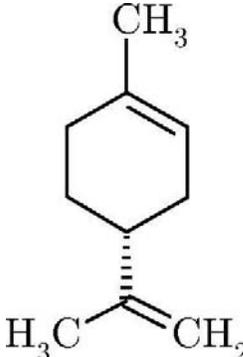
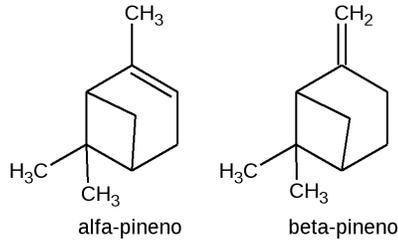


Figura 13. Formación de los precursores de terpenos.

Cuadro 16. Clasificación de Terpenos.

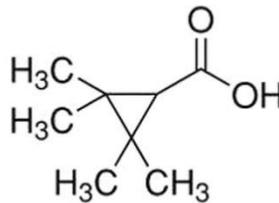
Nombre	Número de carbonos	Ejemplo.	Función
Hemiterpenos	5 carbonos	 <p>Isopreno</p>	Actividad antioxidante, protector del tejido vegetal y controlador del dióxido de carbono en la fotosíntesis.
Monoterpenos	10 carbonos	<p>Monoterpenos regulares acíclicos:</p>  <p>Citronelol.</p> <p>Monoterpenos regulares monocíclicos:</p>  <p>Limoneno.</p> <p>Monoterpenos regulares bicíclicos:</p>	Aromas y esencias en plantas.

Iridoides o acíclicos).



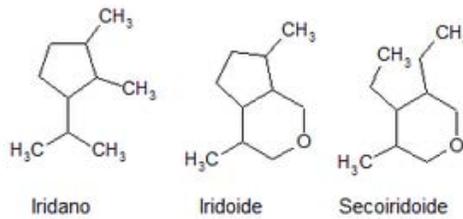
α pineno y β pineno.

Monoterpenos irregulares acíclicos:



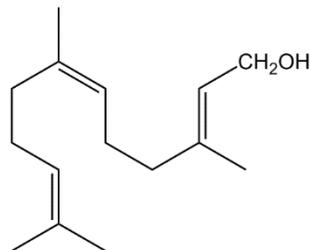
Ácido crisantémico.

Monoterpenos irregulares Iridoides:



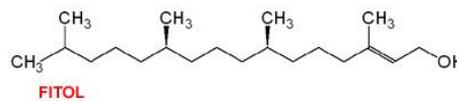
Iridano, Iridoide y Secoiridoide

Sesquiterpenos 15 carbonos



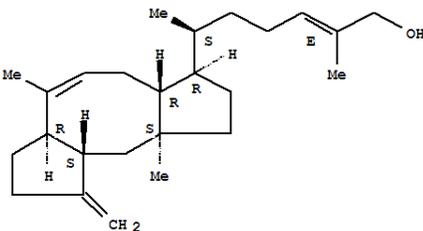
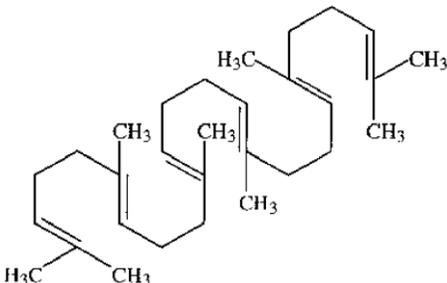
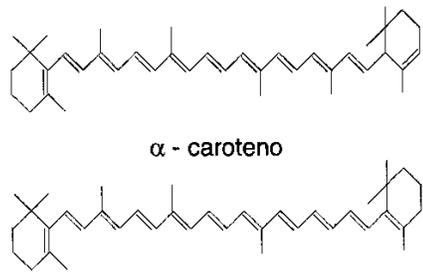
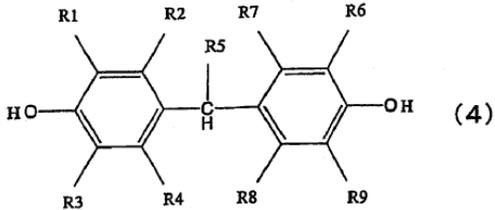
Intermediario en la síntesis de colesterol.

Diterpenos 20 carbonos



Fitol.

Forman pigmentos y vitaminas.

Sesterterpenos	25 carbonos	 <p>Ceroplastol.</p>	Protección de la desecación.
Triterpenos	30 carbonos	 <p>Escualeno.</p>	Origena esteroides.
Tetraterpenos	40 carbonos	 <p>α - caroteno</p> <p>β - caroteno</p> <p>α caroteno y β caroteno.</p>	Pigmentos vegetales.
Politerpenos	N	 <p>(4)</p> <p>Latex.</p>	Aislantes.

Apéndice 5. Estudios realizados acerca del género *Bursera*.

Especie	Parte utilizada	Estudio	Bibliografía
<i>B. aloexylon</i>	Hojas	Actividad antimicrobiana.	Queiroga <i>et al.</i> , 2007
<i>B. fagaroides</i>	Corteza de tallo	Actividad <i>in vitro</i> sobre <i>Entamoeba histolítica</i>	Rosas-Arreguín <i>et al.</i> , 2008
<i>B. microphylla</i>	Hojas, tallos y semillas.	Relación de terpenos: morfología y distribución.	Mooney y Emboden, 1968.
<i>B. simaruba</i>	Corteza	Actividad antibacterial.	Camporese <i>et al.</i> , 2003
<i>B. simaruba</i>	Hojas	Actividad anti-inflamatoria.	Noguera <i>et al.</i> , 2004.
<i>B. simaruba</i>	Hojas, tallo y ramillas	Actividad antibacterial.	Yasunaka <i>et al.</i> , 2005
<i>B. simaruba</i>	Corteza	Compuestos fenólicos.	Maldini <i>et al.</i> , 2009
<i>B. tonkinensis</i>	Raíces	Componentes bioactivos.	Jutiviboonsuk <i>et al.</i> , 2005
<i>B. aptera.</i>	Semillas y plántula	Morfología de plántulas y sus implicaciones filogenéticas	Hernández y Organista, 2002
<i>B. schlechtendalii</i>			
<i>B. morelensis.</i>			
<i>B. longipes.</i>			
<i>B. grandifolia.</i>			
<i>B. bicolor.</i>			
<i>B. submoniliformis.</i>			
<i>B. capollifera.</i>			
<i>B. glabrifolia.</i>			

<i>B. morelensis</i>	Ramillas	Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial.	López, 2011.
<i>B. schlechtendalii.</i>	Ramas	Comparación química y actividad antimicrobiana del aceite esencial.	Espinosa, 2012
<i>B. morelensis</i>	Corteza	Efecto cicatrizante.	Serrano, 2013
<i>B. microphylla</i>	Resina	Actividad citotóxica.	Messina <i>et al.</i> , 2015
<i>B. graveolens</i>	Aceite esencial	Composición química y actividades anti-proliferativas.	Monzote <i>et al.</i> , 2012
<i>B. simaruba</i>	Aceite esencial (hojas y ramillas).	Composición química.	Setzer, 2014
<i>B. morelensis</i>	Corteza	Efecto cicatrizante	Serrano-Parrales <i>et al.</i> , 2012
<i>B. grabrifolia.</i> <i>B. morelensis.</i>	Corteza	Efecto cicatrizante.	López, 2016

Otros usos durante la época prehispánica fue principalmente el de la resina ya que fue una práctica ampliamente difundida en el México antiguo, como lo demuestran las impresionantes ofrendas de copal rescatadas del Cenote Sagrado de Chichen Itzá, antigua ciudad Maya en Yucatán, y de la laguna de la Luna, en el Nevado de Toluca en el Estado de México, así como las esculturas de esta resina encontradas en el Templo Mayor de Tenochtitlán en la ciudad de México (Biodiversidad, 1996).

Las cualidades de los copales fueron conocidas y aprovechadas ampliamente por las culturas prehispánicas para usos rituales, ceremoniales, festivos, terapéuticos, medicinales y como aglutinante. Su relevancia logró sobrevivir a la propia Inquisición, utilizándose hasta nuestros días entre numerosos pueblos indígenas y mestizos. Su vigorosa vigencia se refleja en el hecho de que cada lengua y variante que se habla en el país cuenta con una palabra para referirse al copal en alguna de sus formas: árbol, resina o humo, siendo *copalli* en náhuatl y *poom* en lenguas mayenses, las más representativas por su amplia distribución (Biodiversidad, 1996).

Apéndice 6. Aceites esenciales (Figura 14).

Son productos obtenidos a partir de una materia prima vegetal, por arrastre con vapor, por procedimientos mecánicos a partir del epicarpio de los *Citrus*, o bien por destilación seca (AFNOR, 1998).

Químicamente están formados principalmente por terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos (hidrocarburos, alcoholes, cetonas, etc. que pueden ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos...), en ocasiones llevan también derivados del fenil propano y, raramente cumarinas.

Entre las principales acciones debidas a la presencia de aceites esenciales cabe destacar: antiséptica, antiespasmódica, expectorante, carminativa, eupéptica, etc. Es preciso tener en cuenta que algunos aceites esenciales, sobre todo a dosis elevadas, son tóxicos, principalmente a nivel del sistema nervioso central. Algunos pueden presentar problemas tópicos, irritación o alergias. Además de sus aplicaciones en terapéutica, los aceites esenciales presentan un gran interés industrial, utilizándose en la industria farmacéutica, en alimentación y sobre todo en perfumería



Figura 14. Representación de aceites esenciales. Imagen obtenida de Google.
2016.

Apéndice 7. Método de Hidrodestilación (Figura 15).

El aceite se obtendrá a partir del material fresco; este método utiliza una de las características de los aceites esenciales que es el presentar bajas presiones de vapor y por lo tanto no pueden ser arrastradas por sustancias que poseen presiones de vapor más altas. Se puede destilar por hidrodestilación continua de 100 a 500g de planta fresca.



Figura 15. Extracción del aceite esencial (Foto tomada en agosto, 2016).

A continuación, el material biológico se deposita en un matraz de fondo redondo de 500 mL. EL matraz de coloca en una mantilla de calentamiento eléctrica. Se monta el sistema de refrigeración. Se espera a que hierva ligeramente y se recolecta el aceite esencial.

Apéndice 8 Composición química del aceite esencial.

El análisis del aceite esencial de *B. schlechtendalii* mediante la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se realizó en un cromatógrafo modelo 6850 acoplado a un espectrómetro de masas modelo 5975C, marca Agilent Technologies (los dos aparatos hechos en China) (Figura 16), con una columna de 30 metros de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y de película de 0.25 μm , el tipo de inyección fue *Split* y la cantidad de muestra empleada fue de 0.5 μL . Las condiciones de separación fueron la temperatura inicial de 70°C durante 2 minutos aumentando con 2 rampas de calentamiento, la primera a 20°C por minuto hasta los 230°C; y la segunda, aumentando a 8°C por minuto hasta los 280°C y se mantuvo así durante 5 minutos, el gas de acarreo fue He. El flujo en la columna fue de 1mL/min, con una presión de 61.85 Kpa (8.77psi) y una velocidad lineal de 30 cm/s (Espinosa, 2012).



Figura 16. Cromatógrafo modelo 6850 y espectrómetro de masas modelo 5975C (Foto tomada en octubre, 2016).

Apéndice 9. Método de difusión en agar de Kirby-Baüer.

Ésta técnica se emplea para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana, de un aceite esencial o 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 será proporcional a la potencia de la sustancia frente al microorganismo.

Para el ensayo con bacterias se emplea medio de cultivo Müeller-Hinton ya que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos. Se debe dejar incubar las cajas durante 24 horas previas a realizar la prueba de susceptibilidad para verificar la ausencia de contaminación del agar.

Con un asa de siembra se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias y se sumerge en 10 mL de caldo Müeller-Hinton para el ensayo en bacterias, 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 24 horas.

Posteriormente se sumerge un hisopo estéril y seco en la suspensión de bacterias, antes de retirarlo se elimina el exceso de líquido, con este hisopo se inocula la superficie de una placa con agar de Müller-Hinton a temperatura ambiente. Finalmente, se siembra por estría en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa.

Preparación de sensidiscos

Se emplearon sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman del N° 5, posteriormente se aplica la sustancia a evaluar en la prueba de susceptibilidad en este caso aceite esencial de *Bursera schlechtendalii*. Se empleó el aceite esencial de forma directa aplicando 10 µL por sensidisco.

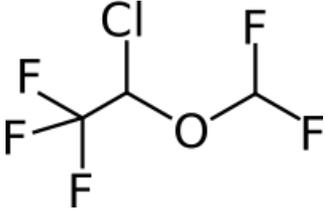
Control positivo

Se evalúa la sensibilidad de las cepas bacterianas experimentales con sensidiscos impregnados con 25 μg de cloranfenicol. Posteriormente se deja evaporar el solvente de los discos impregnados durante 12 horas y se colocan en la caja de Petri con las bacterias utilizadas.

Apéndice 10 Isoflurano (Anestesia inhalada) (Hawk *et al.*, 1999).

Es un éter halogenado, usado como anestésico administrado por vía inhalatoria (Nombre y estructura química en el cuadro 17). El uso de vaporizadores específicos para Isoflurano facilita el control de la concentración exacta de anestésico administrado. Tiene un ligero olor acre a éter, que puede limitar la velocidad de inducción del gas, no obstante, la inducción y la recuperación son rápidos (Ministerio de Sanidad, 2008).

Cuadro 17. Nombre y estructura química del Isoflurano.

Nombre.	Estructura química.
(1-cloro-2,2,2-trifluoroetil difluorometil éter)	

Se coloca un algodón dentro de un tubo cónico de 15 mL con tapa, posteriormente el algodón es impregnado con 40 μ L del anestésico (Figura 17); esta dosis fue estandarizada y se usa para ratones de las cepas Balb/c o CD-1 ya que cuentan con un peso entre 25 y 40 g. Posteriormente se tapa el tubo y cuando se vaya a ocupar se abre y se coloca el hocico del ratón dentro del tubo durante 12-15 segundos (tiempo estandarizado para el proyecto), el efecto es inmediato y la duración de la anestesia es de 40-50 segundos aproximadamente



Figura 17. Isoflurano y aplicador estandarizado para el proyecto (Foto tomada en octubre, 2016).

Apéndice 11. Biopsy punch (Figura 18).

Una vez anestesiados los organismos se procede a realizar la herida, esta se hace con ayuda del biopsy punch, se coloca al ratón boca abajo y se estira perfectamente la piel para que el corte sea bueno.

Cuando la piel se encuentra estirada se ejerce presión con el biopsy punch sobre el organismo y la herida que se realiza tiene un diámetro aproximado de 5 mm aunque si no se estira bien la piel puede variar entre 4.50 y 5.50 mm. Para finalizar se retira el círculo de epidermis cortada y si es necesario se corta la membrana con unas tijeras de disección para poder retirarlo.



Figura 18. Biopsy punch (Foto tomada en octubre, 2016).

Apéndice 12 Recoverón NC.

Es un fármaco utilizado para acelerar la cicatrización; ha mostrado buena tolerancia, a excepción de algunos casos de hipersensibilidad al principio activo o a cualquiera de sus excipientes como ardor e irritación (Tolentino, 2016).

Este fármaco está indicado para heridas sin infección donde se desee acelerar el proceso de cicatrización tales como heridas traumáticas quirúrgicas, episiotomías, úlceras, quemaduras de 1° y 2° grado, heridas profundas heridas que necesitan estar al descubierto etc. Según el síntoma que padezca el paciente será el tipo de Recoverón que se ocupe ya sea en un ungüento, crema, Recoverón C, Recoverón N y Recoverón NC

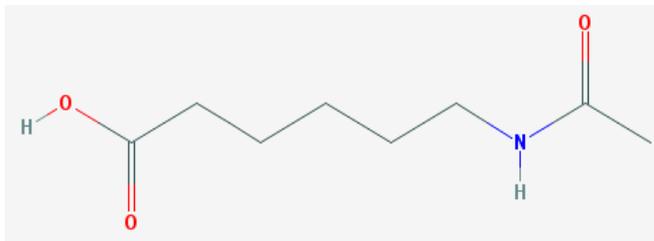
En el presente estudio se utilizó Recoverón NC (Figura 19), ácido acexámico con neomicina al 5% (Cuadro 18) debido a que elimina y previene la presencia de gérmenes patógenos que pudieran retrasar el proceso de cicatrización; esto porque, el ácido acexámico reduce la inflamación de fibras de colágena y no interfiere con la multiplicación celular. Por lo tanto, el medicamento actúa como regulador del tejido conjuntivo, permitiendo una epitelización más fácil. El ácido acexámico participa en la acción protéica de la colágena, lo que le permite actuar en el proceso de cicatrización, regulando la producción de fibroblastos y la disposición de las fibras colágenas dentro del mismo proceso biológico natural, pero de manera ordenada (NCBI, 2005); mientras que, la neomicina es un antibiótico de amplio espectro que combate tanto especies Gram negativas como algunas Gram positivas.

Cuadro 18. Estructuras químicas de los principios activos de Recoverón NC.

Principios activos.

Estructura química.

Ácido acexámico.



Neomicina.

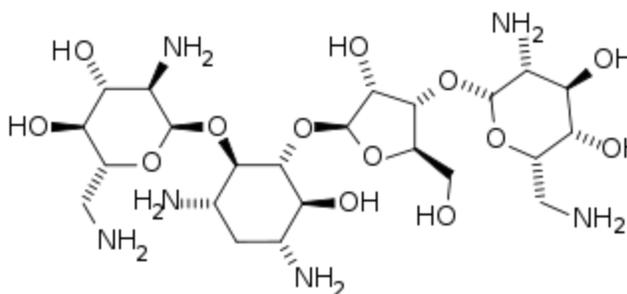


Figura 19. Fármaco aplicado en el tratamiento (Foto tomada en octubre, 2016).

Apéndice 13. Velocidad de cierre.

Los ratones con las heridas se colocarán de 2 a 3 horas en una caja con cama de periódico, esto se realizará para evitar que el aserrín se introduzca en la herida provocando alguna infección.

Se monitorearán 2 veces al día, durante 10 días y se medirá el diámetro de la herida hecha con Biopsy punch con ayuda de un Vernier electrónico de la marca Mitutoyo.

El porcentaje de velocidad de cierre fue calculado por la siguiente regla de tres.

$$\frac{(\text{Diámetro del día X})(100)}{\text{Diámetro del día 1}}$$

En donde se graficarán los tratamientos contra el % de velocidad de cierre.

Apéndice 14. Técnica histológica.

Esta técnica consiste en montar la piel lesionada (previamente extraída) en cassetes sumergidos en formol al 10% amortiguado con sales de fosfato con un pH de 7, las muestras se dejarán en esta solución durante 24 horas, posteriormente los tejidos se deberán someter a un tren de alcoholes de diferentes concentraciones (70, 80, 90 y 100%) para su deshidratación. Una vez terminado este proceso se dejarán en butanol durante 2 horas, a este proceso también se le conoce como aclaramiento. Los tejidos aclarados serán depositados en parafina durante 48 horas para concluir con la inclusión del tejido el cual se deberá dejar durante 24 horas en el congelador antes de llevarlo al micrótopo.

Se realizarán cortes histológicos de 3 o 5 μm , se deberán estirar las muestras con alcohol para posteriormente pegar el tejido al portaobjetos en el baño de flotación. Las laminillas se dejarán secar y se removerá la parafina excedente en un horno de calor seco a 56°C durante 24 horas, si aún queda parafina después de las 24 horas se le agregará Xilol. Una vez realizados los métodos anteriores se deberán rehidratar los tejidos con soluciones decrecientes de etanol (100, 90, 80 y 70%).

Apéndice 15. Tinción hematoxilina y eosina (H y E).

1. Desparafinar las muestras.
2. Xilol I – 5 minutos
3. Xilol II – 10 minutos
4. Alcohol 100% - 10 lavados
5. Alcohol 90% - 10 lavados
6. Alcohol 80% - 10 lavados
7. Alcohol 70% - 10 lavados
8. Agua corriente – 10 lavados
9. Hematoxilina - 1 minuto.
10. Agua corriente – 1 lavado
11. Alcohol ácido – 1 lavado
12. Agua corriente – 10 lavados
13. Carbonato de litio – Hasta que vire
14. Agua corriente – 1 lavado
15. Alcohol 100% - 10 lavados
16. Eosina – 7 minutos
17. Alcohol 70% - 10 lavados
18. Alcohol 80% - 10 lavados
19. Alcohol 80% - 10 lavados
20. Alcohol 90% - 10 lavados
21. Alcohol 100% - 10 lavados
22. Xilol I – 10 lavados
23. Xilol II – Hasta que se monte
24. Montar

Apéndice 16. Método tensiométrico (Vaisberg *et al.*, 1989).

Evaluación de la Eficacia Cicatrizante.

La sustancia a evaluar (aceite esencial) se aplicó de forma directa, con la ayuda de una micropipeta, se le colocaron 5 μ L en la lesión (para este caso la lesión fue realizada con un bisturí del #4, siendo un corte longitudinal de 1 cm aproximadamente), para el caso del control positivo (Recuperón NC), este fue aplicado utilizando una espátula 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 una base donde se sujetan los ratones, pinzas de disección para sujetar la piel del ratón y un juego de poleas para aplicar la fuerza al ir aumentando el peso del agua que fue cayendo. Esto se realizó para evaluar que tan efectivo es el proceso de cicatrización.

La fuerza o tensión en gramos en que se abre la herida en el proceso de cicatrización. Para lograr la medición se utilizaron pinzas de disección, las cuales fueron insertadas en la piel periférica a la herida, de los cuales se sujetó la piola a la cual estaban amarradas las botellas PET con una capacidad de 1.5 L. El agua caerá en las botellas; ya que, las mangueras estaban conectadas a un dispensador de agua provisto por una conexión de "T". Al ir cayendo el agua, el sistema de poleas fue ejerciendo presión lo cual hace que las piezas jalen la piel del ratón hasta su abertura.

Una vez que se abrió un poco la herida o se comenzó a observar una tonalidad blanca en la lesión se recuperó el agua que cayó en las botellas y se hizo la conversión de mL a gramos.

Con los datos así obtenidos, se calcula 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 utilizó la prueba “t de Student” para una $p < 0.05$



Figura 20. Modelo de tensiométrico utilizado en el proyecto y modificado por el Laboratorio de Inmunobiología.

Referencias

1. AFNOR., 1998. Association Francaise de Normalisation. NF T 75-006.
2. Albado Plaus, E., Saez Flores, G., Grabiell Ataucusi, S., 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). Revista Medica Herediana 12(1), 16-19.
3. Arenas, R., 2015. Atlas dermatología: Diagnóstico y tratamiento. Editorial McGraw-Hill Interamericana, México.
4. Asbaghian, S., Shafaghat, A., Zarea, K., Kasimov, F., Salimi, F., 2011. Comparison of volatile constituents, and antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of *Thymus caucasicus*, *T. kotschyanus* and *T. vulgaris*. Natural Product Communications 6(1), 137-140.
5. Becerra, J.X., 2005. Timing the origin and expansion of the Mexican tropical dry forest. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(31), 10919-10923.
6. Benavides, J., 2008. Reparación de heridas cutáneas. Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica 16(1), 29-35.
7. Biodiversidad., 1996. Copales. <http://www.biodiversidad.gob.mx/ usos/copales/copales.html>. (Consultado 17 Agosto 2016).
8. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology 28(1), 25-30.
9. Bruneton, J., 2001. Farmacognosia: fitoquímica, plantas medicinales.
10. Camporese, A., Balick, M., Arvigo, R., Esposito, R., Morsellino, N., De Simone, F., Tubaro, A., 2003. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). Journal of Ethnopharmacology 87(1), 103-107.
11. Cha, J.-D., Jung, E.-K., Kil, B.-S., Lee, K.-Y., 2007. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from *Artemisia feddei*. Journal of Microbiology and Biotechnology 17(12), 2061-2065.

12. Crowell, P.L., Ren, Z., Lin, S., Vedejs, E., Gould, M.N., 1994. Structure-activity relationships among monoterpene inhibitors of protein isoprenylation and cell proliferation. *Biochemical Pharmacology* 47(8), 1405-1415.
13. CYTED., 1995. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Búsqueda de principios activos de plantas de la región. Manual de técnicas de investigación, p. 220.
14. Dai, J.P., Chen, J., Bei, Y.F., Han, B.X., Wang, S., 2009. Influence of borneol on primary mice oral fibroblasts: a penetration enhancer may be used in oral submucous fibrosis. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 38(3), 276-281.
15. De Aluja, A.S., 2002. Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gaceta Médica de México* 138(3), 295-298.
16. Djemaa, F.G.B., Bellassoued, K., Zouari, S., El Feki, A., Ammar, E., 2016. Antioxidant and wound healing activity of *Lavandula aspic* L. ointment. *Journal of tissue viability* 25(4), 193-200.
17. Domínguez, X.A., Balick, M., Cicció, J., Joel, D., Marbach, I., Mayer, A., Santa Ram, A., López, C., Monaco, L., Biggers, R., 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Centro Regional de Ayuda Técnica, México, DF (México). 281pp.
18. Dongmo, P.M.J., Tchoumboungang, F., Ndongson, B., Agwanande, W., Sandjon, B., Zollo, P.H.A., Menut, C., 2010. Chemical characterization, antiradical, antioxidant and anti-inflammatory potential of the essential oils of *Canarium schweinfurthii* and *Aucoumea klaineana* (Burseraceae) growing in Cameroon. *Agriculture and Biology Journal of North America* 1(4), 606-611.
19. Dorantes, T., Maleny, K., 2014. Caracterización de los efectos biológicos y terapéuticos del gorgojo del maní (*Ulomoides dermestoides*). Trabajo monográfico para obtener el título de Química Farmacéutica Biológica, Unidad de Ingeniería y Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana, 59p.
20. El-Nekeety, A.A., Mohamed, S.R., Hathout, A.S., Hassan, N.S., Aly, S.E., Abdel-Wahhab, M.A., 2011. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. *Toxicon* 57(7), 984-991.
21. Espinosa, E.L., 2012. Estudio comparativo de la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera schlechtendalii*

- Engler., Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM, México, 71p.
22. Granados Conde, C., Yáñez Rueda, X., Santafé Patiño, G.G., 2012. Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas 10(1).
23. Granados, C., Yáñez, X., Acevedo, D., 2014. Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial Foliar de *Myrcianthes leucoxylla* de Norte de Santander (Colombia). Información Tecnológica 25(3), 11-16.
24. Guala, M.S., Elder, H.V., Perez, G., Chiesa, A., 2009. Evaluación del poder antioxidante de fracciones de aceite esencial crudo de *Schinus molle* L. obtenidas por destilación al vacío. Información Tecnológica 20(2), 83-88.
25. Guerra-Boone, L., Alvarez-Román, R., Salazar-Aranda, R., Torres-Cirio, A., Rivas-Galindo, V.M., de Torres, N.W., González, G., Pérez-López, L.A., 2015. Antimicrobial and antioxidant activities and chemical characterization of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, and *Origanum majorana* from northeastern México. Pakistan Journal of Pharmaceutical Science 28, 363S-369S.
26. Hajhashemi, V., Ghannadi, A., Sharif, B., 2003. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. Journal of Ethnopharmacology 89(1), 67-71.
27. Hawk, C.T., Leary, S.L., Morris, T.H., 1999. Formulary for laboratory animals. Iowa State University Press. 887-895 p.
28. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. The Journal of nutritional biochemistry 13(10), 572-584.
29. Heinrich, M., Ankli, A., Frei, B., Weimann, C., Sticher, O., 1998. Medicinal plants in Mexico: Healers' consensus and cultural importance. Social Science & Medicine 47(11), 1859-1871.
30. Hernández, A.R.A., Organista, D.E., 2002. Morfología de plántulas de *Bursera* Jacq. ex L.(Burseraceae) y sus implicaciones filogenéticas.

<http://repositoriodigital.academica.mx/jspui/handle/987654321/182174>

(Consultado 14 abril 2017).

31. Hernández, H.A.B., 2010. Actividad antifúngica de *Jatropha neopauciflora* Pax., Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM., México., p. 75p.
32. Hidalgo, A., 2010. Determinación del efecto cicatrizante del extracto acuotánico de la planta *Bacopa procumbens* en la línea celular 3T3 de fibroblastos de ratón. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN, México.
33. Hirota, R., Roger, N.N., Nakamura, H., Song, H.S., Sawamura, M., Suganuma, N., 2010. Anti-inflammatory Effects of Limonene from Yuzu (*Citrus junos* Tanaka) Essential Oil on Eosinophils. *Journal of Food Science* 75(3), H87-H92.
34. INAFED., 2010. San Antonio Nanahuatipam. <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM20oaxaca/municipios/20109a.html>. (Consultado 17 Agosto 2016).
35. INEGI., 2005. Prontuario de información geográfica municipal. www.inegi.org.mx/datos-geograficos. (Accessed 18 de Septiembre. 2016).
36. Ivanovska, N., Stefanova, Z., Valeva, V., Neychev, H., 1993. Immunodulatory action of propolis: VII. A comparative study on cinnamic and caffeic acid lysine derivatives. *Dokladi na Bulgarskata Akademia na Naukite* 46(10), 115-118.
37. Ji, W.-D., Jeong, M.-S., Chung, H.-C., Lee, S.-J., Chung, Y.-G., 1997. Antimicrobial activity and distilled components of garlic (*Allium sativum* L.) and ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 40(6), 514-518.
38. Jutiviboonsuk, A., Zhang, H., Tan, G.T., Ma, C., Van Hung, N., Cuong, N.M., Bunyapraphatsara, N., Soejarto, D.D., Fong, H.H., 2005. Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*. *Phytochemistry* 66(23), 2745-2751.
39. Kanter, M., Meral, I., Yener, Z., Ozbek, H., Demir, H., 2003. Partial regeneration/proliferation of the β -cells in the Islets of Langerhans by *Nigella*

- sativa* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. The Tohoku Journal of Experimental Medicine 201(4), 213-219.
40. Leite, A.M., Lima, E.d.O., Souza, E.L.d., Diniz, M.d.F.F.M., Trajano, V.N., Medeiros, I.A.d., 2007. Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 43(1), 121-126.
41. Leonti, M., Sticher, O., Heinrich, M., 2003. Antiquity of medicinal plant usage in two Macro-Mayan ethnic groups (Mexico). *Journal of Ethnopharmacology* 88(2), 119-124.
42. Lin, J.-J., Lin, J.-H., Hsu, S.-C., Weng, S.-W., Huang, Y.-P., Tang, N.-Y., Lin, J.-G., Chung, J.-G., 2013. Alpha-phellandrene promotes immune responses in normal mice through enhancing macrophage phagocytosis and natural killer cell activities. *In Vivo* 27(6), 809-814.
43. Lira, P.D.L., Farfán, Y., van Baren, C.M., Bandoni, A.L., Coussio, J.D., De Abram, A.P., Da Silva, V.C., De Carvalho, M.G., Silva, S.L.D.C.E., Vitale, P., 2007. Composition of the essential oil of two *Peperomia* from Peru: *P. Galioides* and *P. Chalhuapuquiana*. *Revista Latinoamericana de Química*. 35, 7-9.
44. López Barreiro, M., García Hernández, A.I., Boucourt Rodríguez, E., Morejón Rodríguez, Z., 2014. Toxicidad aguda tópica e irritabilidad dérmica de la decocción de hojas de *Pipiper auritum* Kunth (caisimón de anís). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 19(4), 443-450.
45. López S, H., 2016. Evaluación del efecto cicatrizante de extractos de *Bursera glabrifolia* y *Bursera morelensis* en modelos murinos de incisión, escisión y de sobrecrecimiento celular, Tesis de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Departamento Académico, Instituto Politécnico Nacional. México., p. 110.
46. López, H.L.R., 2011. Propiedades medicinales y determinación de los compuestos del aceite esencial de *Bursera morelensis*., Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM., México., p. 64p.

47. Lüllmann, M., Mohr, K., 1992. Atlas de Farmacología. Barcelona: Ediciones científicas y técnicas.
48. Maldini, M., Montoro, P., Piacente, S., Pizza, C., 2009. Phenolic compounds from *Bursera simaruba* Sarg. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* 70(5), 641-649.
49. Mandegary, A., Sayyah, M., Heidari, M.R., 2004. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of the seed and root extracts of *Ferula gummosa* Boiss in mice and rats. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 12(2), 58-62.
50. Martínez, A., 2001. Aceites esenciales. *Journal of Natural Products* 59(1), 77-79.
51. Messina, F., Curini, M., Di Sano, C., Zadra, C., Gigliarelli, G., Rascón-Valenzuela, L.A., Robles Zepeda, R.E., Marcotullio, M.C., 2015. Diterpenoids and triterpenoids from the resin of *Bursera microphylla* and their cytotoxic activity. *Journal of Natural Products* 78(5), 1184-1188.
52. Ministerio de Sanidad., 2008. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/60373/P_60373.pdf. (Consultado 04 Septiembre. 2016).
53. Miranda, F., Hernández, X. E., 1963. Los tipos de vegetación de México y su clasificación. Colegio de Postgraduados, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.
54. Monzote, L., Hill, G.M., Cuellar, A., Scull, R., Setzer, W.N., 2012. Chemical composition and anti-proliferative properties of *Bursera graveolens* essential oil. *Natural Product Communications* 7(11), 1531-1534.
55. Mooney, H., Emboden, W., 1968. The relationship of terpene composition, morphology, and distribution of populations of *Bursera microphylla* (Burseraceae). *Brittonia* 20(1), 44-51.
56. Moreno-Bautista, J.L., 2008. Diagnóstico Municipal de San Antonio Nanahuatipam 2008, Trienio 2008-2010. México.

57. Mulisa, E., Asres, K., Engidawork, E., 2015. Evaluation of wound healing and anti-inflammatory activity of the rhizomes of *Rumex abyssinicus* J.(Polygonaceae) in mice. BMC Complementary and Alternative Medicine 15(1), 1.
58. National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2005. PubChem Compound Database: Propiedades farmacológicas y estructura del ácido acexámico. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2005>. (Consultado 29 Diciembre. 2016.).
59. Navarrete, G., 2003. Histología de la Piel. Revista de la Facultad de Medicina, UNAM 45(3), 130-133.
60. Noguera, B., Díaz, E., García, M., San Feliciano, A., López-Perez, J., Israel, A., 2004. Anti-inflammatory activity of leaf extract and fractions of *Bursera simaruba* (L.) Sarg (Burseraceae). Journal of Ethnopharmacology 92(1), 129-133.
61. Organización Mundial de la Salud., 2017. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/> (Consutado 15 mayo, 2017)
62. Perea, E.M., 2007. Actividad antioxidante *in vitro* y antimicrobial de extractos metanólicos de cuatro albahacas cultivadas en Ibagué. Revista Tumbaga 2(1). 13p.
63. Queiroga, C.L., Duarte, M.C.T., Ribeiro, B.B., de Magalhães, P.M., 2007. Linalool production from the leaves of *Bursera aloexylon* and its antimicrobial activity. Fitoterapia 78(4), 327-328.
64. Quintans, J.d.S.S., Menezes, P.P., Santos, M.R.V., Bonjardim, L.R., Almeida, J.R.G.S., Gelain, D.P., de Souza Araújo, A.A., Quintans-Júnior, L.J., 2013. Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. Phytomedicine 20(5), 436-440.
65. Raja, B., 2010. Antihypertensive and antioxidant potential of borneol-a natural terpene in L-NAME-induced hypertensive rats. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive 1(3).

66. Ramos, A., Miranda, J.D., 2007. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 13(4), 697-710.
67. Redrobán, K., 2012. Comprobación del efecto cicatrizante de los extractos hidroalcohólicos de Berro (*Nasturtium officinale*) y Llantén (*Plantago major*) en ratones (*Mus musculus*). Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Chimborazo, Ecuador. 30-35pp.
68. Robbin, C.K., Robbins, S., 1990. *Patología Estructural y Funcional*, 4ta. Edición, Madrid España: McGraw-Hill Interamericana, 247-250.
69. Rosas-Arreguín, P., Arteaga-Nieto, P., Reynoso-Orozco, R., Villagómez-Castro, J.C., Sabanero-López, M., Puebla-Pérez, A.M., Calvo-Méndez, C., 2008. *Bursera fagaroides*, effect of an ethanolic extract on ornithine decarboxylase (ODC) activity *in vitro* and on the growth of *Entamoeba histolytica*. *Experimental Parasitology* 119(3), 398-402.
70. Rzedowski, J., Guevara-Féfer, F., 1992. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Familia Burseraceae. Escuela de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo En: Memoria de la primera muestra "Los recursos vegetales de Michoacán". Morelia, Mich.
71. Rzedowski, J., Huerta, L., 1978. *Vegetación de México*. Limusa México.
72. Rzedowski, J., Kruse, H., 1979. Algunas tendencias evolutivas en *Bursera* (Burseraceae). *Taxon*, 103-116.
73. Rzedowski, J., Lemos, R.M., de Rzedowski, G.C., 2005. Inventario del conocimiento taxonómico, así como de la diversidad y del endemismo regionales de las especies mexicanas de *Bursera* (Burseraceae). *Acta Botanica Mexicana*(70), 85-111.
74. Serrano, P.R., 2013. Efecto cicatrizante de *Bursera morelensis* Ramírez (Burseraceae), de San Rafael, Coxcatlán, Puebla, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM., México., p. 139p.
75. Serrano, P.R., Vázquez, C.B., Segura, C.D., Anaya, L.A.L., Jimenez, E.M., Canales, M.M.M., 2012. Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant

- properties of *Bursera morelensis* bark from San Rafael, Coxcatlán, Puebla (México): Implications for cutaneous wound healing. *Journal of Medicinal Plants Research* 6, 5609-5615.
76. Setzer, W.N., 2014. Leaf and bark essential oil compositions of *Bursera simaruba* from Monteverde, Costa Rica. *American Journal of Essential Oils and Natural Products* 1(3), 34-36.
77. Tiwari, M., Kakkar, P., 2009. Plant derived antioxidants—geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress. *Toxicology in vitro* 23(2), 295-301.
78. Tolentino, M.J., 2016. Evaluación de la actividad del extracto metanólico de la corteza de *Ceiba aesculifolia subsp. Parvifolia* sobre heridas superficiales. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM, México. 82p.
79. Torres-Barajas, L., Rojas-Vera, J., Morales-Méndez, A., Rojas-Fermín, L., Lucena, M., Buitrago, A., 2013. Chemical composition and evaluation of antibacterial activity of essential oils of *Ageratina jahnii* and *Ageratina pichinchensis* collected in Mérida, Venezuela. *Bol. latinoam. Caribe plantas med. aromát* 12(1), 92-98.
80. Vaisberg, A.J., Milla, M., del Carmen Planas, M., Cordova, J.L., de Agusti, E.R., Ferreyra, R., del Carmen Mustiga, M., Carlin, L., Hammond, G.B., 1989. Taspine is the cicatrizant principle in Sangre de Grado extracted from *Croton lechleri*. *Planta medica* 55(02), 140-143.
81. Van den Berghe, D.A., Vlietinck, A.J., 1991. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In *methods in plant biochemistry*. Vol 6 "Assays for Bioactivity" Hostettmann, K. Series editor Dey, P. M. Academic Press. New York, USA. 47-71.
82. Vélez, C.F.X., 2015. Actividad cicatrizante in vivo de los extractos metanólicos de *Justicia chlorostochya* y *Plectranthus amboinicus* en ratones diabéticos inducidos mediante estreptozotocina.
83. Vendruscolo, A., Takaki, I., Bersani-Amado, L., Dantas, J., Bersani-Amado, C., Cuman, R.K., 2006. Antiinflammatory and antinociceptive activities of

- zingiber officinale roscoe essential oil in experimental animal models. Indian Journal of Pharmacology 38(1), 58.
84. Vilar-Compte, D., Sandoval, S., Gordillo, P., de la Rosa, M., Sánchez-Mejorada, G., Volkow, P., 1999. Vigilancia de las infecciones de herida quirúrgica. Experiencia de 18 meses en el Instituto Nacional de Cancerología. salud pública de México 41, S44-S50.
85. Villena, C.A., Arroyo, J.L., 2012. Efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* (Yawar Socco) en ratas con inducción a la inflamación aguda y crónica. Ciencia e Investigación 15(1), 15-19.
86. Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Pérez, L., López-Villafranco, E., Muñiz, E.E., Aguilar, A., Reyes-Chilpa, R., 2005. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. Journal of Ethnopharmacology 97(2), 293-299.
87. Zavala, A.G., Benzaquen, R.C., Malavé, E.Z., Sáenz, A.M., Calebotta, A., Rivero, A.L., 2009. Cicatrización de las heridas. Dermatología Venezolana 47(3 y 4).