



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA

**PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL PROPÓLEO
DE CHIHUAHUA, EN UN MODELO DE CICATRIZACIÓN**

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

ALMA DELIA NAVA TORRES

DIRECTOR DE TESIS

DR. MARCO A. RODRÍGUEZ MONROY

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. México. 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala siendo parte de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy, por dirigir esta tesis brindándome sus mejores consejos, enseñanzas, tiempo, dedicación y excelentes momentos.

A los miembros del jurado:

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez.

Dr. Oscar de Jesús Nieto Yáñez.

Dra. Ana Bertha Hernández Hernández.

Mtra. Judith Salas Oropeza.

Por su tiempo y colaboración en la realización y revisión de esta tesis.

DEDICATORIAS

A mi mami, por tu infinito amor y comprensión, por tu paciencia y tolerancia. Ya debes saber que eres la mejor madre de la vida, cariñosa, divertida, comprensiva, una gran mujer, cualquiera quisiera tenerte como madre y yo tengo la más grande fortuna de ser tu hija. GRACIAS MAMÁ, por darme siempre ánimos, enseñarme a superar mis miedos, a levantarme en cada caída, a ser fuerte. Además eres la más cool y tierna, te amo. A mi papá, si llegué hasta este punto fue porque siempre te he admirado, porque al ver lo lejos que habías llegado me animaba siempre a creer que yo también puedo alcanzar mis sueños. GRACIAS por enseñarme a no rendirme, a superarme, a querer aprender siempre, a ser independiente porque no siempre estarías aquí y también por consentirme y darme todo lo que tenías a tu alcance, por todo el amor que me has dado. A pesar de todo, te amo. Definitivamente no me alcanzaría la vida para agradecer cada sacrificio que han hecho por mí y mi hermana y que sepan que este logro no sólo es mío, sino nuestro. Por sus enseñanzas de vida que me han convertido en la mujer que hoy soy. Sin su apoyo incondicional y su fe en mí esto no habría sido posible.

A Melanie, desde que naciste no hay nadie más importante para mí y todo lo que hago o llegue a hacer es con el sólo fin de saberte bien. Así que este logro también es por ti y para ti. Porque a fin de cuentas siempre seremos tú y yo contra el mundo, así que nunca desistas pelitos, puedes lograr grandes cosas.

A ti Octavio, porque lo nuestro es inefable y haber coincidido contigo fue lo mejor que pudo pasarme en la carrera. Eres una maravillosa persona en muchos sentidos y me enorgullece ser tu novia, sé que la vida tiene grandes planes para nosotros. Muchas gracias por estar conmigo en mis mejores y mis peores momentos, por aceptarme tal cual soy y por todo lo que me has brindado desde que nos conocemos. Gracias amor, por animarme a superarme cada día y a que crezcamos juntos, sí, juntos porque no importa el día o la hora, siempre estaré para ti. TE AMO CON EL ALMA.

A Beca porque eres más que mi prima, mi otra hermanita y mi mejor amiga de toda la vida. Porque te convertiste en un motivo más para que yo buscara superarme y sin tu confianza en mí no habría logrado esto, porque siempre has estado ahí para animarme cada que me sentía flanqueada. Te amito.

A mi enorme familia, a la más tierna abuelita, mi abue Delia, tíos, tías, sobrinos, primas, primos y ahora también a los primos políticos, a los que ya se fueron pero que a pesar de su temprana partida marcaron mi vida de una forma increíble; el primer logro de tantos que también dedico a todos ustedes por tantos momentos felices que he pasado a su lado.

A mis más grandes amigas Ara, Lu, Majo que aunque a veces pasamos mucho tiempo sin vernos tampoco sé qué haría sin ustedes, por estar siempre para mí como yo para ustedes y escucharme en mis momentos de estrés y todo. Las quiero muchísimo.

Por todo el apoyo, enseñanzas y buenos momentos compartidos a todos los integrantes del Laboratorio de Inmunobiología, Óscar, Nelly, Alonso, Gus, Rubén, Judith, Pili, Fany, Ibrán, Mario y Lesslie. Pero sobre todo a Dany, por todo tu tiempo, paciencia y enseñanzas, por ser mi guía desde el primer día siempre siendo tan amable y linda conmigo. Agradezco haber trabajado contigo, principalmente, por ese empeño que me enseñaste a poner en cada detalle para que tuviéramos el mejor trabajo y a no cantar victoria jaja que sólo nos daba momentos de frustración que únicamente nosotras entendíamos. GRACIAS!!!

A Rebe, Mara, Hatziri, Josecito, Anita, Karlita, Uriel, Yoy, Brenda, Michael, Judith, Juan Pablo, Lalo, Mari y Lucero, del Laboratorio de Farmacognosia que desde un inicio me sentí integrada por todos ustedes gracias por todo, las risas, las lecciones y el apoyo.

Al Dr. Marco y la Dr. Margarita, por aceptarme en su equipo de trabajo y siempre ser tan acogedores, he aprendido muchísimo de ustedes en muchos sentidos, gracias infinitas!!!

ÍNDICE	¡Error! Marcador no definido.
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	12
PROPÓLEO	17
ANTECEDENTES	18
OBJETIVO GENERAL	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
OBTENCIÓN DEL PROPÓLEO	20
OBTENCIÓN DEL EXTRACTO	20
CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL PROPÓLEO DE CHIHUAHUA	20
<i>Partición por gradiente de polaridad del EEPC</i>	20
<i>Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)</i>	21
<i>Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)</i>	21
EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	21
<i>Determinación de fenoles totales</i>	22
<i>Determinación de flavonoides totales</i>	23
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	23
ORGANISMOS	24
ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA	24
TOXICIDAD DÉRMICA	25
EFICACIA DE CICATRIZACIÓN	25
<i>Velocidad de cierre</i>	25
<i>Fuerza de cicatrización</i>	26
RESULTADOS	28
OBTENCIÓN DEL EXTRACTO	28
CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL PROPÓLEO DE CHIHUAHUA	28
<i>Partición por gradiente de polaridad del EEPC</i>	28
<i>Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)</i>	29
<i>Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)</i>	34
EVALUACIÓN ANTIOXIDANTE	39
<i>Determinación de fenoles totales</i>	40

<i>Determinación de flavonoides totales.</i>	42
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	42
ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.....	44
TOXICIDAD DÉRMICA	48
EFICACIA DE CICATRIZACIÓN	52
<i>Velocidad de cierre.</i>	52
<i>Fuerza de cicatrización.</i>	56
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	66
APÉNDICES	67
Apéndice 1. Histología de la piel.....	67
Apéndice 2. Zona de colecta.....	71
Apéndice 3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	73
<i>Partición hexánica del EEPC.</i>	73
<i>Partición con diclorometano del EEPC.</i>	74
<i>Partición metanólica del EEPC.</i>	76
Apéndice 4. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	78
<i>Partición hexánica del EEPC.</i>	78
<i>Partición con diclorometano del EEPC.</i>	79
<i>Partición metanólica del EEPC.</i>	80
Apéndice 5. Conteo de Fenoles totales.....	81
Apéndice 6. Flavonoides totales.....	83
Apéndice 7. Isoflurano.	84
Apéndice 8. Recoverón-NC.....	86
Apéndice 9. Técnica histológica.....	88
Apéndice 10. Tinción Hematoxilina – Eosina (H-E).....	88
Apéndice 11. Método tensiométrico.....	89
REFERENCIAS	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rendimiento del EEPC.	28
Figura 2. Rendimiento de las tres fracciones obtenidas a partir del EEPC.	29
Figura 3. HPLC del EEPC completo.	29
Figura 4. GC-MS de la partición hexánica del EEPC.	35
Figura 5. GC-MS de la partición con diclorometano del EEPC.	36
Figura 6. GC-MS de la partición metanólica del EEPC.	37
Figura 7. Capacidad antioxidante del EEPC.	40
Figura 8. Curva patrón de ácido gálico donde se interpoló la absorbancia que presentó el EEPC para determinar la concentración de fenoles totales de la muestra.	41
Figura 9. Curva patrón donde se interpoló la muestra de propóleo para determinar los flavonoides totales de la muestra.	42
Figura 10. Actividad antibacteriana del EEPC evaluada en dos cepas Gram (+) con a) <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i> ; y dos cepas Gram (-) c) <i>P. aeruginosa</i> y d) <i>E. coli</i>	43
Figura 11. Actividad antibacteriana del EEPC en bacterias Gram (+) y Gram (-).	44
Figura 12. Capacidad antiinflamatoria del EEPC a dos concentraciones.	45
Figura 13. Cortes histológicos de las orejas en la evaluación del edema auricular. ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 14. Cortes histológicos de muestras de la piel en toxicidad a un aumento de 10x. .	50
Figura 15. Peso en gramos de los hígados (A) y riñones (B) después de 14 días de la aplicación de los tratamientos.	51
Figura 16. Comparación del porcentaje de cierre entre los tratamientos durante 15 días. .	53
Figura 17. Cortes histológicos de la zona de la herida después de 14 días.	55
Figura 18. Longitud de la herida medida en los cortes histológicos.	56
Figura 19. Comparación de los porcentajes en la fuerza de cierre entre los tratamientos, obtenidos por el método tensiométrico.	57
Figura 20. Capas principales de la piel y estructuras anexas en tinción H-E.	67
Figura 21. Estratos de la epidermis y estructuras anexas en tinción H-E.	69
Figura 22. Ubicación geográfica de los municipios Chihuahua y Aquiles Serdán, Estado de Chihuahua.	71
Figura 23. Cromatograma de la partición hexánica del EEPC.	73

Figura 24. Cromatograma del HPLC de la partición con diclorometano del EEPC.	74
Figura 25. Cromatograma de la partición metanólica del EEPC.....	76
Figura 26. Presentación comercial del Isoflurano empleado en este estudio.	85
Figura 27. Recoverón-NC, presentación comercial en crema.	86
Figura 28. Realización de las heridas paravertebrales de 1 cm de longitud.....	89
Figura 29. Sistema utilizado para la evaluación de la fuerza de cierre, mediante el método tensiométrico.	90
Figura 30. Momento exacto cuando la herida alcanza el peso necesario y se abre.....	90

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. División de los grupos experimentales.....	26
Cuadro 2. Distribución de grupos experimentales y sus particularidades.....	27
Cuadro 3. Características organolépticas del EEPC.	28
Cuadro 4. Compuestos químicos identificados en el EEPC completo con el HPLC.....	30
Cuadro 5. Comparación de los compuestos identificados en cada una de las fracciones del EEPC mediante HPLC.	32
Cuadro 6. Actividades biológicas reportadas sobre los compuestos identificados mediante HPLC tanto del EEPC completo como el de las fracciones.	32
Cuadro 7. Compuestos identificados en cada fracción del EEPC mediante CG-EM.	37
Cuadro 8. Actividades biológicas reportadas sobre los compuestos identificados mediante CG-EM de las tres fracciones del EEPC.	39
Cuadro 9. Registro fotográfico de la prueba de toxicidad dérmica al pasar de los días.	49
Cuadro 10. Registro fotográfico de la evolución de la herida en todos los tratamientos....	52
Cuadro 11. Metabolitos secundarios presentes en la partición hexánica del EEPC.	73
Cuadro 12. Metabolitos secundarios presentes en la partición con diclorometano del EEPC..	75
Cuadro 13. Metabolitos secundarios presentes en la partición metanólica del EEPC.	76
Cuadro 14. Metabolitos secundarios identificados en la partición hexánica del EEPC.....	78
Cuadro 15. Metabolitos secundarios identificados en la partición diclorometánica del EEPC.	79

Cuadro 16. Metabolitos secundarios identificados en la partición metanólica del EEPC. .	80
Cuadro 17. Nombre y estructura química del Isoflurano.	84
Cuadro 18. Estructuras químicas de los principios activos de Recoverón-NC.	87

LISTA DE ABREVIATURAS

IL	Interleucina.
TNF	Factor de necrosis tumoral.
TGF	Factor de crecimiento transformante.
PF	Factor plaquetario.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular.
EGF	Factor de crecimiento endotelial.
KGF	Factor de crecimiento de los queratinocitos.
EEPC	Extracto etanólico del propóleo de Chihuahua.
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
DAD	Detector de arreglo de diodos.
GC-MS	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología.
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidracil
UV-VIS	Ultravioleta visible.
CA₅₀	Capacidad Antioxidante Media.
ELISA	Enzimoimmunoanálisis de adsorción.
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos.
UFC	Unidades formadoras de colonias.

RESUMEN

El propóleo es uno de los integrantes de la medicina tradicional más utilizados y existen numerosos estudios acerca de la composición química de los propóleos alrededor del mundo sobre todo en zonas más cálidas; sin embargo, en México son pocos los estudios acerca del propóleo. La variabilidad química de los propóleos depende en gran parte de la zona de colecta y la disponibilidad botánica de la colmena, lo que representa una dificultad más para la caracterización de las propiedades biológicas de los propóleos de México. Como contribución a este propósito, este estudio se enfoca en evaluar ciertas propiedades que se le atribuyen al propóleo y que además son procesos biológicos importantes para la sanación de heridas.

El propóleo para esta investigación se obtuvo de un apiario del Ejido Concordia ubicado en la zona centro de Chihuahua. El EEPC fue obtenido por el método de maceración dando un rendimiento del 67%. El cual fue sometido a un análisis químico en HPLC identificando compuestos como naringina, pinocembrina, crisina, naringenina, acacetina, catequina, quercetina, camferol y luteolina, entre otros flavonoles. flavanonas y fenoles. Para mayor certeza se realizó una GC-MS, identificando 23 compuestos de los cuales destacan por su abundancia pinocembrina, éster metílico del ácido oleico, 14-metil-, metil éster del ácido pentadecanóico, 2-nonadecanona, eicosano y α bisabolol, además de muchos otros compuestos en trazas. Se evaluó la capacidad antioxidante por el método el método de reducción de 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH), obteniendo una CA_{50} de 15.75 $\mu\text{g/mL}$. Asimismo, se determinó la cantidad de fenoles y flavonoides totales, encontrando para fenoles 314 mg eAG/g de propóleo y para flavonoides 62.58 mg eQ/g de propóleo. Posteriormente se corroboró la actividad antibacteriana siguiendo el método de difusión en agar Kirby-Bauer, presentando mayor susceptibilidad al extracto las bacterias Gram +, que las bacterias Gram -. Continuando con la evaluación de propiedades implicadas en el proceso de cicatrización, se evaluó la capacidad antiinflamatoria mediante el método de edema auricular inducido por xilol, mostrando un 25% de inflamación con la concentración del EEPC al 50%, 35% para el diclofenaco y una acción casi nula por parte del EEPC al 10%. Por lo que fue necesario realizar un ensayo de toxicidad aguda en donde se concluyó que el EEPC al 50% presenta signos de irritante ligero. Por último, se evaluó la eficacia

cicatrizante del extracto en ratones, estableciendo la velocidad de cierre, con mediciones diarias y análisis histológico, y la fuerza de cicatrización, basado en el método de Vaisberg. En velocidad de cierre se determinó un porcentaje de cierre para el EEPC al 10% del 76%, la concentración al 50% el porcentaje de cierre fue de 58% y para el Recoveron-NC un 68% de cierre; mostrando además, una evidente mejoría en histología el uso de EPPC al 10%. Mientras que, en fuerza de cierre la concentración más baja de EEPC mostró una fuerza del 38% y la fuerza de concentración al 50% fue de 29%, seguido del Recoveron-NC con un 25%.

Dadas las cifras obtenidas el EEPC al 10% es el mejor candidato para su uso como cicatrizante, proporcionándole mayor elasticidad y fuerza a las cicatrices, además de acelerar el cierre de las heridas. Estas propiedades se deben probablemente a su rica composición química ya que se les han reportado con actividades como antioxidantes, antiinflamatorias, antibacteriano y proliferativo, las cuales también fueron corroboradas en la presente investigación.

INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, que se encarga de recubrir y proteger órganos y tejidos del cuerpo (Apéndice 1) y cuya falta o irrupción, causada por lesiones cutáneas o heridas, implica una riesgosa exposición a factores del ambiente externo que pueden producir daños al organismo. Las heridas se pueden clasificar según la capa afectada; las heridas superficiales afectan sólo la epidermis, las de profundidad media afectan la dermis y la epidermis, y las de profundidad total llegan hasta la hipodermis [1]. Una herida es la interrupción de la continuidad tanto anatómica como celular de la piel e implica un déficit funcional del territorio traumatizado, desencadenando mecanismos de reparación con el fin de sustituir el tejido perdido, dando como resultado una cicatriz o tejido conjuntivo fibroso, formada principalmente de colágeno revestido por la epidermis [2].

La cicatrización es un proceso biológico encaminado a la curación y reparación de las úlceras y las heridas, por medio de reacciones bioquímicas e interacciones celulares, cuya proliferación y diferenciación está mediada por citocinas, liberadas al medio extracelular y factores de crecimiento, dando como resultado final la formación de tejido conjuntivo fibroso [1, 3]. Las fases de la cicatrización se dividen en inflamación, proliferación y remodelación; sin embargo, no constituyen episodios aislados, es decir, son secuenciales y simultáneas [4].

Fase inflamatoria.

Esta fase comienza en el momento en que se produce la herida, y está 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 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 [1].

La resolución de la lesión comienza con la hemostasia. La vasoconstricción ocurre antes de la formación del coágulo, ya que los capilares dañados producen su propio vasoconstrictor, endotelina. Posteriormente se desencadena la cascada de coagulación activada por el factor

X y la producción de trombina, esta última cataliza la conversión de fibrinógeno y fibrina y el reclutamiento plaquetario para la formación del coágulo. Las plaquetas son las primeras células que responden a la cicatrización de la herida, contribuyendo a la hemostasia a través de su adherencia, agregación y desgranulación. La agregación plaquetaria en el entorno de la matriz de fibrina forma un coágulo. El trombo impide el sangrado, establece una barrera protectora y proporciona un reservorio de las sustancias liberadas por la desgranulación de las plaquetas. La desgranulación consiste en la liberación de numerosas citocinas, factores de crecimiento y proteínas de la matriz almacenadas en los gránulos alfa de las plaquetas [4].

Con la hemostasia se inicia de inmediato la inflamación. La inflamación se refleja en los signos físicos de eritema, calor, edema y dolor. La inflamación representa una dilatación de los vasos sanguíneos, con aumento de su permeabilidad, y el reclutamiento de los macrófagos y neutrófilos hacia el foco de lesión [3]. La vasodilatación está mediada por la presencia de cininas, histamina, prostaglandinas y leucotrienos. A medida que se dilatan los vasos, se forman ranuras entre las células endoteliales, que aumentan la permeabilidad vascular. La migración celular desde la superficie endotelial hacia el espacio extravascular de la herida está mediada por numerosos factores químicos y se conoce como quimiotaxis. Las sustancias quimiotácticas pueden ser factores del complemento, histamina, productos bacterianos, prostaglandinas, leucotrienos y factores de crecimiento. Estas sustancias reclutan a los neutrófilos, los macrófagos y los linfocitos hasta el lugar de la inflamación [5].

Los neutrófilos son el primer subgrupo de leucocitos que penetra en la herida. Estas células alcanzan el lugar de la lesión por el estímulo de prostaglandinas, IL-1 β , factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor plaquetario (PF4) y productos bacterianos. La función principal de los neutrófilos es defender la herida frente a las bacterias y eliminar el detritus tisular. Los neutrófilos producen radicales libres y reactivos de oxígeno que se combinan con el cloro, haciendo menos hospitalaria la presencia de bacterias en la herida. Una misión secundaria de los neutrófilos es perpetuar la fase inicial de la inflamación mediante la eliminación de citocinas [4, 5].

Los macrófagos son esenciales para la cicatrización y cumplen diversas tareas en la fase inflamatoria y proliferativa, eliminan los detritos de la herida, secretan proteasas y fagocitan bacterias. Además, son fuente mayoritaria de citocinas y factores de crecimiento, resultando necesarios para el reclutamiento y la activación celular, la síntesis de la matriz, la angiogenia y la remodelación [4]. Atraídos al lugar de la lesión por la IL-2 y otros factores, los linfocitos T representan el tipo celular predominante en la herida, éstos actúan como mediadores dentro de la herida secretando linfocinas y haciendo contacto directo entre ellos y los fibroblastos. Otro tipo de leucocito reclutado durante la inflamación es el mastocito, los gránulos del interior de estas células contienen histamina, citocinas (TNF- α), prostaglandinas y proteasas. Su desgranulación favorece la permeabilidad vascular, la activación celular, el depósito de colágeno y la remodelación [4].

Fase de proliferación.

En esta fase se producen varios procesos, siendo los más importantes: la proliferación de los fibroblastos y la reepitelización que ocurre para reponer el tejido perdido durante la lesión. Las primeras señales para el reclutamiento de los fibroblastos provienen de productos derivados de las plaquetas: factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento insulinoide (IGF-1) y TGF- β . Los macrófagos y los fibroblastos liberan numerosos factores de crecimiento y citocinas que contribuyen a la migración fibroblástica: factor de crecimiento fibroblástico (FGF), IGF-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), IL-1, IL-2, IL-8, PDGF, TGF- α , TGF- β y TNF- α . Los fibroblastos que emigran desde el tejido circundante hasta los bordes de la herida son activados por el PDGF y el factor de crecimiento endotelial (EGF), que proliferan y empiezan a sintetizar colágeno. Existe una segunda población de fibroblastos que reside dentro de la herida. Estos fibroblastos difieren de los primeros en que proliferan menos, sintetizan más colágeno y se transforman en miofibroblastos que participan en la contracción de la matriz y expresan principalmente la proteína contráctil α -SMA [1, 4, 6, 7].

El siguiente proceso que sucede es la angiogénesis, 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 [1]. El último proceso que

sucede en esta fase es la fibroplasia en donde se produce nuevo colágeno y otras proteínas que ayudan a formar la nueva matriz. Todos estos procesos se dan de los dos a los cuatro días de que se ha producido la lesión [1]. El PDGF y el TGF- β son factores de crecimiento que estimulan la producción de matriz provisional compuesta por monómeros de colágeno derivados de los fibroblastos, proteoglicanos y fibronectina. Estas sustancias restablecen la continuidad del tejido conjuntivo entre los bordes de la herida. En la reparación de la herida participan fundamentalmente dos subtipos de colágeno, el tipo I que normalmente predomina en la matriz extracelular de la piel y el colágeno de tipo III, presente en menores cantidades en la piel no dañada, sin embargo, es el más importante para la reparación de la herida. Además del colágeno, los fibroblastos producen y secretan proteoglicanos, los cuales son el componente principal del tejido de granulación. A medida que la matriz de colágeno va reemplazando el coágulo de fibrina, los proteoglicanos pueden contribuir al ensamblaje de las fibrillas de colágeno [4].

El daño vascular causado por la lesión experimenta un restablecimiento a través de la angiogenia. Las células endoteliales de los capilares intactos migran desde la periferia hasta el borde de la herida. Tras la migración se produce una replicación y formación de nuevos conductillos capilares. Los episodios de angiogenia están regulados por hormonas de crecimiento (TNF- α , TGF- β , VEGF, FGF, PDGF) provenientes de las plaquetas, los macrófagos y las células endoteliales dañadas [4, 8]. De forma análoga a la angiogenia, el restablecimiento del epitelio comienza reponiendo la barrera externa y minimizando las pérdidas de líquidos y la invasión bacteriana. Comienza por el engrosamiento de la epidermis a lo largo de los bordes de la herida [5]. Las células epiteliales pueden secretar MMP, que descompone la fibrina en el curso de su migración [4]. Los episodios de epitelización dependen de señales intercelulares, factores de crecimiento y el entorno metabólico del interior de la herida. Una tensión de oxígeno baja en la herida aumenta la producción de TGF- β . La TGF- β y contribuyen a que las células epiteliales no se diferencien, mientras que, el TGF- α y el factor de crecimiento de los queratinocitos (KGF) estimulan de forma más directa la replicación [7].

Fase de remodelación.

Puede durar días, meses o años, consiste en la reparación del tejido hasta conseguir una similitud al tejido original. Durante este período, la matriz del colágeno sigue reabsorbiéndose y depositándose, remodelando y fortaleciendo la herida. La matriz inicial de colágeno difiere en su contenido y organización de la del tejido conjuntivo no dañado. El tejido intacto se compone en un 80 a un 90% de colágeno de tipo I y en un 10 a un 20% de colágeno de tipo III. En cambio, la matriz colágena de la herida inicial consta en un 30% de colágeno de tipo III. A mayor proporción del colágeno de tipo III hace que la matriz sea más débil [4].

La cicatriz resultante de las heridas dependen del tipo de cierre que haya presentado, se pueden mencionar dos categorías: cierre primario o por primera intención y cierre secundario o por segunda intención [9].

La cicatrización por cierre primario es la manera ideal de tratar una herida, ya que imposibilita una infección bacteriana; es común en las incisiones quirúrgicas pues la herida es creada en condiciones asépticas y los bordes son aproximados por suturas quirúrgicas. En este cierre, la muerte de células epiteliales y del tejido conjuntivo es relativamente escaso, por lo tanto, la regeneración epitelial predomina sobre la fibrosis y el resultado es una pequeña cicatriz [9, 10].

Las heridas por cierre secundario son aquellas en las se presenta una pérdida celular y tisular más extensa o que ya presentan la formación de abscesos y úlceras, por lo que en el proceso de reparación de la herida la reacción inflamatoria es más intensa, la reepitelación es debida a la contracción de la herida, acción de los miofibroblastos, y el tejido de granulación presenta un destacable desarrollo [9].

El proceso de cicatrización normalmente se lleva a cabo por sí solo y en periodos temporales diferentes dependiendo del tamaño y gravedad de la herida, su reparación y tratamiento reduce infecciones, molestias y complicaciones; sin embargo, existen factores que impiden o disminuyen la velocidad de cicatrización, como isquemia, hipoxia, infecciones y anormalidades metabólicas [1]. Es por eso que a lo largo del tiempo se han desarrollado diversos fármacos utilizados con el fin de mejorar la cicatrización de heridas,

algunos de esos medicamentos actuales son los esteroides, corticoides y combinaciones con antiinflamatorios y antimicrobianos [11]. Los fármacos con actividad cicatrizante que existen en la actualidad realizan su efecto estimulando el proceso regenerativo del área afectada, o mantienen las condiciones adecuadas [12], sin embargo, actúan puntualmente en un solo proceso de todos los que se llevan a cabo en las fases de la cicatrización, teniendo un único blanco de acción. Considerando además, que algunos fármacos presentan efectos secundarios que pueden llevar a enfermedades crónicas. No obstante, aún falta prevenir las cicatrices hipertróficas, las cicatrices queloides o hasta la cicatriz misma que deja la herida; por otro lado, los fármacos existentes se encuentran a precios disponibles sólo para una pequeña fracción de la población debido a sus elevados costos. Además, en regiones rurales y en países en vías de desarrollo es muy común el uso de la medicina tradicional para la sanación de sus heridas y/o enfermedades. Consecuentemente, se ha popularizado el tratamiento con productos de origen natural, como el propóleo, el cual ha sido utilizado durante años en diferentes civilizaciones [13] y se le atribuyen diversas propiedades biológicas, sin embargo, no han sido comprobados sus efectos cicatrizantes.

PROPÓLEO

El propóleo es un producto de abeja, con una composición química muy compleja, hecha de goma y el material balsámico recolectado por las abejas a partir de frutos, brotes florales, árboles y otros exudados resinosos de tejido vegetal. La palabra propóleo viene del griego ‘*pro*’ que significa “*en defensa de*” y ‘*polis*’ que significa “*ciudad*”, traduciéndolo como la defensa de la colmena [11]. El color del propóleo depende de su origen. Varía de marrón oscuro a pardo rojizo, con un tono verdoso. Tiene un olor típico, que puede variar de una muestra a otra o ser inodoro. En general, el etanol es el mejor disolvente para la preparación de propóleos, y otros disolventes como el éter etílico, el agua, el metanol y el cloroformo también pueden usarse para la extracción e identificación de compuestos de propóleo [14].

El propóleo obtenido de las colmenas, también conocido como propóleo en bruto, está compuesto por aproximadamente 50% de resina balsámica, 30% de cera, 10% de aceites

esenciales y aromáticos, 5% de polen y 5% de otras sustancias, incluidos fragmentos de madera [11].

Durante la producción de propóleo, las abejas mezclan la cera y el propóleo recolectados con la enzima 13-glicosidasa que se encuentra en la saliva, provocando la hidrólisis de los glucósidos de los flavonoides convirtiéndolos en agliconas flavonoides [15]. Posteriormente, el material recogido se aumenta con enzimas y secreciones salivales.

ANTECEDENTES

A lo largo del tiempo se ha utilizado una amplia variedad de productos naturales de origen apícola en el tratamiento de heridas debido a su fácil aplicación, inocuidad, bajo costo y efecto bactericida. El propóleo tiene varias propiedades terapéuticas, como antibacteriano, antiinflamatorio e inmuno-estimulador [16], anestésico [17], anticaries [15], antiviral [18]; además, el propóleo ha resultado ser tumoricida, antifúngico, antiamebiano y antipirético [15, 19]. Algunas otras propiedades biológicas y farmacológicas que se tienen registro sobre propóleo son, regeneración en el cartílago, hueso y pulpa dental; propiedades inmunológicas; defensa del hígado y actividad antitóxica; acciones antioxidantes e inmunomoduladoras [11].

En un estudio previo, se menciona que se ha demostrado en modelos de ratones y conejos, que las soluciones hidroalcohólicas del propóleo poseen actividad antiinflamatoria administrada de forma tópica, inyectable y oral [14]. El propóleo se utiliza notablemente en dermatología para la cicatrización de heridas, el tratamiento de las úlceras externas y quemaduras, actuando en la reducción del tiempo de curación, el aumento de la contracción de la herida y la aceleración de la reparación tisular [20]. Recientemente, se realizó una comparación de las propiedades biológicas de extractos etanólicos de propóleo de diferentes estados de la República Mexicana, los cuales presentaron actividad antimicrobiana en *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Vibrio cholerae*; además, de resultar con actividad antiamebiana, antioxidante y antiinflamatoria [21]. Por otro lado, se ha reportado que la elaboración de un extracto hidroalcohólico de propóleo rojo en películas a base de colágeno, fueron capaces de

mejorar la cicatrización de la herida, probablemente por la modulación de la dinámica de la evolución inflamatoria [22]. Dadas estas propiedades biológicas como antecedentes se ha decidido probar el uso del extracto etanólico un propóleo de origen chihuahuense (EEPC) en un modelo de cicatrización, ya que estos reportes indican que el propóleo puede ser participe en una o varias fases del proceso de cicatrización.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar las propiedades biológicas del extracto etanólico del propóleo de Chihuahua (EEPC) implicadas en el proceso de cicatrización.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar la composición química del EEPC.
2. Evaluar la capacidad antioxidante del EEPC.
3. Determinar la actividad antibacteriana del EEPC en bacterias comúnmente encontradas en heridas de piel.
4. Estimar la capacidad antiinflamatoria del EEPC mediante el método de edema auricular inducido por xilol.
5. Realizar un ensayo de toxicidad aguda (vía tópica).
6. Evaluar la eficacia de cicatrización del EEPC.
 - 6.1 Establecer la velocidad de cierre del EEPC.
 - 6.2 Determinar la fuerza de cicatrización del EEPC por el método tensiométrico.
7. Describir el efecto cicatrizante del EEPC mediante las modificaciones en la arquitectura histológica de la herida.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DEL PROPÓLEO

El propóleo que se utilizó para la realización de este estudio fue colectado en el año 2013, por el equipo de trabajo del Laboratorio de Inmunobiología, obtenido de un apiario del Ejido Concordia ubicado en la zona centro de Chihuahua, abarcando los municipios de Aquiles Serdán y Chihuahua (Apéndice 2). Posteriormente, el propóleo se depuró de materia de origen animal o vegetal ajenos, que pudieran estar presentes al momento de su colecta.

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

El extracto etanólico del propóleo de Chihuahua se obtuvo mediante el método de maceración [23]. Se determinó el peso seco del propóleo (300 g) y se colocó en un matraz con alcohol etanólico en una proporción 1:20, propóleo/solución; de esta manera se obtuvo el extracto etanólico crudo del propóleo, el cual se filtró y destiló a presión reducida en un rotavapor. Para completar la evaporación del solvente el extracto se colocó en charolas de vidrio. El rendimiento del extracto se determinó por diferencia de peso con relación al peso seco del propóleo.

Propiedades organolépticas.

Son todas aquellas descripciones de las características físicas que tiene el extracto en general, para las cuales se utilizó como referencia la NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento.

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL PROPÓLEO DE CHIHUAHUA

Partición por gradiente de polaridad del EEPC.

Se realizó un fraccionamiento del extracto del propóleo con un sistema de partición con solventes de polaridad baja (hexano), media (diclorometano) y alta (metanol) a partir de 1 g del extracto. Con el fin de identificar los compuestos presentes en el extracto con el abanico de polaridades obtenidas. Los rendimientos de cada una de las fracciones que se obtuvieron del EEPC se calcularon con relación al peso seco de un gramo del extracto con respecto al peso seco de cada una de las fracciones

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Se inyectaron al equipo 30 μL de las particiones, a una concentración de 3 mg/mL de EEPC con MeOH grado HPLC. El HPLC se realizó bajo las siguientes condiciones: una columna Discovery C-18, de 250 x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 μm . Corrida isocrática con mezcla de MeOH-acetonitrilo-agua (25-25-50), flujo de 1 mL/min. Detector de arreglo de diodos (DAD) a longitud de onda de 260 nm con barrido completo de 200-400 nm. Además, se inyectaron 30 μL de 15 estándares de flavonoides (vainillina, quercetina, catequina, luteolina, pinocembrina, crisina, baicaleina, myricetina, naringenina, naringina, ácido gálico, catecol, apigenina, acetina, caempferol) con una concentración de 1 mg/mL.

Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)

Se inyectaron en el equipo 1 μL de las particiones del EEPC a una concentración de 3 mg/mL. Se empleó un cromatógrafo 6850 Network GC System de Agilent Technologies acoplado a un espectrómetro de masas 5975C VL MSD con detector de triple eje, de la misma marca, equipado con una columna capilar RTX de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de grosor, compuesta de dimetil polisiloxano (95 %) y fenil polisiloxano (5 %). El modo de inyección que se utilizó fue un Split, radio 80:1, flujo de corrida 37 cm/s. La temperatura del horno se programó de la siguiente forma: temperatura inicial de 70 °C durante dos minutos tras lo cual se incrementó a 8 °C/min hasta alcanzar los 270°C y después a 10 °C/min durante seis minutos. El tiempo total fue de 75 minutos; temperatura de la línea de transferencia 290 °C. Los espectros de masas que fueron obtenidos por impacto electrónico; se obtuvieron con una energía de ionización de 70 electrones Volts (eV) y se detectaron en un rango de masa desde 35 a 600 m/z. Se empleó helio como gas de arrastre. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por medio de la base de datos de la biblioteca NIST [24] y la PubMed Compound del National Center of Biotechnology Information [25].

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

Se llevó a cabo mediante el método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH), método modificado de Murillo [26]. La actividad antioxidante se evaluó midiendo el grado de decoloración (desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro), de una solución metanólica de DPPH, por medio de espectrofotometría UV-VIS. Se inició

preparando un stock del EEPC de 5 mg en 5 mL de metanol. La Capacidad Antioxidante Media (CA₅₀) del propóleo se determinó utilizando las concentraciones: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, y 100 ppm, en un volumen total de 1 mL. Para las primeras cuatro concentraciones se realizó un nuevo stock a partir del stock de 5 mg/5 mL tomando 20 µL y agregando 180 µL de metanol.

En una placa de 96 pozos de fondo plano se adicionaron 50 µL de la solución problema a diferentes concentraciones por triplicado (1-100 ppm), el solvente utilizado fue metanol grado HPLC. Posteriormente, a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionaron 150 µL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final fue de 100 µg/mL; inmediatamente se protegió de la luz y se mantuvo en agitación constante durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se determinó la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA SLT Spetra; el blanco fue de 200 µL de metanol en los pozos y como control positivo se usó quercetina en las mismas concentraciones que el compuesto problema [26]. Los resultados son reportados obteniendo el porcentaje de reducción calculándolos con la siguiente fórmula:

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

En donde:

C= Absorbancia del control (DPPH con metanol)

E= Absorbancia del experimental (Mezcla DPPH + compuesto problema).

Determinación de fenoles totales.

Se cuantificaron los fenoles totales por el método modificado de Singleton [27] (Apéndice 3), mediante espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, utilizando el reactivo de Follin-Ciocalteu como agente oxidante. Se preparó una curva de calibración con ácido gálico (0.2 mg/mL). Se tomaron alícuotas seriadas de ácido gálico (0.00625, 0.012, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL), a cada una se le agregó el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen de 1 mL. Se tomó 1 mL de cada una de las concentraciones (ácido gálico y propóleo) y se transfirió a un tubo de ensayo con 7 mL de agua destilada, a continuación se

adicionó 500 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de cinco minutos se añadieron 1.5 mL de una solución de Na_2CO_3 (200 g/L). Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 760 nm. Cada concentración se determinó por triplicado y los resultados se expresaron en equivalentes de ácido gálico/g de propóleo.

Determinación de flavonoides totales.

Los flavonoides totales se determinaron usando una curva patrón de quercetina (0-100 mg/L). Para el análisis de flavonoides totales del propóleo, se preparó 1 mL de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 2% en MeOH y se mezclaron con 1 mL del stock del extracto de propóleo (Apéndice 6). La prueba se hizo por triplicado. Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 415 nm. Los resultados se expresan como equivalentes de quercetina/g de propóleo [28].

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Se determinó por el método de difusión en agar Kirby-Baüer [29]. Las bacterias ocupadas fueron: *S. aureus* y *S. epidermidis*, como Gram (+); *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli*, como Gram (-). Todas las bacterias fueron trabajadas bajo el mismo método y obtenidas del Laboratorio de Farmacognosia. Se inició preparando medio de cultivo Müeller-Hinton. Con un asa de siembra se tomaron 4 o 5 colonias de bacterias sumergiéndola en 10 mL de caldo Müeller-Hinton, con el fin de descargar las colonias en el tubo de cultivo el cual se incubó a 37°C durante 24 horas, hasta alcanzar una concentración de 1.5×10^8 UFC/mL.

Para la evaluación antibacteriana se sembraron las bacterias en una caja Petri con una placa de agar Müeller-Hinton, para ello se sumergió un hisopo estéril en la suspensión de bacterias eliminando el exceso de líquido, con este hisopo se sembró por estría en tres direcciones de la placa de agar con el fin de abarcar toda el área posible; para finalizar se colocaron los sensidiscos previamente impregnados con el EEPC a una concentración de 6 mg/sensidisco, como control positivo se usó 25 μ g/sensidisco de cloranfenicol y como control negativo se utilizaron 10 μ /sensidisco de etanol al 80%. Cada ensayo se hizo por triplicado.

ORGANISMOS

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) de la cepa CD-1, tanto hembras como machos, de 4 a 6 semanas de edad proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-I) UNAM. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones de laboratorio durante el periodo del tratamiento y recibieron alimento estandarizado, agua y todos los requerimientos según la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 [30]; además, se mantenían en el Laboratorio de Inmunobiología cinco días antes del inicio de cada ensayo para su acondicionamiento.

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

La evaluación del efecto antiinflamatorio agudo se realizó por el método del edema auricular y de edema plantar. Para el edema auricular se utilizaron 15 ratones en total, para esta evaluación es necesario mantener a los animales en ayuno de cuatro horas. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en los diferentes grupos experimentales y se agruparon al azar en tres grupos de cinco individuos cada uno, quedando distribuidos de la siguiente manera:

Número de ratones	Grupo experimental	Tratamiento
5	Control negativo	Xilol 50 µL del lado interno y 50 µL del lado externo de la oreja derecha
5	Control positivo	Xilol + diclofenaco 50 µL del lado interno y 50 µL del lado externo de la oreja derecha
5	Propóleo 10%	Xilol + extracto al 10%, 10 mg del lado interno y 10 mg del lado externo de la oreja derecha
5	Propóleo 50%	Xilol + extracto al 50%, 10 mg del lado interno y 10 mg del lado externo de la oreja derecha

Se inició anestesiando a los ratones con 250 µL de isoflurano, posteriormente se les aplicó xilol por vía tópica en la parte interna y externa de la oreja a todos los ratones, ya transcurridos 30 minutos se comenzó con la aplicación al control positivo del diclofenaco

vía tópica, para continuar con la aplicación del tratamiento del propóleo y se dejó un intervalo de una hora entre cada tratamiento. Al cabo de 4 horas después de la aplicación del xilol, se sacrificaron los ratones y con ayuda de un punzón de biopsias de 5 mm de diámetro (Biopsy Punch) se obtuvieron los cortes de ambas orejas atravesándolas por completo y se determinó la respuesta inflamatoria por el aumento de peso en el área lesionada por el agente químico, utilizando una balanza analítica. Los cortes de las orejas fueron sometidos a la técnica histológica para su posterior análisis.

TOXICIDAD DÉRMICA

En este ensayo se utilizaron un total de 10 ratones machos, a los cuales 24 horas antes del estudio se les depiló aproximadamente el 10% del dorso. Esta prueba se realizó con base en el método modificado de la OECD [31], que consistió en realizar una aplicación puntual de los tratamientos dos veces al día durante un periodo de 14 días. Se utilizaron dos concentraciones del EEPC al 50% y al 10%, con cinco organismos por tratamiento y se les mantuvo bajo observación, reportando cualquier cambio físico como la aparición de eritemas, formación de escara, edema, agresividad o pasividad, piloerección, convulsiones o muerte, a la vez que se realizaba un registro fotográfico. Al finalizar, se recuperó la piel en donde fue aplicado el tratamiento para su observación histológica y se extrajo el hígado y los riñones de cada organismo, con el fin de pesarlos y compararlos estadísticamente con el grupo control, a un nivel de significancia $P < 0.05$.

EFICACIA DE CICATRIZACIÓN

Velocidad de cierre.

Para iniciar el tratamiento los ratones fueron depilados con crema depilatoria corporal piel sensible Veet, 24 horas antes del inicio de los tratamientos, posteriormente los ratones se anestesiaron con Isoflurano al 5% [32] (Apéndice 7). Una vez anestesiados se procedió a realizar las lesiones con un punzón para biopsias (Biopsy Punch) de 5 mm de diámetro, considerando retirar las tres capas de la piel (epidermis, dermis e hipodermis) a todos los ratones. Inmediatamente se medía la herida con un vernier electrónico, llevando un seguimiento diario del diámetro de la lesión para reportar los resultados en porcentaje de cierre el cual se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de cierre} = 100 - \frac{Dd * 100}{Di}$$

Dónde:

Dd = diámetro del día.

Di = diámetro inicial.

Para este estudio hubo seis grupos experimentales (Cuadro 1), con cinco ratones por cada uno, los cuales fueron: EEPC al 10%, EEPC al 50%, Recoverón NC (Apéndice 8), herida sin tratamiento y piel sana.

Cuadro 1. División de los grupos experimentales.

Número de ratones		Grupo experimental
5		EEPC al 10%
5		EEPC al 50%
5		Recoverón NC
5		Herida sin tratamiento
5		Piel sana
Total	25	

Todos los tratamientos se aplicaron mediante vía tópica dos veces al día durante 10 días. Al finalizar, los ratones se sacrificaron utilizando una cámara de CO₂; inmediatamente a su muerte se procedió a la obtención de las muestras de piel con un margen de 5 mm a la herida para su tratamiento histológico, para lo cual se siguió la técnica histológica convencional (Apéndice 7) y la tinción H-E (Apéndice 8), con el fin de observar y comparar la arquitectura histológica de las muestras.

Fuerza de cicatrización.

Se trabajaron cinco grupos experimentales, conformados por cinco ratones cada uno, los cuales fueron: EEPC al 10%, EEPC al 50%, Recoverón NC, herida sin tratamiento y piel sana (Cuadro 2).

Cuadro 2. Distribución de grupos experimentales y sus particularidades.

Número de ratones	Presencia de lesión	Grupo	Tratamiento
5	Sí	Propóleo 10%	EEPC al 10%
5	Sí	Propóleo 50%	EEPC al 50%
5	Sí	Recoverón NC	Recoverón NC
5	Sí	Herida	Sin tratamiento
5	No	Piel sana	Sin tratamiento

Un día previo al inicio del experimento, todos los ratones fueron depilados con crema depilatoria corporal piel sensible Veet. Posteriormente, los ratones a los cuales se les realizó la lesión se anestesiaron con Isoflurano al 5% [32] (Apéndice 7); una vez anestesiados se procedió a realizar las lesiones de 1 cm de longitud, considerando que la profundidad de la lesión debe atravesar las tres capas de la piel. Los tratamientos se aplicaron dos veces al día durante diez días.

Al término del tratamiento, se evaluó la fuerza con la que se abre la cicatriz de la lesión mediante el método tensiométrico [33] (Apéndice 11) para evaluar y comparar la eficacia en el proceso de cicatrización bajo los tratamientos experimentales.

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

$$Fuerza\ de\ cierre\ (\%) = \frac{GC}{GS} \times 100$$

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

GS = gramos para abrir la piel sana.

RESULTADOS

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

Como resultado del método de maceración se obtuvieron 202.45 g de EEPC, dando un rendimiento del 67.5% con respecto a su peso seco (300 g) (Figura 1).

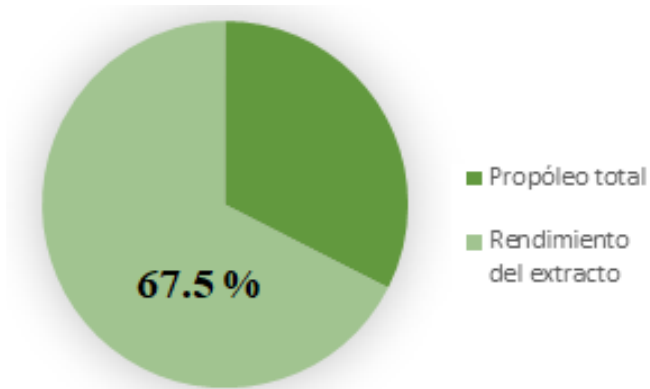


Figura 1. Rendimiento del EEPC.

Propiedades organolépticas.

De las especificaciones físicas se llegó a las siguientes observaciones del cuadro 3.

Cuadro 3. Características organolépticas del EEPC.

Parámetro	Características
Color	Amarillo-oscuro.
Aroma	Balsámico.
Sabor	Suave balsámico.
Consistencia	A temperatura ambiente, maleable y pastoso.

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL PROPÓLEO DE CHIHUAHUA

Partición por gradiente de polaridad del EEPC.

Del fraccionamiento del EEPC con solventes de diferente polaridad se obtuvieron los rendimientos que se muestran en la figura 2.

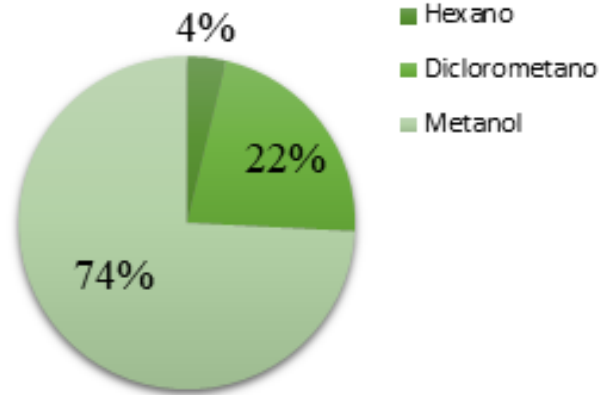


Figura 2. Rendimiento de las tres fracciones obtenidas a partir del EEPC.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Se caracterizó químicamente el EEPC completo por medio de HPLC y se obtuvo el espectro que se muestra en la figura 3, así como los compuestos que lograron ser identificados de acuerdo con sus máximas absorciones bajo luz ultra violeta ($\lambda_{\text{máx}}$) y al tiempo de retención que presentaron (Cuadro 4). Para ello la muestra fue comparada con 15 estándares de flavonoides ya mencionados anteriormente, los cuales son con los que se cuenta en el laboratorio.

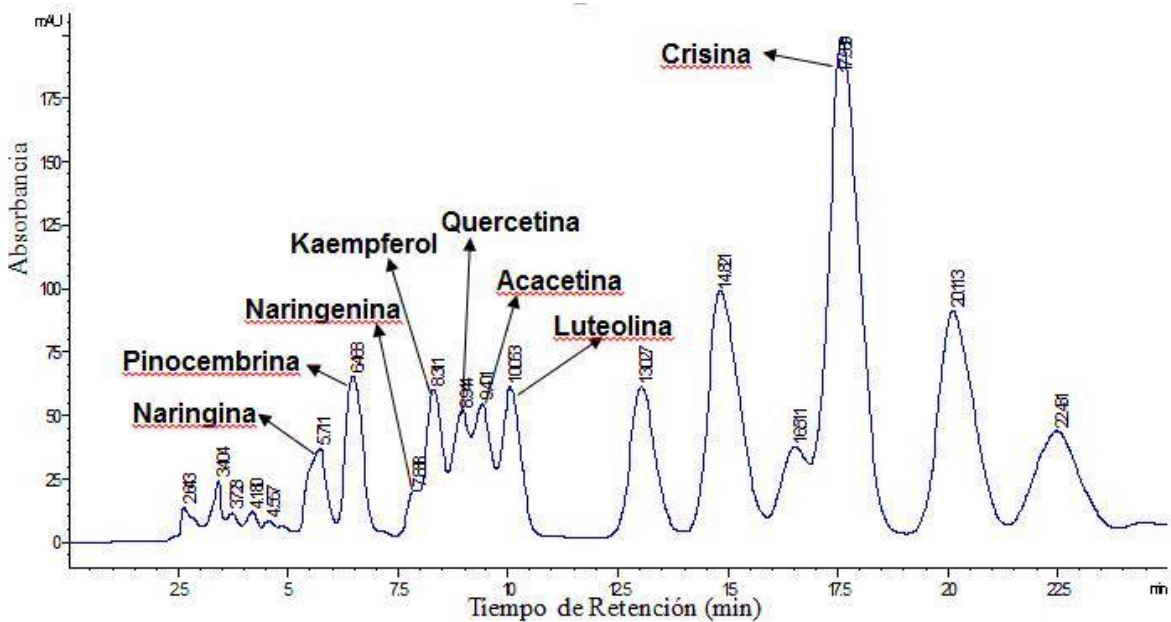
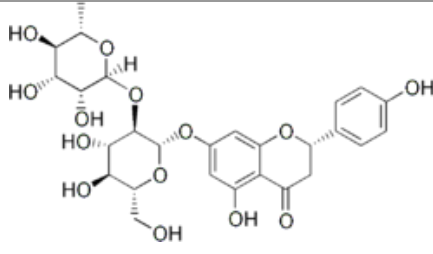
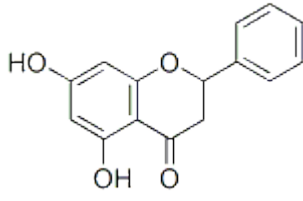
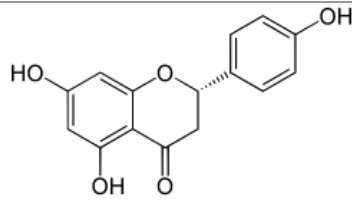
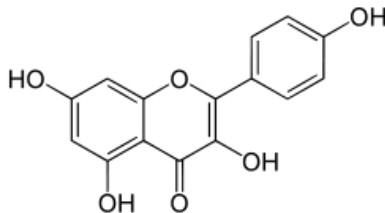
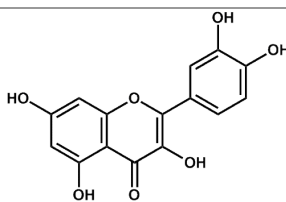
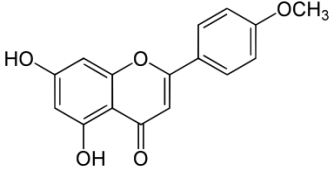
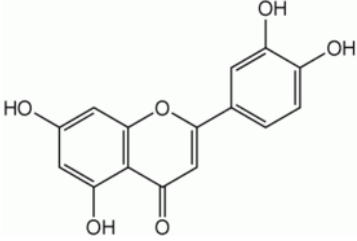
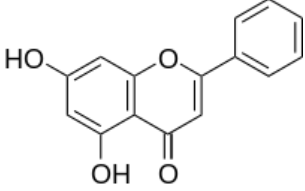


Figura 3. Cromatograma en HPLC del EEPC completo. Cada pico fue comparado con los estándares que se cuentan en el laboratorio para determinar los compuestos.

Cuadro 4. Compuestos químicos identificados en el EEPC completo con el HPLC.

Tiempo de Retención (min)	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	Compuesto	Estructura química
2.64	270	Fenol	
3.40	260	Fenol	
3.72	224, 296, 312	N. I.	
4.18	212, 292, 328	N. I.	
4.56	262	Flavanona	
5.71	286	Naringina	
6.48	228, 290	Pinocembrina	
7.88	228, 286	Naringenina	
8.31	266, 356	Kaempferol	
8.94	256, 370	Quercetina	

9.40	266, 350	Acacetina	
10.05	254, 268, 356	Luteolina	
13.02	258, 298, 356	N. I.	
14.82	228, 288	Flavanona	
16.51	226, 294	Flavanona	
17.58	212, 266, 312	Crisina	
20.11	264, 310, 358	Flavonol	
22.48	266, 358	Flavonol	

Nota: Se muestra el tiempo de retención y $\lambda_{\text{máx}}$ de cada uno de los compuestos identificados. N.I.= no identificado.

Además, cada una de las tres fracciones que se obtuvieron a partir del EEPC también fueron sometidas a su análisis químico mediante HPLC, identificando los compuestos mediante la comparación de los tiempos de retención y la $\lambda_{\text{máx}}$ de los espectros mostrados en los cromatogramas (Apéndice 3) con los 15 estándares de flavonoides mencionados con anterioridad, para determinar los metabolitos secundarios presentes en cada una de las fracciones, adicionalmente se realizó una comparación de los compuestos presentes entre cada fracción y el extracto completo (Cuadro 5).

Cuadro 5. Comparación de los compuestos identificados en cada una de las fracciones del EEPC mediante HPLC.

Fracción Compuesto	Completo	Hexánica	Diclorometánica	Metanólica
Crisina	X	X	X	X
Naringina	X	X		X
Pinocembrina	X	X	X	X
Naringenina	X		X	
Kaempferol	X			X
Quercetina	X			X
Acacetina	X		X	X
Luteolina	X			X
Fenantreno			X	
Catequina				X

Así mismo, se realizó una búsqueda bibliográfica sobre la actividad antibacteriana, antiinflamatoria, antioxidante y proliferativa de los compuestos identificados mediante HPLC tanto del EEPC completo como el de las fracciones (Cuadro 6).

Cuadro 6. Actividades biológicas reportadas sobre los compuestos identificados mediante HPLC tanto del EEPC completo como el de las fracciones.

Compuesto	Antibacteriana	Antiinflamatorio	Antioxidante	Proliferativa
Crisina	Zeghad y Merghem, 2013 ^[34] .		Jabbaria y Gharibb, 2012 ^[35] . Zeghad y Merghem, 2013 ^[34] .	

Naringina	Salas <i>et al.</i> , 2011 _[36] . Cvetnic y Vladimir-Knezevic, 2004 _[37] .	Ribeiro <i>et al.</i> , 2008 _[38] .	Díaz-Uribe <i>et al.</i> , 2016 _[39] . Makovsek, 2013 _[40] .	Song <i>et al.</i> , 2017 _[41] .
Pinocembrina	Modak <i>et al.</i> , 2002 _[42] . Vargas-Sánchez <i>et al.</i> , 2013 _[43] . Yang <i>et al.</i> , 2010 _[44] . Rasul <i>et al.</i> , 2013 _[45] .	Sala <i>et al.</i> , 2003 _[46] . Rasul <i>et al.</i> , 2013 _[45] . Zhou <i>et al.</i> , 2015 _[47] . Lan <i>et al.</i> , 2016 _[48] .	Tanjung <i>et al.</i> , 2013 _[49] . Vargas-Sánchez <i>et al.</i> , 2015 _[43] .	-
Naringenina	Salas <i>et al.</i> , 2011 _[46] .	Ribeiro <i>et al.</i> , 2008 _[38] . Fan <i>et al.</i> , 2017 _[50] . Pinho-Ribeiro <i>et al.</i> , 2016 _[51] .	Jabbaria y Gharibb, 2012 _[35] .	Helle <i>et al.</i> , 2014 _[52] .
Kaempferol	Zeghad y Merghem, 2013 _[34] .	Cheng <i>et al.</i> , 2013 _[53] .	Zeghad y Merghem, 2013 _[34] . Cheng <i>et al.</i> , 2013 _[53] .	-
Quercetina	Zeghad y Merghem, 2013 _[34] .	Riberio <i>et al.</i> , 2007 _[38] . Cheng <i>et al.</i> , 2013 _[53] .	Pinelo <i>et al.</i> , 2004 _[54] . Hollman <i>et al.</i> , 1997 _[55] . Zeghad y Merghem, 2013 _[34] . Cheng <i>et al.</i> , 2013 _[53] .	-
Acacetina	Zhao <i>et al.</i> , 2014 _[56] .	Abdallah <i>et al.</i> ,		

		2015 ^[57] .	Vargas-Sánchez <i>et al.</i> , 2014 ^[43] . Cabral <i>et al.</i> , 2009 ^[58] .	
Luteolina	Zeghad y Merghem, 2013 ^[34] .	Li <i>et al.</i> , 2014 ^[59] . Cheng <i>et al.</i> , 2013 ^[53] . Seelinger <i>et al.</i> , 2008 ^[60] . Ueda <i>et al.</i> , 2002 ^[61] .	Seelinger <i>et al.</i> , 2008 ^[60] . Zeghad y Merghem, 2013 ^[34] . Cheng <i>et al.</i> , 2013 ^[53] .	
Fenantreno	Ren <i>et al.</i> , 2016 ^[62] .	Kanekar <i>et al.</i> , 2013 ^[63] .	Kanekar <i>et al.</i> , 2013 ^[63] . Ding <i>et al.</i> , 2012 ^[64] .	
Catequina	Girardi <i>et al.</i> , 2014 ^[65] .	Suzuki <i>et al.</i> , 2005 ^[66] . Lambert <i>et al.</i> , 2005 ^[67] .	Martínez-Flores <i>et al.</i> , 2002 ^[68] . Pérez, 2003 ^[69] .	

Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)

Se sometieron a análisis por CG-EM las tres fracciones obtenidas a partir del EEPC, los espectros y algunos de los compuestos identificados en cada una de las fracciones se pueden ver en las figuras siguientes; sin embargo, en el apéndice 4 se muestran el tiempo de retención y el porcentaje de abundancia de cada uno de los compuestos identificados y los espectros de cada una de las fracciones. La identificación de los metabolitos secundarios se realizó con base a los cromatogramas y los tiempos de retención de cada pico en ellos, los cuales se compararon y confirmaron con los espectros de masas de la base de datos NIST.

En la partición hexánica se identificaron 12 compuestos arrojando el espectro de la figura 4, donde el compuesto con mayor abundancia es el éster metílico del ácido 9-octadecenoico con el 20.11%, seguido del 14-metil, metil éster del ácido pentodecenoico con 18.65% y la 2-nonadecanona con 14.47%.

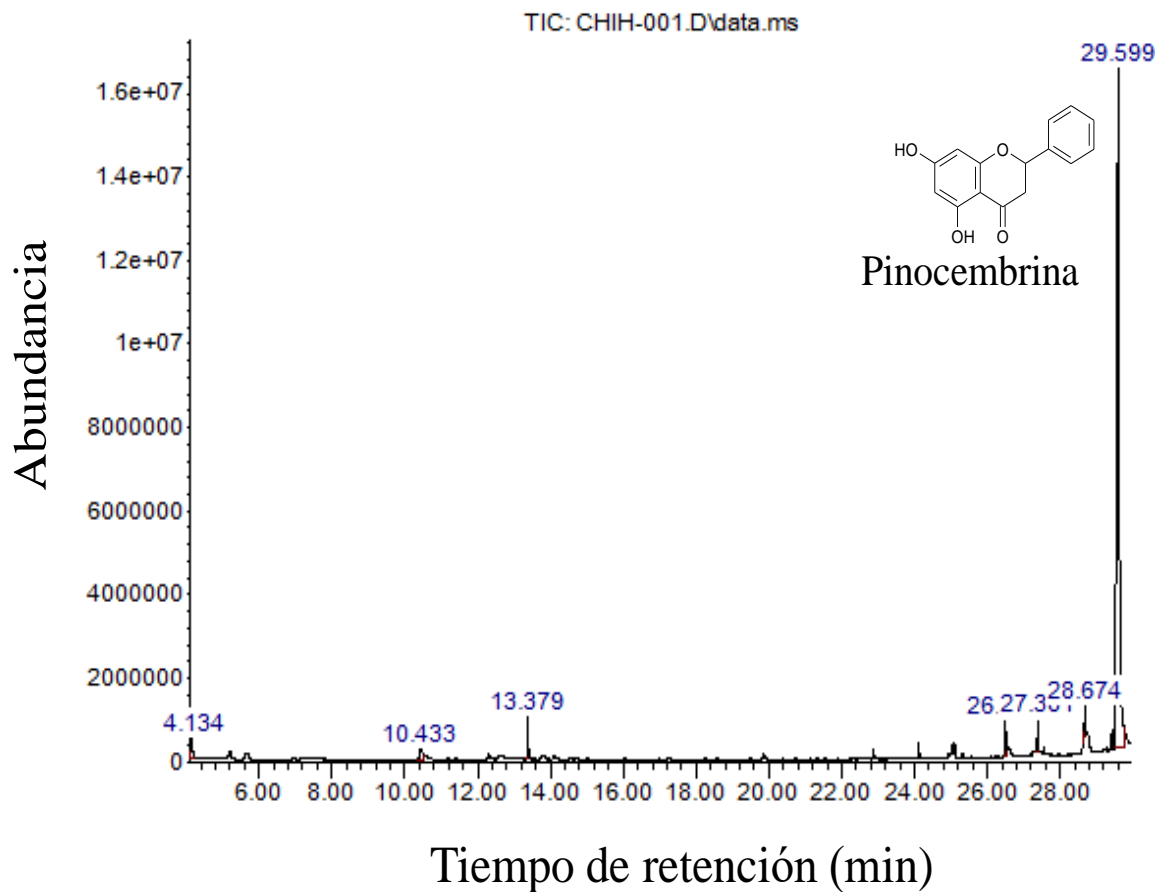


Figura 5. Cromatograma de la partición con diclorometano del EEPC, en GC-MS.

Finalmente, en la fracción metanólica del EEPC se identificaron seis compuestos de los cuales la pinocembrina resultó el compuesto mayoritario con 10.27%, mientras que los otros cinco compuestos sólo se presentan en menos del 3% (Figura 6).

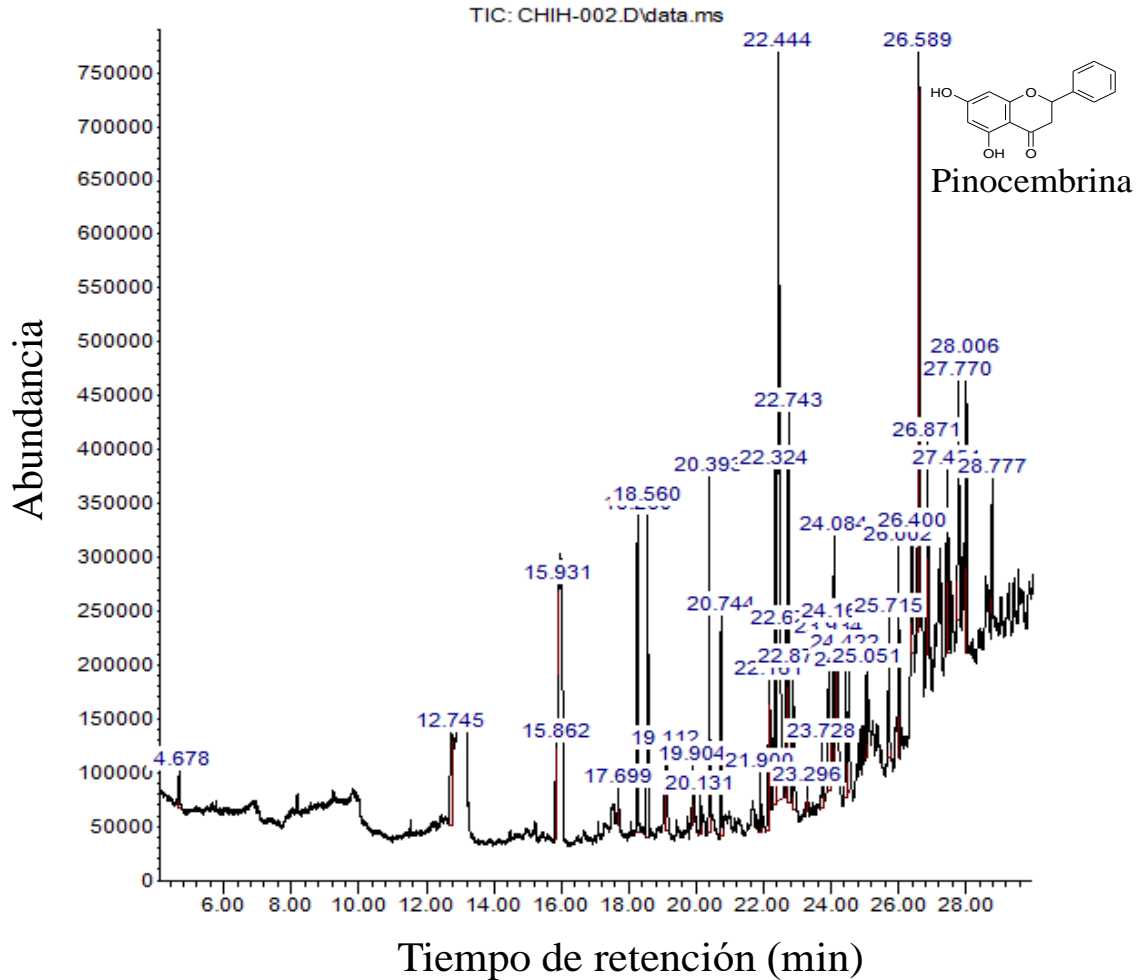


Figura 6. Cromatograma de la partición metanólica del EEPC, en GC-MS.

Cabe destacar que se encontraron diferencias en cuanto a la composición química de cada fracción, las cuales se muestran en el cuadro 7, en donde se muestra el nombre común de los compuestos y su abundancia según el CG-EM.

Cuadro 7. Compuestos identificados en cada fracción del EEPC mediante CG-EM.

Hexánica		Diclorometánica		Metanólica	
Compuesto	Abundancia %	Compuesto	Abundancia %	Compuesto	Abundancia %
Éster metílico del ácido oléico	20.113%	Pinocembrina	89.02%	Pinocembrina	10.273%
14-metil-,	18.651%	N.I.	2.35%	Tetracosanoa	2.954%

metil éster del ácido pentadecanoico				to de metilo	
2-Nonadecanona	14.466%	2-Nonadecanona	1.67 %	Isohexadecanoato de metilo	2.438%
Eicosano	7.806%	Chalcona pinostrobina	1.62%	Crisina	2.275%
α bisabolol	7.529%	Fenilacetona	1.55%	Tectocrisina	2.270%
Metil 18-metilnonadecanoato	6.435%			Ester metílico del ácido oléico	1.009%
Metil éster del ácido behénico	5.999%				
2-Heptadecanona	5.144%				
Éster metílico del ácido octadecanoico	4.550%				
E-3-Pentadecen-2-ol	1.112%				
Miristato de metilo	0.664%				
Metil éster del ácido heneicosanoico	0.445%				

Cabe destacar que por medio de esta técnica se encontró la presencia de la 2-nonadecanona tanto en la fracción hexánica como en la diclometánica, además de que se encontró la presencia de crisina y pinocembrina, los cuales también se identificaron por HPLC, aunado a lo anterior, la pinocembrina es el compuesto mayoritario en dos de las tres fracciones sometidas a CG-EM. Dada la variedad de metabolitos secundarios identificados en las tres fracciones del EEPC se realizó una búsqueda bibliográfica de las actividades

antiinflamatoria, antioxidante, antibacteriana y proliferativa de cada uno de los compuestos como en el caso de los metabolitos secundarios identificados por HPLC (Cuadro 8).

Cuadro 8. Actividades biológicas reportadas sobre los compuestos identificados mediante CG-EM de las tres fracciones del EEPC.

Compuesto	Antibacteriana	Antiinflamatorio	Antioxidante	Proliferativa
2-Nonadecanona	Fujimoto, 2017 ^[70] . Da Costa, 2009 ^[71] .			
Eicosano				Berry <i>et al.</i> , 2016 ^[72] .
α bisabolol	Kamatou y Viljoen, 2010 ^[73] . Oliveira <i>et al.</i> , 2017 ^[74] . Vila <i>et al.</i> , 2010 ^[75] .	Kamatou y Viljoen, 2010 ^[73] . Ortiz <i>et al.</i> , 2016 ^[76] .	Kamatou y Viljoen, 2010 ^[73] .	
Tectocrisina			Muñoz y Copaja, 2007 ^[77] .	
Chalcona pinostrobinina	Cabral, 2008 ^[78] . Reidel, 2014 ^[79] .	Tuchinda <i>et al.</i> , 2002 ^[80] .	Almeida <i>et al.</i> , 2011 ^[81] .	

EVALUACIÓN ANTIOXIDANTE.

Las mediciones del consumo del radical DPPH⁺ se relacionan con la capacidad intrínseca de una sustancia o una mezcla compleja para donar átomos de hidrógeno o electrones a esta especie reactiva en un sistema homogéneo. El extracto etanólico del propóleo de Chihuahua presentó una actividad antioxidante media (CA₅₀) de 15.75 µg/mL (Figura 7). El extracto se comparó con la quercetina la cual es un flavonoide que posee una alta capacidad

antioxidante. La CA_{50} de la quercetina ($1.89 \mu\text{g/mL}$) fue mucho menor a la que se obtuvo con el propóleo; sin embargo, se debe considerar que la quercetina es un compuesto puro, y según el criterio de Al-Fatimí y colaboradores [82] donde se refieren a que una CA_{50} menor de $96.6 \mu\text{g/mL}$ para extractos se considera con buena capacidad antioxidante, podemos inferir que para tratarse de una mezcla de compuestos en el propóleo, su CA_{50} es considerablemente buena.

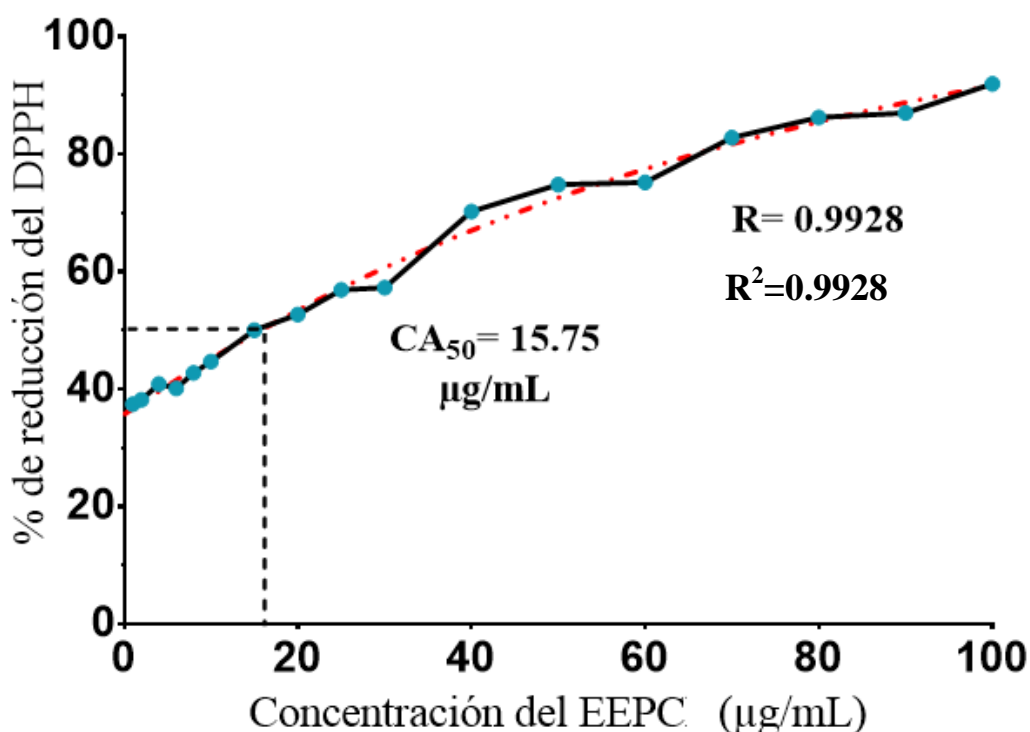


Figura 7. Capacidad antioxidante del EEPC. Los datos representan el promedio de tres repeticiones independientes.

Determinación de fenoles totales.

Dado que se correlaciona la capacidad antioxidante de los extractos con el contenido de compuestos fenólicos en la composición química de los mismos se decidió cuantificar los fenoles totales en el propóleo. Se encontró que el extracto posee una concentración de fenoles totales de 314 mg de equivalentes de ácido gálico por gramos de propóleo lo que representa el 31.4% del propóleo total (Figura 8).

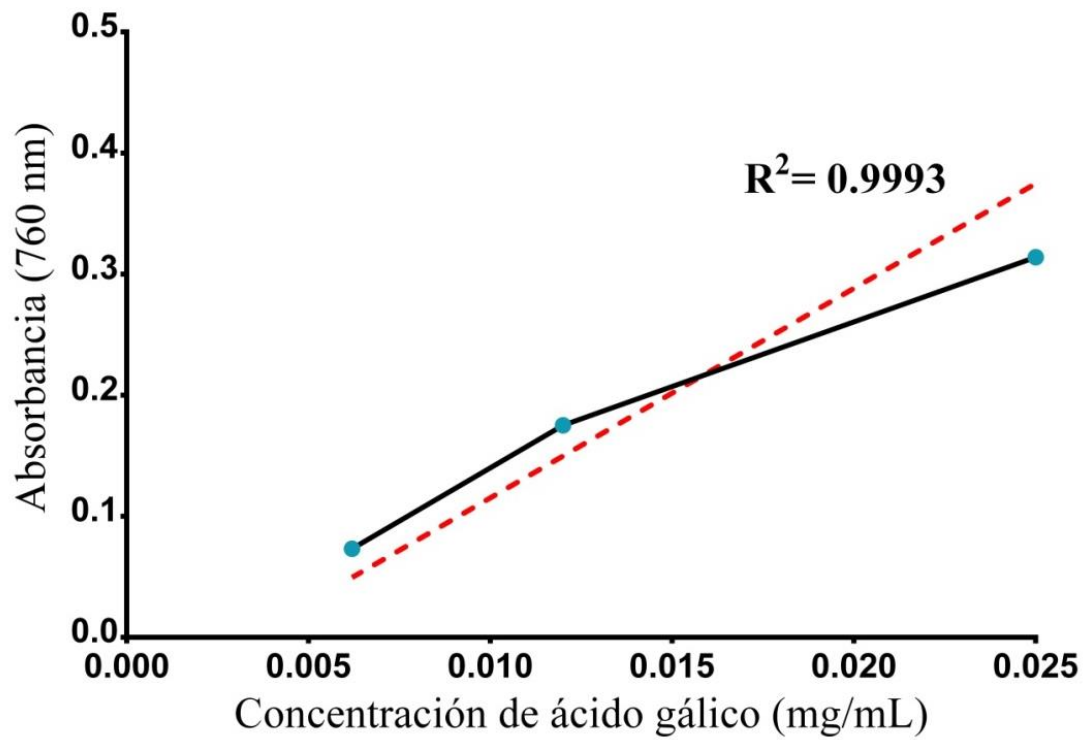


Figura 8. Curva patrón de ácido gálico donde se interpoló la absorbancia que presentó el EEPC para determinar la concentración de fenoles totales de la muestra.

Determinación de flavonoides totales.

Ya que el propóleo presentó fenoles dentro de su composición química, se procedió a determinar la concentración de flavonoides totales en el mismo, los cuales son un subgrupo de los fenoles y son conocidos por poseer una alta actividad antioxidante dada su capacidad para atrapar especies reactivas de oxígeno y radical nitrógeno. El propóleo tuvo una concentración de 62.58 mg de eQ/g (Figura 9), lo que equivale al 6.7% del extracto.

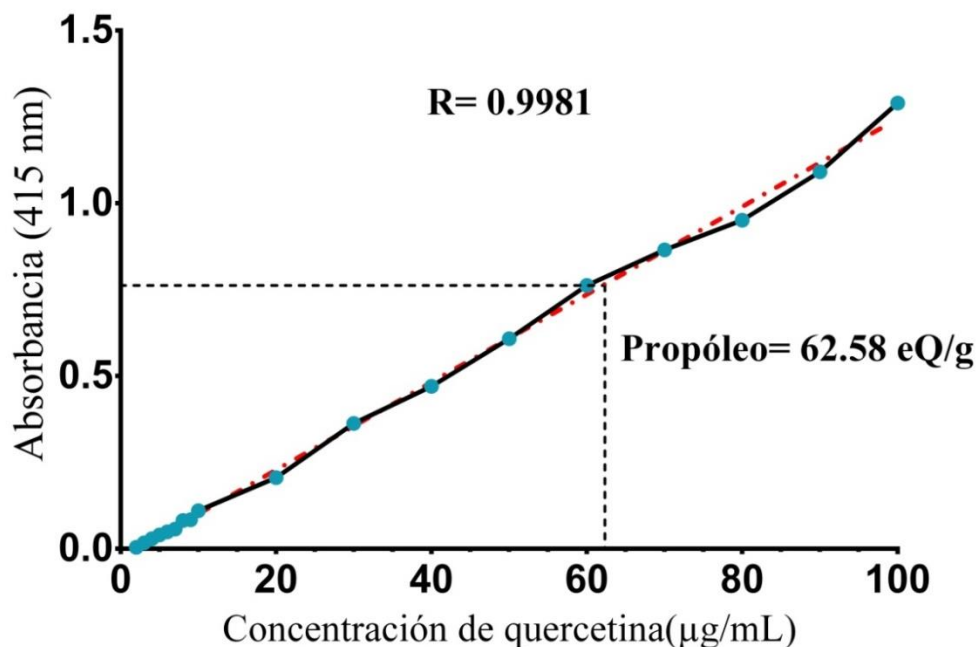


Figura 9. Curva patrón donde se interpoló la muestra de propóleo para determinar los flavonoides totales de la muestra.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

En esta evaluación se obtuvo como resultado una evidente inhibición bacteriana en las bacterias Gram (+) (Figura 10 a) y b)), las cuales son *S. epidermidis* y de *S. aureus*; sin embargo, en las bacterias Gram (-) se presentó un halo de inhibición muy pequeño y en caso de *E. coli*, nulo (Figura 10 c) y d)). Cabe mencionar que todas las cepas fueron sensibles al cloranfenicol.

Gram (+)

a) *S. aureus*



b) *S. epidermidis*



Gram (-)

c) *P. aeruginosa*



d) *E. coli*

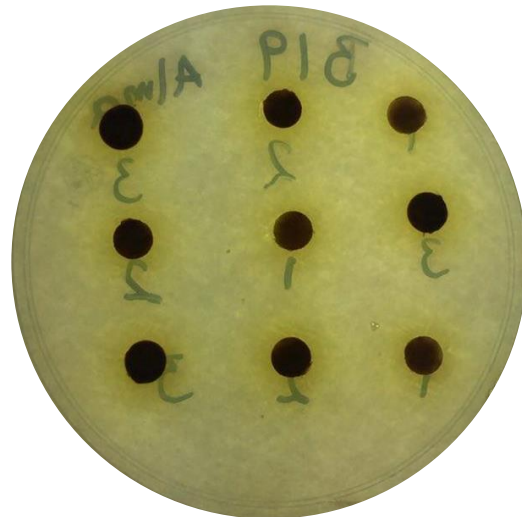


Figura 10. Actividad antibacteriana del EEPC evaluada en dos cepas Gram (+) con a) *S. aureus* y *S. epidermidis*; y dos cepas Gram (-) c) *P. aeruginosa* y d) *E. coli*.

Posteriormente, los datos fueron tratados en un programa estadístico arrojando que existe una diferencia significativa entre los halos de inhibición de bacterias Gram + y Gram -,

situación observable en la gráfica de la figura 11, siendo las bacterias Gram + más sensibles al EEPC que las bacterias Gram -, las cuales presentaron una sensibilidad casi nula.

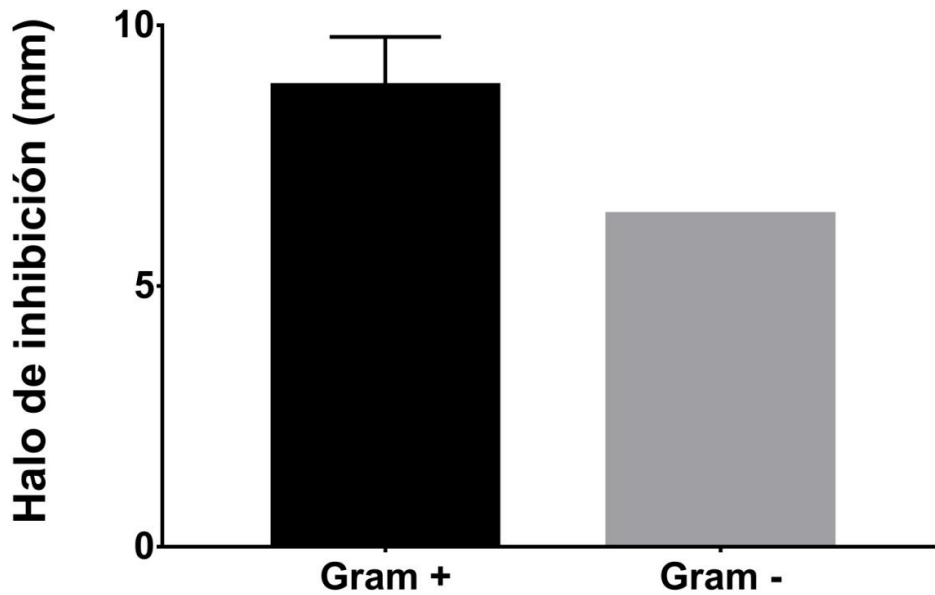


Figura 11. Actividad antibacteriana del EEPC en bacterias Gram (+) y Gram (-).

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

El proceso de cicatrización consta de tres fases principales entre las que destaca la fase inflamatoria ya que es la primera en llevarse a cabo, es por ello que se decidió evaluar la actividad antiinflamatoria ocupando un método en el que la administración del propóleo fuera tópica. Para ello se realizó el método de edema auricular, el cual a partir de los pesos en mg que mostraban los trozos de orejas, se obtuvo que el EEPC al 50% mostró un porcentaje de inflamación del 25%, mientras que el valor del medicamento convencional utilizado en este ensayo presentó un 35% de inflamación, por lo que la prueba estadística mostró una diferencia significativa con el grupo control; sin embargo, el EEPC al 10% no fue diferente al xilol (Figura 12).

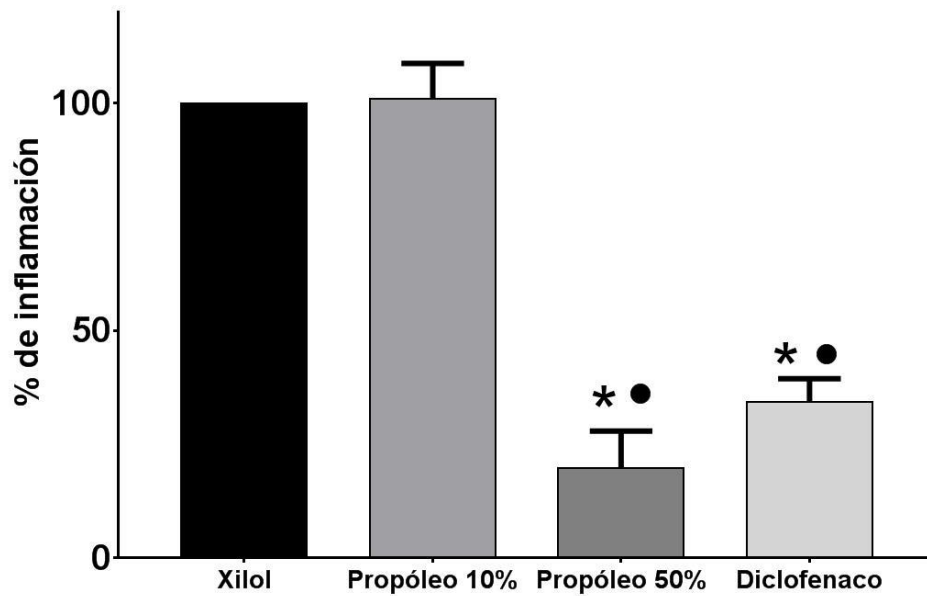


Figura 12. Capacidad antiinflamatoria del EEPC a dos concentraciones. * Muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto al % de inflamación del xilol ($P < 0.05$). • Muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto al % de inflamación el grupo tratado con propóleo al 10%.

Con el fin de corroborar estos resultados se analizó mediante cortes histológicos las muestras de las orejas, en busca de la presencia de células del infiltrado inflamatorio. En donde se encontró la presencia de neutrófilos (tipo celular típico en la inflamación aguda) en todos los grupos experimentales. Cabe destacar que aunque en todos los tratamientos se presentaron células de este tipo la diferencia reside en la cantidad de células presentes y de líquido inflamatorio, donde se pudo observar que las orejas a las que se les administró propóleo al 50% presentaban pocos neutrófilos y casi nulo el líquido inflamatorio, además, el grosor de estas era más cercano al de las orejas testigo; situación que también se presentó en las orejas tratadas con diclofenaco (Figura 13).

Por otro lado, al observar las orejas tratadas con propóleo al 10% encontramos una abundante cantidad de neutrófilos y monocitos distribuidos en la dermis e hipodermis de la oreja. También se pudo observar que el líquido inflamatorio abarcaba un área importante

ocasionando así que el grosor del tejido fuera mayor; estas características también fueron observadas en las orejas expuestas únicamente a xilol (Figura 13).

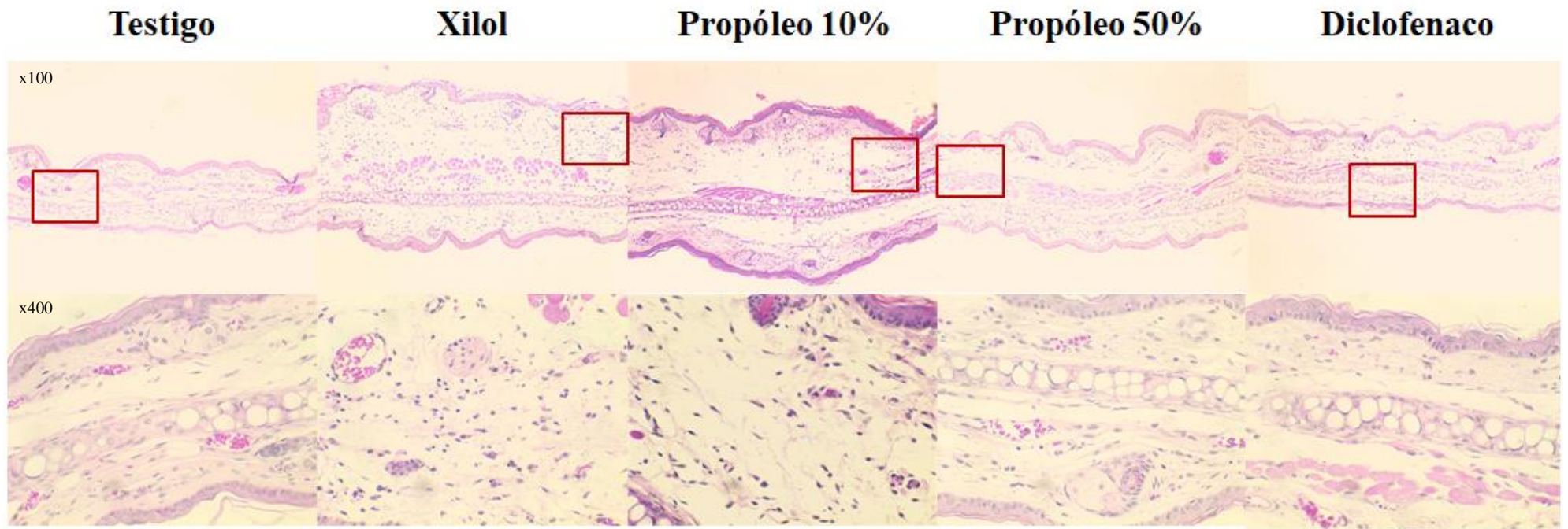


Figura 13. Cortes histológicos de las orejas en la evaluación del edema auricular. Tinción H-E en aumento total y zona enmarcada en rojo se amplió a x400.

TOXICIDAD DÉRMICA


A nivel macroscópico la administración del EEPC al 10% durante el periodo del ensayo no presentó irregularidades en la piel como eritema, edema y escaras (Cuadro 9), tampoco se presentó ningún signo como piloerección, pasividad o agresividad, convulsiones o muerte. Lo cual deduce a esta concentración del extracto como no irritante dérmico.

Por otro lado, en la administración del EEPC al 50% se comenzó a notar un muy escaso eritema apenas perceptible a partir del día ocho y para el día 10 se observó un comportamiento algo agresivo en algunos de los organismos y la formación de escara que para el día 13 ya no se presentaba. El día del sacrificio se observaba un escaso eritema y un ligero brillo en la zona de la aplicación (Cuadro 9). Estos signos permiten considerar que el EEPC al 50% es un irritante ligero [108].

A nivel microscópico, no se observaron alteraciones dañinas o irritantes, ni la presencia de células inflamatorias con la concentración al 10%, incluso presentan un grosor y arquitectura histológica muy similar a la piel sana, tomando en cuenta la presencia de glándulas sudoríparas, la distinción de las capas de la piel (epidermis, dermis e hipodermis), la irregularidad de forma en la epidermis y la capa muscular. No obstante, se puede apreciar la presencia de abundantes folículos pilosos en su fase más temprana alojados en su mayoría en la hipodermis (Figura 14).

En el análisis microscópico de la piel sometida a la concentración del 50% del EEPC se pudieron encontrar varias diferencias con la piel sana. La más notoria fue la pérdida del estrato corneo y el adelgazamiento de la epidermis a una monocapa de células epiteliales. La pérdida de la arquitectura en la dermis y su gran contenido de células de infiltrado inflamatorio, no permite apreciar muchas glándulas sudoríparas, además, se observan mayor número de vasos y/o capilares y en posición más superficial. En cuanto a los folículos pilosos, la cantidad disminuyó pero igual se encuentran en fase temprana de su desarrollo (Figura 14)

Cuadro 9. Registro fotográfico de la prueba de toxicidad dérmica al pasar de los días.

Propóleo []	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10	Día 12	Día 14
10%								
50%								

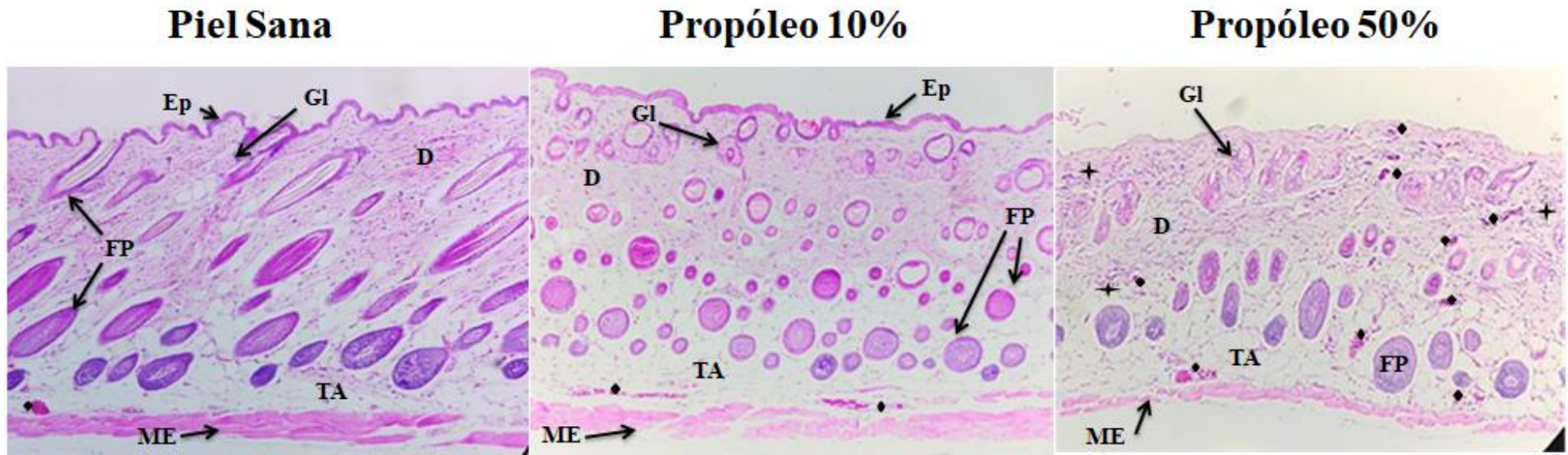


Figura 14. Cortes histológicos de muestras de la piel en toxicidad. Tinción H-E en aumento total de x100. Ep: epidermis; Gl: glándula; D: dermis; FP: folículo piloso; TA: tejido adiposo; ME: músculo esquelético; ◆: capilares; ✦: infiltrado inflamatorio.

En los resultados del pesaje hepático de los grupos tratados podemos observar que existe una diferencia significativa entre el EEPC al 50% y el testigo, presentando los organismos hepatomegalia. Sin embargo, el grupo del 10% no muestra diferencia significativa con el grupo testigo (Figura 15.A).

En cuanto al pesaje renal no se observa diferencia significativa comparando el grupo testigo con el grupo al que se le administró propóleo al 10%, ni los administrados con propóleo al 50% con el grupo testigo (Figura 15.B).

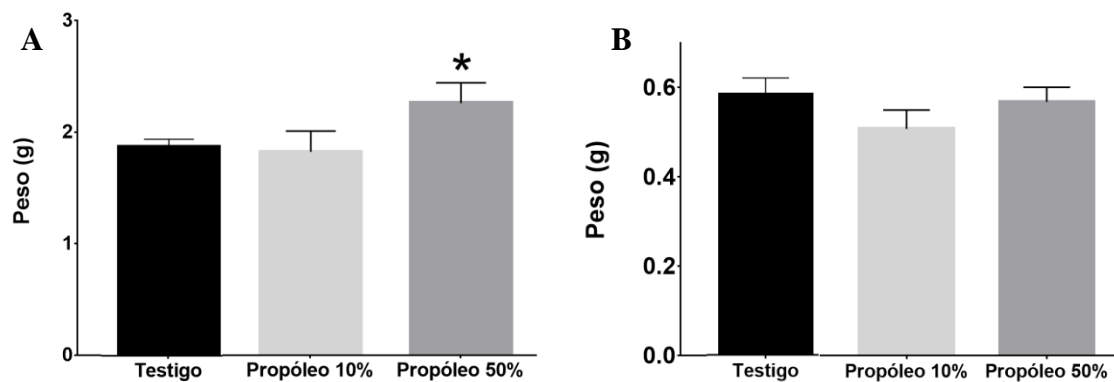











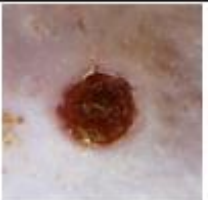






Figura 15. Peso en gramos de los hígados (A) y riñones (B) después de 14 días de la aplicación de los tratamientos. * Muestra diferencias estadísticamente significativas en el peso de los hígados ($p < 0.05$), mostrando una hepatomegalia en el grupo tratado con propóleo al 50%.

EFICACIA DE CICATRIZACIÓN

Velocidad de cierre.

Para obtener la velocidad de cierre, las heridas de los ratones fueron medidas diariamente con la ayuda de un vernier electrónico y se tomó un registro fotográfico de la evolución de las heridas (Cuadro 10). Estos datos arrojaron como resultado que el propóleo al 10% presenta una velocidad de cierre mayor, incluso frente al uso del Recoverón-NC; mientras que, el uso de propóleo al 50% presenta una velocidad de cierre muy similar al grupo testigo (Figura 16).

Cuadro 10. Registro fotográfico de la evolución de la herida en todos los tratamientos.

Tratamiento	Día 0	Día 6	Día 10	Día 14
Testigo				
Propóleo 10%				
Propóleo 50%				
Recoverón				

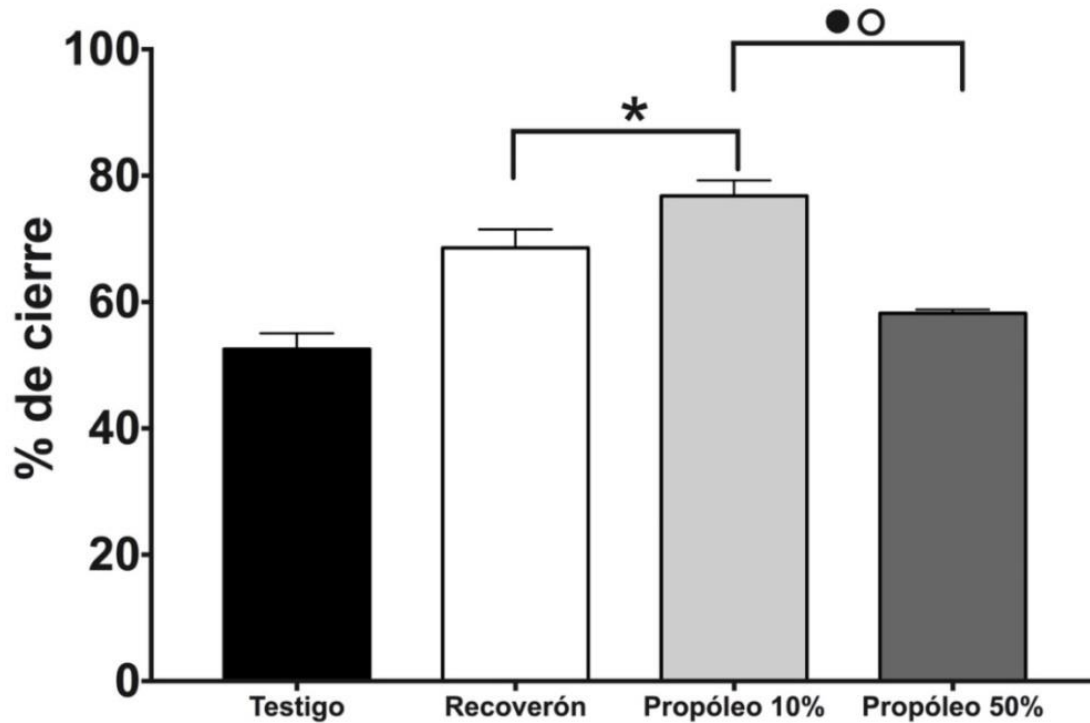


Figura 16. Comparación del porcentaje de cierre entre los tratamientos durante 15 días.

* Muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo testigo.

• Muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto al Recoverón-NC.

◦ Muestran diferencias estadísticamente significativas entre propóleo al 10% y propóleo al 50% ($P < 0.05$).

En el análisis microscópico de velocidad de cierre, se comparó la arquitectura de las capas de la piel en los cortes histológicos. En donde se encontró que el grupo de propóleo al 10% es el que posee mayor similitud en cuanto a la recuperación de la arquitectura de la epidermis y dermis, observando ya la presencia de glándulas, algunos folículos pilosos y el inicio de la formación de la hipodermis, por lo tanto, el infiltrado es menor. También es posible observar la neo vascularización de la zona (Figura 17). Estas características son similares a lo observado en las laminillas de Recoverón-NC, donde se pueden ver folículos pilosos en sus primeras fases de desarrollo y la perfecta diferenciación de la epidermis y la dermis, sin embargo, aún no se presentan glándulas ni la regeneración de hipodermis.

Por otro lado, el grupo de propóleo al 50% a pesar de que se encuentra constituida por completo la epidermis presenta un grosor mayor a lo normal y en la dermis es posible observar mucho infiltrado inflamatorio, lo cual es una característica específica de la fase proliferativa de cicatrización [83]; ocasionando así que el grosor del tejido en general se vea aumentado.

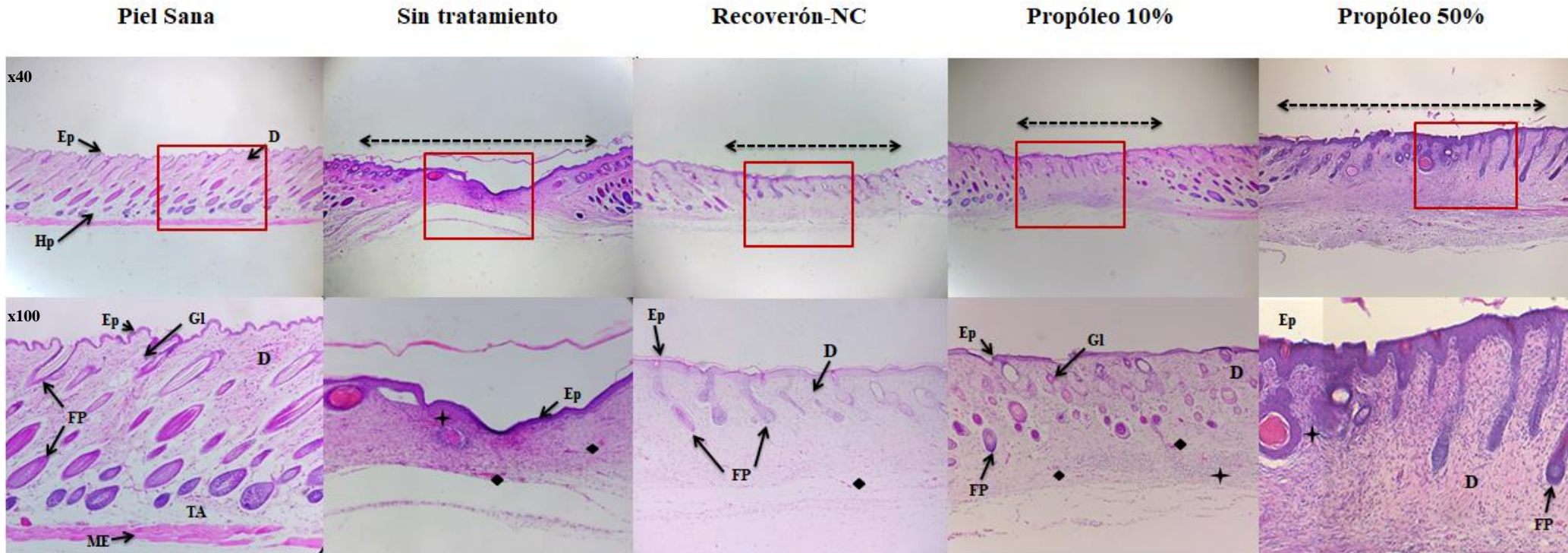


Figura 17. Cortes histológicos de la zona de la herida después de 14 días. Tinción H-E en aumento total. Zona enmarcada en rojo se amplió a x100. Ep: epidermis; D: dermis; Hp: hipodermis; FP: folículo piloso; Gl: glándula; ME: músculo esquelético; TA: tejido adiposo; ↔: longitud de la herida; ◆: capilares; ✦: infiltrado inflamatorio.

Así mismo, se midió la longitud de la herida visible en los cortes histológicos donde podemos observar que el propóleo el 10% no presenta una diferencia significativa con la longitud del grupo tratado con Recoverón-NC (Figura 18).

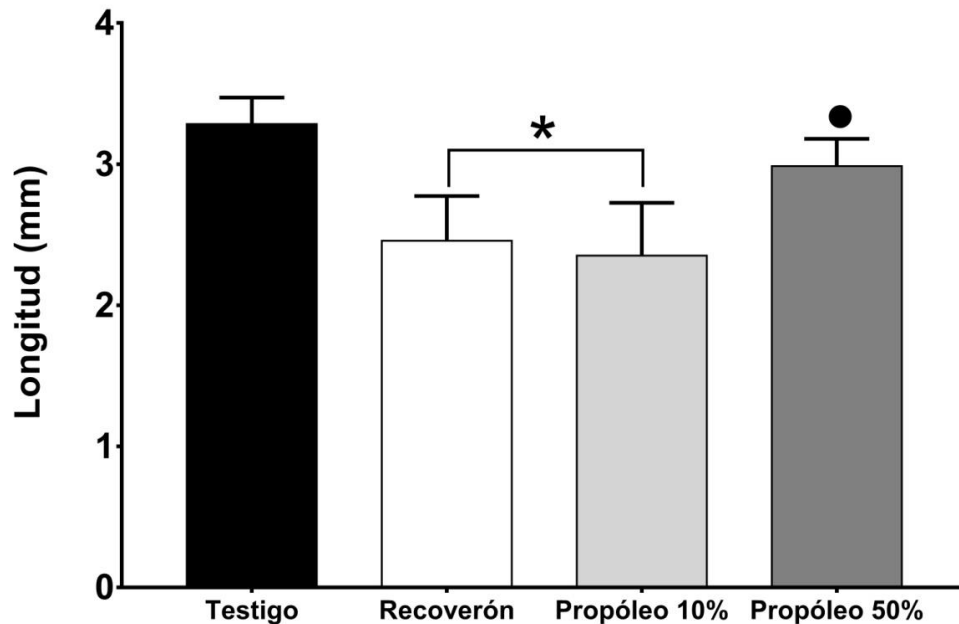


Figura 18. Longitud de la herida medida en los cortes histológicos. * Muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo testigo. • Muestra diferencias estadísticamente significativas entre el propóleo al 10% y propóleo al 50% ($P < 0.05$).

Fuerza de cicatrización.

En el método tensiométrico [33] se obtuvieron los porcentajes de fuerza de cierre respecto a la fuerza requerida para abrir la piel sana y se obtuvo como resultante que el uso del EEPC al 10% proporciona una fuerza de cierre del 38%, la cual está por encima a la fuerza requerida para abrir las heridas tratadas con Recoverón-NC presentando un porcentaje de fuerza del 25%; valor muy parecido al obtenido con el grupo tratado con EEPC al 50% (29%). Mientras que, el grupo testigo presentó una fuerza del 15% (Figura 19).

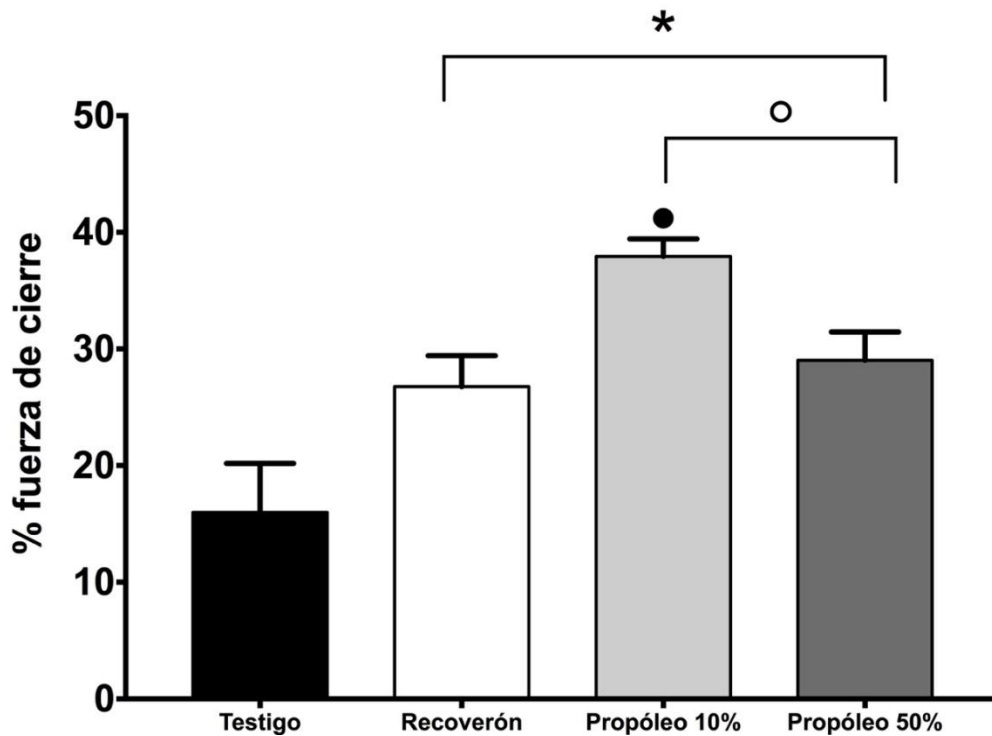


Figura 19. Comparación de los porcentajes en la fuerza de cierre entre los tratamientos, obtenidos por el método tensiométrico. * Muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo testigo. • Muestra diferencias estadísticamente significativas con el Recoverón-NC. ◊ Muestra diferencias estadísticamente significativas entre propóleo al 10% y propóleo 50% ($P < 0.05$).

DISCUSIÓN

El propóleo es uno de los integrantes de la medicina tradicional más utilizados en México y en el mundo a lo largo de los años y en diferentes civilizaciones, ya que se le atribuyen una amplia gama de propiedades curativas, convirtiéndose en un blanco importante para el estudio de su composición química y sus propiedades biológicas y farmacológicas. Existen numerosos estudios acerca de la composición química de los propóleos alrededor del mundo sobre todo en zonas más cálidas [11]; sin embargo, en México son pocos los estudios acerca del propóleo a pesar de ser muy popular en la medicina alternativa, poniendo en duda la efectividad de estos.

Por otro lado, la variabilidad química de los propóleos depende en gran parte de la zona de colecta y la disponibilidad botánica de la colmena, lo que representa una dificultad más para la caracterización de las propiedades biológicas de los propóleos de México [84]. Como contribución a este propósito, este estudio se enfoca en evaluar ciertas propiedades que se le atribuyen al propóleo y que además son procesos biológicos importantes para la sanación de heridas. Es importante destacar que se trata del estudio de un propóleo perteneciente a la zona centro del estado de Chihuahua, siendo este su primer reporte como cicatrizante.

En cuanto a la composición química del propóleo se han encontrado más de 300 compuestos diferentes, incluyendo fenoles, flavonoides, ésteres, benzofenonas, carbohidratos, aldehídos, aminoácidos, cetonas, terpenos, vitaminas, entre otros [11]. Palacios-Cruz (2016) aisló como componentes principales pinocembrina, crisina y alpinetina, de un propóleo colectado de Parral municipio ubicado en la zona sur de Chihuahua, que a pesar que esta zona no posee el mismo clima que la zona centro de Chihuahua donde fue colectado el propóleo de la presente investigación, presenta una similitud a éste en componentes y abundancia siendo la pinocembrina, crisina y naringenina los más abundantes [84]. Por otro lado, Rivera (2013) realizó una comparación de propiedades biológicas de propóleo entre entidades como Veracruz, Guanajuato y el Estado de México; encontrando compuestos como: pinocembrina, metil éster del ácido oleico, metil éster del ácido palmítico, naringenina, ácido palmítico, entre otros [21], que aunque están presentes en todas las muestras de propóleo no se encuentran en las mismas

proporciones dándoles a cada uno propiedades diferentes, circunstancia que también se presenta en el EEPC. La caracterización química identificada con el HPLC tanto del extracto completo como de las tres fracciones, permitió identificar principalmente compuestos fenólicos y del tipo flavonoide, siendo en total 10 compuestos. De los cuales únicamente la naringina y naringenina se les reportan las cuatro actividades esenciales para el proceso de cicatrización, que son antiinflamatoria, antioxidante, antibacteriana y proliferativa [36, 38, 40, 41]. Por otro lado, al resto de los componentes como la pinocembrina se les reportan como antiinflamatorio, antioxidante y antibacteriano [43, 45] (Cuadro 6).

Mientras que en la GC-MS, se identificaron cerca de 19 compuestos entre los que destacan los flavonoides y los ácidos grasos en menor medida, ya que la pinocembrina, el éster metílico del ácido oleico, 14-metil-metil éster del ácido pentadecanoico y 2-nonadecanona, presentaban mayor abundancia dejando el resto de los compuestos en trazas (Cuadro 7). Para este tipo de compuestos se les encontraron menos reportes de actividades biológicas, sin embargo, sí existen reportes en donde se menciona que poseen algunas de estas cuatro propiedades principales [71, 72, 73, 81, 76, 78,] (Cuadro 8).

Sin embargo, es probable que estas propiedades no se deban al efecto individual de los componentes sino al sinergismo que ocurre entre los muchos componentes. Marcucci (1995) observó este sinergismo al estudiar las propiedades biológicas de varias fracciones del extracto etanólico, dónde refiere que el potencial terapéutico del propóleo no se debe a una sustancia en particular, sino a la resultante de una acción compleja de varios compuestos [14].

Dado el contenido de compuestos identificados principalmente de naturaleza fenólica, en la caracterización química del EEPC, su capacidad antioxidante es adecuada ($CA_{50}=15.75$ $\mu\text{g/mL}$) según el criterio de Al-Fatimí y colaboradores que consideran que un extracto en concentraciones menores a 96.6 $\mu\text{g/mL}$ presenta una adecuada capacidad antioxidante [82]. Rivera (2013), determinó la CA_{50} de un propóleo de Guanajuato con 78.63 $\mu\text{g/mL}$ y de uno Estado de México con 8.48 $\mu\text{g/mL}$ y aunque sus valores se encuentran en dos extremos, ambos se les considera dentro del rango de una adecuada capacidad antioxidante [21]. Mientras que Chaillou y Nazareno (2009), evaluaron seis muestras de propóleo de lugares

diferentes obteniendo un rango desde 5.8 hasta 89.9 en porcentaje de reducción del DPPH⁺, demostrando de nuevo que la composición del propóleo difiere del lugar de colecta, sin embargo, todos estos reportes entran dentro de la categoría de capacidad antioxidante buena [85]. El hecho de presentar capacidad antioxidante es una característica sumamente importante ya que previene el incremento de la formación de radicales libres en el organismo, lo que ocasiona un estrés oxidativo que puede causar daño celular [26]. El daño en el organismo puede presentarse durante la respuesta inflamatoria por células como macrófagos y neutrófilos activos que producen radicales libres oxigenados altamente reactivos, estas acciones se presentan como parte de la fase de inflamación del proceso de cicatrización [11].

Como se sabe, normalmente la adecuada capacidad antioxidante de un extracto se debe al contenido total de fenoles y flavonoides ya que poseen una gran capacidad como donadores de electrones ocasionando la estabilización y el apareamiento de los radicales libres. La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelatantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, además de la inhibición de las oxidasas: lipooxigenasa, ciclo-oxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos [86]. Se determinó la cantidad de fenoles totales del EEPC (314 mg eQ/g de propóleo) y un total de flavonoides de 62.58 mg AG/g de propóleo, lo que equivale al 31.4% de fenoles y 6.7% de flavonoides con respecto al total del extracto. Éstos valores superan por más del doble lo reportado por Chaillou y Nazarero, quienes evaluaron 30 muestras de propóleo en Argentina reportando para fenoles valores de 92 a 186 mg/g de propóleo y para flavonoides un rango de 6 a 18 mg/g de propóleo [85].

Dadas las características antes mencionadas se corroboró la actividad antibacteriana del EEPC ya que esta actividad biológica es importante para el proceso de cicatrización. Marcucci menciona que el extracto etanólico de propóleo presenta actividad antibacteriana en 15 bacterias Gram + y en siete bacterias Gram - en concentraciones menores a 100 µg/mL [14]. Esto coincide con nuestros resultados al encontrar mayor inhibición en bacterias Gram + que en bacterias Gram -. De manera similar, Ramos y Miranda reportan que la actividad antibacteriana *in vitro* contra varias Gram + y Gram -, es resultado de la

sinergia entre los compuestos del propóleo, principalmente pinocembrina. Además, Marcucci menciona que extractos etanólicos de propóleo pueden llegar a inhibir por completo el crecimiento de *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp, *Bacillus cereus*, *S. aureus* y *S. epidermidis* e inhibir parcialmente el crecimiento de *P. aeruginosa* y *E. coli* [14]. Estos resultados son principalmente dados por las diferencias estructurales y de composición de los grupos bacterianos, dándoles diferente susceptibilidad tanto a los antibióticos como a los extractos probados. En el caso de las bacterias Gram +, sus membranas se encuentran compuestas por ácidos teicoicos y lipoteicos, dándole una carga negativa neta, necesaria para que la célula asimile cationes divalentes; esta característica la hace más sensible a compuestos polares. Por otro lado, las Gram -, estructuralmente poseen una membrana más resistente a disolventes orgánicos y menos permeable a moléculas hidrofóbicas [109]. Y como se observa, en el fraccionamiento del EEPC el 74% de los compuestos son de alta polaridad, lo que da razón a la mayor efectividad antibacteriana en Gram + que en Gram -.

Tomando en cuenta el seguimiento del proceso de cicatrización, se pudo encontrar que la actividad antiinflamatoria es una de las propiedades ampliamente reportadas para el propóleo atribuyendo esta característica a su contenido de flavonoides [11]. Cabe destacar que el EEPC presentó un alto contenido de compuestos fenólicos y de flavonoides y se ha demostrado que estos últimos, tienen la habilidad de potenciar los mediadores químicos antiinflamatorios endógenos y diversas enzimas defensivas antioxidantes y desintoxicantes [86, 87]. La relación de la estructura de los flavonoides y su acción antiinflamatoria se ve principalmente en enzimas claves en el proceso de inflamación, es decir, COX-2, LOX, iNOS y la interferencia en las vías de señalización [86]. Moura y colaboradores (2009) realizaron una evaluación de la propiedad antiinflamatoria del propóleo verde, mediante un implante subcutáneo y un análisis histológico en el que determinaron la reducción de células antinflamatorias en los primeros 7 días en comparación con el grupo testigo [88]. Hu y colaboradores (2005) también evalúan la propiedad antiinflamatoria de un extracto etanólico y un extracto acuoso de propóleo por el método de edema plantar inducido por carragenina, reportando que ambos presentan una actividad inhibitoria en la vasodilatación, sin embargo, esta actividad es mayor en el extracto etanólico [89].

El modelo de edema auricular inducido por xilol es un modelo de inflamación aguda preliminar y simple para la evaluación de agentes antiinflamatorios potenciales como la histamina, cininas, fibrinolisisina, fosfolipasa A2, entre otros. Estos mediadores inducen el edema mediante la promoción de la vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. La inflamación está dada por la primera fase, donde implica la liberación de histamina y serotonina; la segunda fase está creada por quinina y la tercera fase está mediada por la prostaglandina [90, 91]. La cantidad de flavonoides en el EEPC nos proporciona una posible explicación a los bajos porcentajes de inflamación de hasta un 25% por parte del propóleo al 50%, valor incluso por debajo del porcentaje de inflamación del diclofenaco, el cual es uno de los medicamentos más utilizados para el tratamiento de edemas. Considerando que la baja concentración del propóleo al 10% es la causante de que no haya contribuido a la inhibición de la vasodilatación causada en el tejido por el xilol, ya que por su concentración contiene menor abundancia de flavonoides. El EEPC puede estar trabajando debido a la acción de los flavonoides al inhibir ciertos mediadores de la inflamación, como la COX-2 que es un antecedente de la producción de prostaglandinas.

Es conocido que muchas plantas de uso medicinal pueden ocasionar reacciones tóxicas a quienes las utilizan por el alto contenido de ciertos metabolitos secundarios que pueden éstas contener [92] y dado que el propóleo se le considera un conjunto de metabolitos secundarios de diversas plantas es necesario considerar que el propóleo a altas concentraciones presente efectos tóxicos luego de su administración. Teniendo resultados tan buenos en actividad antiinflamatoria con la concentración más alta utilizada en este estudio, se decidió evaluar la toxicidad dérmica subcrónica, encontrando una ligera irritación y pérdida de la epidermis en el grupo tratado con propóleo al 50%, suponiendo que esto fue ocasionado por algunos compuestos fenólicos ya que Islas y colaboradores (1987) mencionan que los derivados cresólicos y fenólicos pueden causar corrosión de los epitelios [93]. Sin embargo, el propóleo al 10% no presentó ninguna irritación. Camps (2001) realizó un ensayo de toxicidad dérmica y oftálmica de propóleo al 15%, en donde reporta que no se presentó ninguna reacción tóxica dérmica, sin embargo, sí ocasionó algunas reacciones irritantes en la zona ocular [94]. Pérez-Capote y colaboradores en 2003, reportan que en un ensayo de toxicidad aguda, con una dosis única de tintura del propóleo

no presenta ninguna reacción irritante en la piel [95]. Por lo que se plantea que el propóleo en concentraciones menores al 15% no se le considera tóxico. Sin embargo, el aumento en el pesaje del hígado con el propóleo al 50% indica que el uso continuo de esta concentración puede causar daño hepático. Por lo que es importante mencionar que la toxicidad de los fenoles por vía dérmica se concentra principalmente en trastornos neurológicos y secundariamente en hígados, riñones y páncreas [93].

Teniendo como antecedentes los buenos resultados obtenidos hasta el momento, dan premisa a que se le considere al EEPC como un buen candidato para su uso como producto cicatrizante. Por lo que se continuó con la evaluación *in vivo* de la eficacia cicatrizante, iniciando con la determinación de la velocidad de cierre. El EEPC a una concentración del 50% mostró una sanación muy lenta con un 58.23%, presentando un porcentaje similar al testigo (57.55%); además, no cerró por completo hasta el día 14, donde ya los otros tratamientos se encontraban en la fase de remodelación y en el análisis histológico se puede deducir que éste apenas se encontraba en la fase proliferativa, por la abundante presencia de infiltrado inflamatorio. Este resultado puede deberse a que su actividad como antiinflamatorio es muy alta impidiendo que en la herida se desarrolle adecuadamente la fase inflamatoria del proceso de cicatrización, atrasando todo el proceso; sin embargo, pasado esta fase, a partir del día siete el grupo tratado con propóleo 50% su velocidad de cierre aumentó presentando una mayor pendiente, por lo que algunos autores consideran que el uso de propóleo para el tratamiento de heridas es más adecuado después de la eliminación de la infección y la fase inflamatoria [11].

Mientras que el EEPC al 10% presentó una significativa velocidad de cierre inclusive por encima del Recoverón-NC (68.58%) con un 75.86% de cierre, observando en histología que el tratamiento con propóleo indujo una mejor curación al reducir la respuesta inflamatoria, promover la neo vascularización y en consecuencia la reepitelización fue más rápida. Para el día 10 este grupo ya mostraba bastante mejoría en comparación con los otros grupos. Observaciones similares a las reportadas por Khorasgani y colaboradores (2010), quienes mencionan que el uso de un extracto etanólico de propóleo en heridas dorsales presentan en la histología un decremento significativo de células inflamatorias y una completa regeneración de la dermis y la epidermis [96].

Otro factor importante para determinar la eficacia de cierre de un producto es la fuerza que la cicatriz ha desarrollado durante el cierre de la herida, factor que se evaluó mediante el método tensiométrico, el cual arrojó un excelente resultado el grupo del EEPC al 10%, pues resultó con una fuerza 37.93% con respecto a la fuerza requerida para romper la piel sana y el EEPC al 50% presentó el 29.03% de fuerza de cierre. Mientras que, el grupo testigo fue el grupo con menor porcentaje de fuerza presentando un 15.98%, seguido del Recoverón-NC con un 25.05%. Mulisa en 2015, menciona que la fuerza de cierre está dada por la intervención del extracto utilizado para la cicatrización ya que decrementa el periodo de epitelización y por lo tanto los procesos de deposición del colágeno [97]; otro factor que interviene en la fuerza de cierre es la actividad antibacteriana y la baja abundancia de granulación en la formación del tejido, las cuales también cumple el EEPC por su composición química. Teller y White mencionan que en un proceso de cicatrización normal a la semana de haberse producido la herida, la fuerza de la matriz es del 3% con respecto al tejido intacto, al cabo de tres semanas, luego de que las proporciones de colágeno tipo I, II y III se aproximen a las del tejido conjuntivo intacto este aumenta su fuerza a un 30%, y a los tres meses alcanza su máximo del 80% a su fuerza original [4].

Se sugiere que el propóleo actúa más durante las primeras fases de la cicatrización [22], debido a las actividades biológicas encontradas para sus compuestos químicos, lo cual promueve una recuperación pronta del tejido y una aceleración en el proceso de cicatrización, por lo cual la proliferación de fibroblastos y la producción de colágeno inicia más pronto y esto le proporciona una mayor fuerza de cierre. La cicatrización está directamente relacionada con el proceso inflamatorio y si es menos pronunciado, la producción de moléculas curativas y la deposición de fibras de colágeno aumenta. Las propiedades de cicatrización de tejidos del propóleo posiblemente se deben a su actividad antioxidante ya que al remover los radicales libres, por los flavonoides que el propóleo contiene, permite la regeneración de los órganos o tejidos dañados llevándolos a una correcta cicatrización [11, 14]. Aún teniendo la referencia de que el propóleo es buen cicatrizante, el verdadero reto es determinar qué tipo de propóleo se puede utilizar para estas afecciones y cuáles son las dosis adecuadas, ya que el propóleo es un producto al que no se le pueden dar sólo ciertas características por su cambiante composición química.

CONCLUSIONES

- La capacidad antioxidante media que tiene el EEPC es elevada en comparación a otros extractos.
- La actividad antibacteriana del EPPC se presenta tanto en bacterias Gram positivas como en bacterias Gram negativas, sin embargo, con menor efecto en estas últimas.
- El EEPC a concentración del 50% es un excelente antiinflamatorio.
- El EEPC resulta ser ligeramente tóxico para la piel a una concentración del 50%.
- La arquitectura histológica muestra una mejor recuperación con el uso del EEPC al 10%.
- El EEPC al 10% proporciona mayor elasticidad y fuerza a las heridas.
- El EEPC al 10% es el mejor candidato como producto cicatrizante.

APÉNDICES

Apéndice 1. 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 [1]. Una piel sana posee un espesor de 2.2 mm y en un individuo promedio ocupa el 6% del peso corporal total. 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 [98]. Se distinguen tres capas principales: epidermis, dermis e hipodermis o tejido subcutáneo (Figura 20).

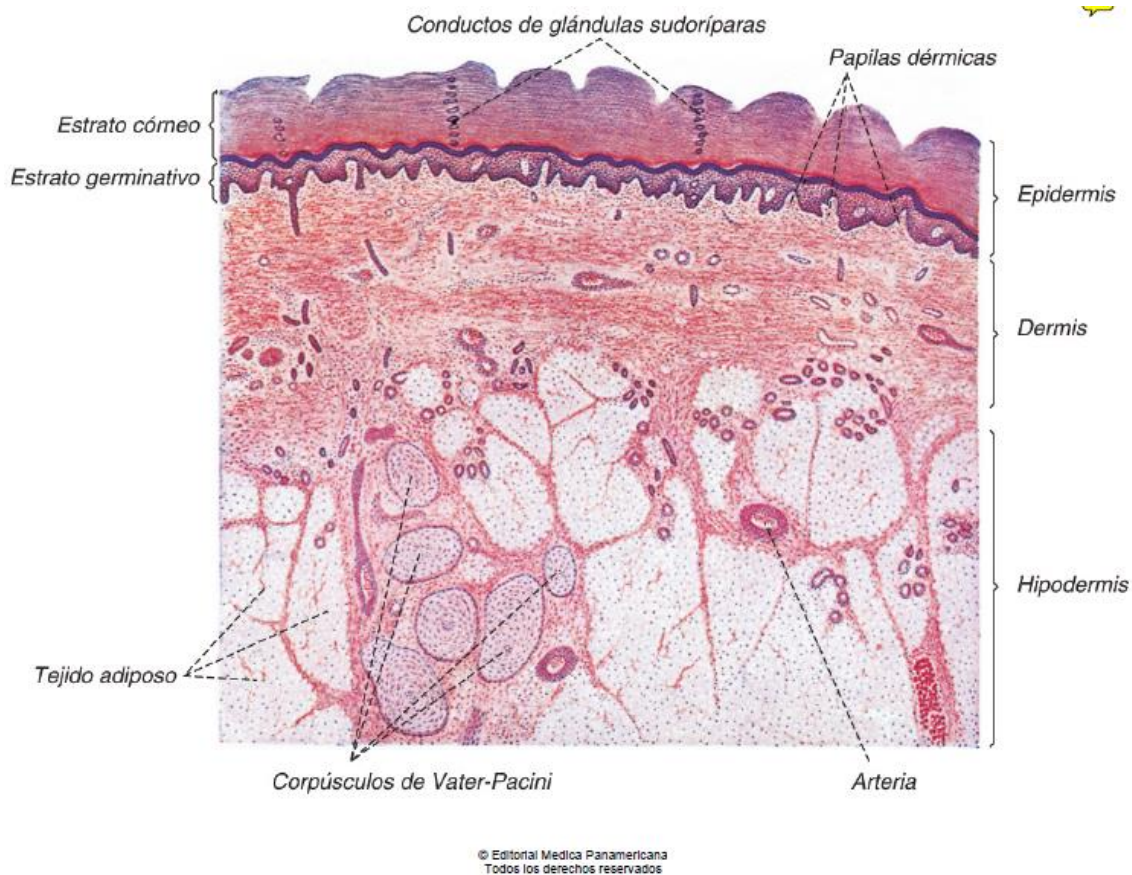


Figura 20. Capas principales de la piel y estructuras anexas en tinción H-E [99].

- *Epidermis.*

La epidermis es un epitelio plano estratificado queratinizado que se renueva cada 28 días, es la capa más superficial y se encuentra constituida por dos grupos de células: queratinocitos o células no dendríticas y células dendríticas [98, 100, 101].

Los queratinocitos a su vez se organizan en capas o estratos (Figura 21), que de la más superficial hacia adentro son:

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

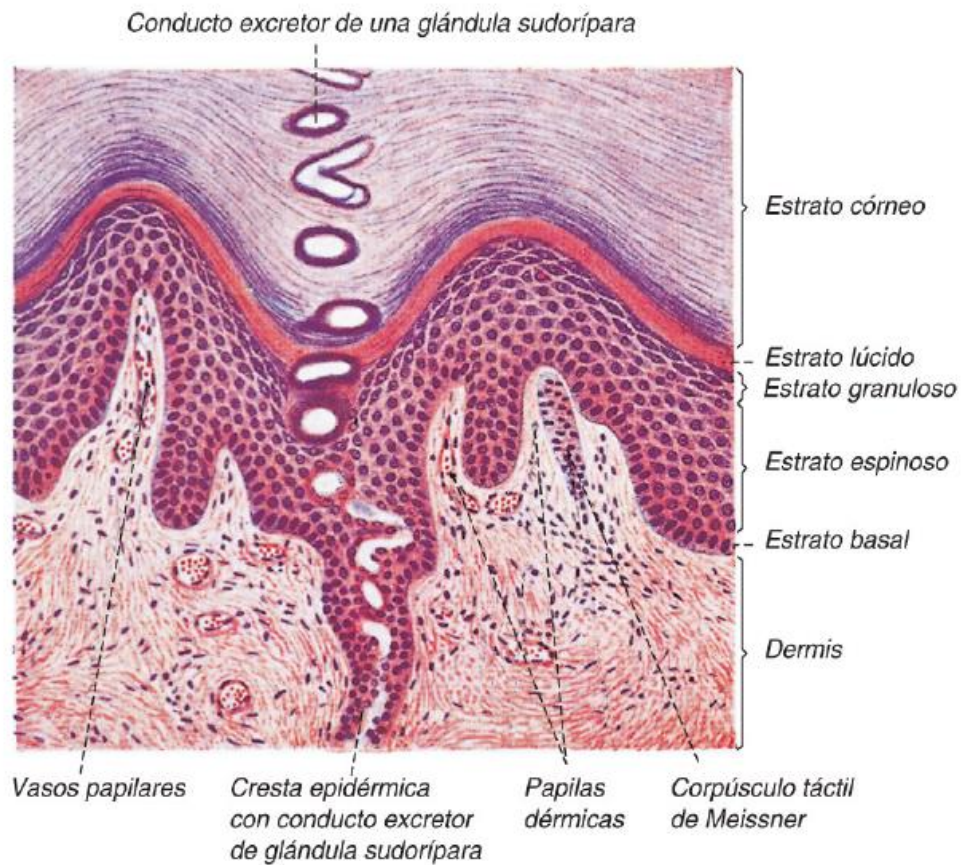
El **estrato córneo** está formada por células muertas aplanadas y sin núcleo, que contienen una proteína fibrilar, la queratina [98]. Por lo que con los colorantes de rutina (hematoxilina y eosina) se tiñe únicamente por la eosina. Su grosor varía de acuerdo al sitio anatómico, en las zonas como palmas 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 [98, 101].

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 [98, 101].

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 [101].

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 [101].



© Editorial Médica Panamericana
Todos los derechos reservados

Figura 21. Estratos de la epidermis y estructuras anexas en tinción H-E [99].

- *Dermis.*

La dermis está situada por debajo de la epidermis, es un tejido mayoritariamente fibroso donde se encuentran los anexos cutáneos como los folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas. Está constituida por tejido conectivo irregular, sustancia fundamental y células. Posee funciones protectoras e inmunológicas, ya que es la segunda línea de defensa mecánica contra traumatismos, es el sostén de la piel y es fundamental para la termorregulación y lubricación [1].

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 [101].

Las fibras elásticas se observan con tinciones especiales de orceína o resorcina-fuccina, son fibras delgadas de 1 a 3 μm 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, se encargan de proporcionar elasticidad [101].

Las fibras reticulares también requieren de tinciones especiales para su observación. Miden de 0.2-1 μm de diámetro, son un tipo especial de fibra colágena de tipo III [101].

La sustancia fundamental de la dermis contiene fibronectina, varios glucosaminoglicanos y ácido hialurónico secretados por los fibroblastos, la célula principal de la dermis. Provee de un medio semi-líquido, permite el transporte y difusión de nutrientes y O_2 ; además, es el andamio para la migración celular y los requerimientos para la reparación de heridas [102].

- 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. Contiene macrófagos, fibroblastos y células sebáceas, así como nervios, vasos linfáticos y sanguíneos que irrigan la piel [101, 102].

Apéndice 2. Zona de colecta.

El propóleo utilizado se colectó en un apiario del Ejido Concordia, localizado entre los municipios Aquiles Serdán y Chihuahua en la zona centro de Chihuahua (Figura 22).

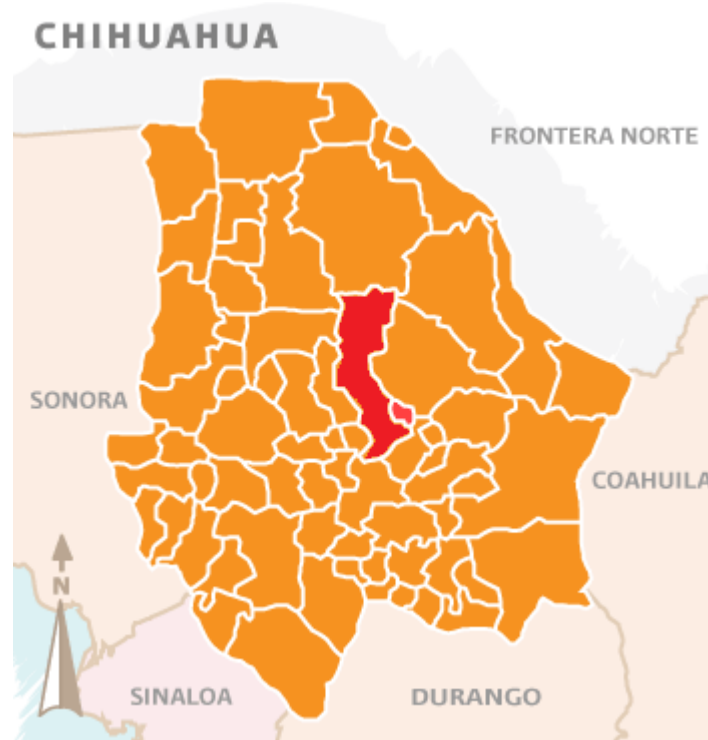


Figura 22. Ubicación geográfica de los municipios Chihuahua y Aquiles Serdán, Estado de Chihuahua [103].

Según Estrada y Villarreal [104] la zona centro del Estado de Chihuahua se caracteriza por sus extensas planicies y lomeríos bajos en sus sectores oeste, este y sur, donde predominan el pastizal y el matorral, mientras que en la porción norte se encuentra una cadena de montañas conocidas como sierra El Nido, donde queda incluido el Parque Nacional Cumbres de Majalca.

La región del centro del estado de Chihuahua se encuentra dentro de dos provincias fisiográficas: Sierra y Llanuras Tarahumaras y Sierras y Llanuras del Norte; dando lugar a un relieve heterogéneo de extensas planicies y lomeríos bajos [104].

Clima

Los climas predominantes en la porción central del estado corresponden a los tipos BS0kw y BS0hw, ambos de carácter estepario, con 300-400 mm de precipitación anual y una temperatura media anual entre 16 y 18 °C, así como BWkw y BWhw, desértico, con 200-300 mm de precipitación anual y una temperatura media anual de 18-20 °C, ambos son secos, con lluvias en verano, templados (k) y semicálidos (h) [104].

Vegetación

En el área de estudio se presentan tres tipos de vegetación principales: matorral xerófilo, pastizal, bosque de encino-pino (ee) [105]. A su vez, dentro de éstos cabe reconocer: pastizal mediano abierto, pastizal mediano arborescente, pastizal amacollado abierto, pastizal halófilo, matorral inerme parvifolio, matorral rosetófilo y bosque esclero-aciculifolio [104].

Apéndice 3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Partición hexánica del EEPC.

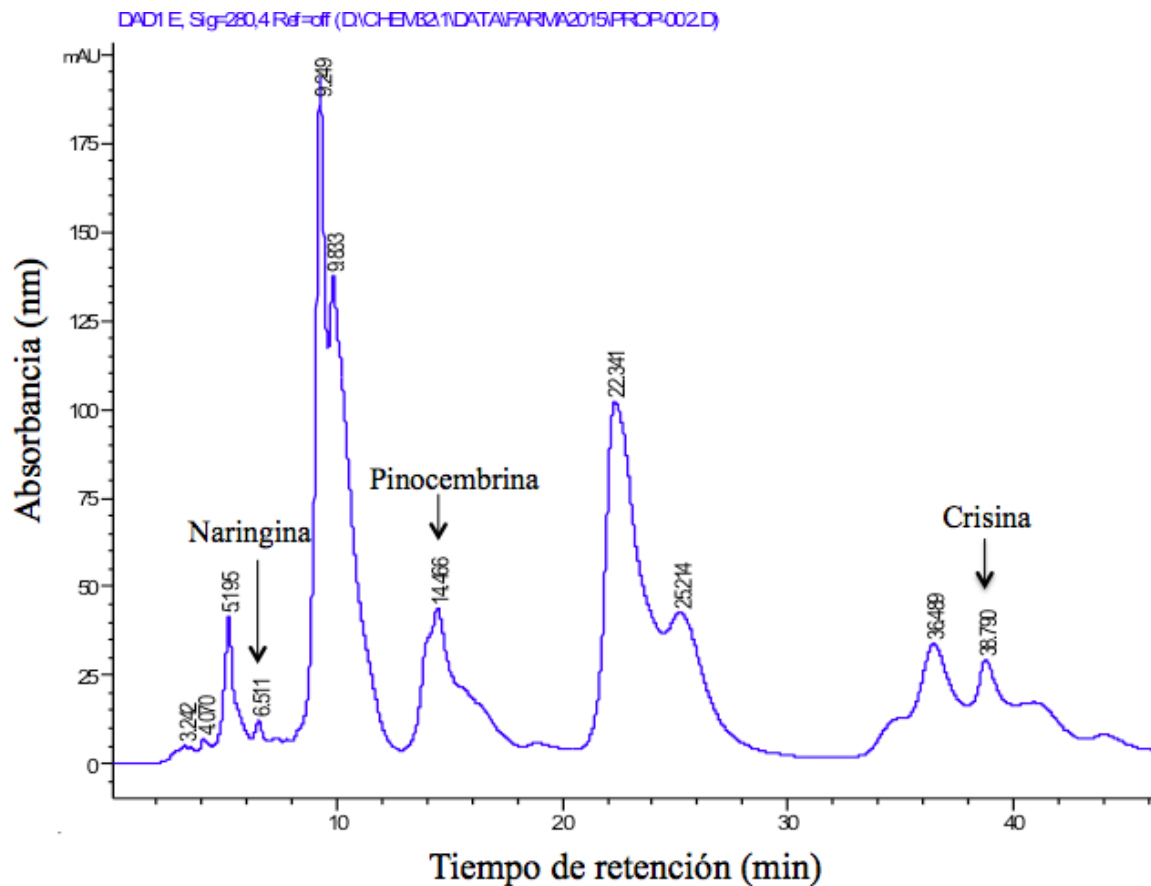


Figura 23. Cromatograma de la partición hexánica del EEPC.

Cuadro 11. Metabolitos secundarios presentes en la partición hexánica del EEPC. Se muestra el tiempo de retención y $\lambda_{\text{máx}}$ de cada uno de los compuestos identificados. N.I.= no identificado.

No. Compuesto	Tiempo de Retención (min)	$\lambda_{\text{máx}}$. (nm)	Compuesto	Estructura química
1	3.24	218, 280	N.I.	
2	4.07	228, 280	N.I.	

3	6.51	222, 270, 288	Naringina	
4	14.46	210, 290	Pinocembrina	
5	36.48	266, 292, 360	Flavonol	
6	38.78	208, 268, 356	Crisina	

Partición con diclorometano del EEPC.

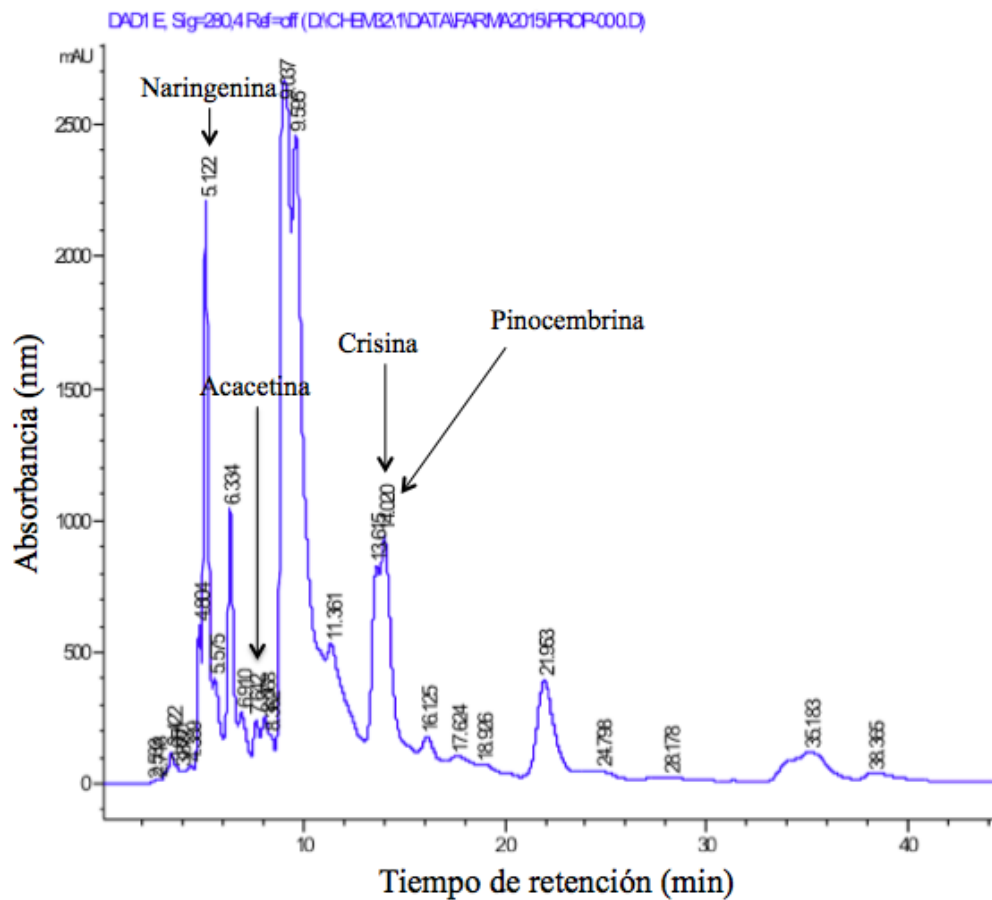
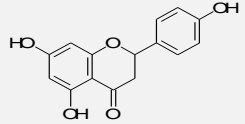
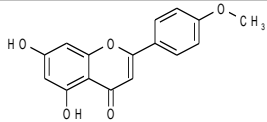
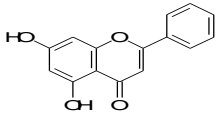
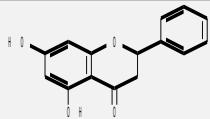


Figura 24. Cromatograma del HPLC de la partición con diclorometano del EEPC.

Cuadro 12. Metabolitos secundarios presentes en la partición con diclorometano del EEPC. Se muestra el tiempo de retención y $\lambda_{\text{máx}}$ de cada uno de los compuestos identificados. N.I.= no identificado.

No. Compuesto	Tiempo de Retención (min)	$\lambda_{\text{máx}}$. (nm)	Compuesto	Estructura química
1	3.41	222, 298, 310	Flavanona	
2	3.64	292	Fenol	
3	3.87	224, 288	Fenol	
4	4.37	228, 288	Fenol	
5	5.12	216,294	Naringenina	
6	7.63	210, 266, 350	Acacetina	
7	8.36	254, 266, 294, 354	Fenantreno	
8	9.03	274, 298, 332	Flavanona	
9	11.36	266,292,354	Flavonol	
10	13.60	210,268,312	Crisina	
11	14.01	210, 290	Pinoцемbrina	
12	16.13	266,296,368	Flavonol	
13	17.62	268,294,362	Flavonol	
14	19.92	270,294,368	Flavonol	
15	38.35	268,294,364	Flavonol	

Partición metanólica del EEP.

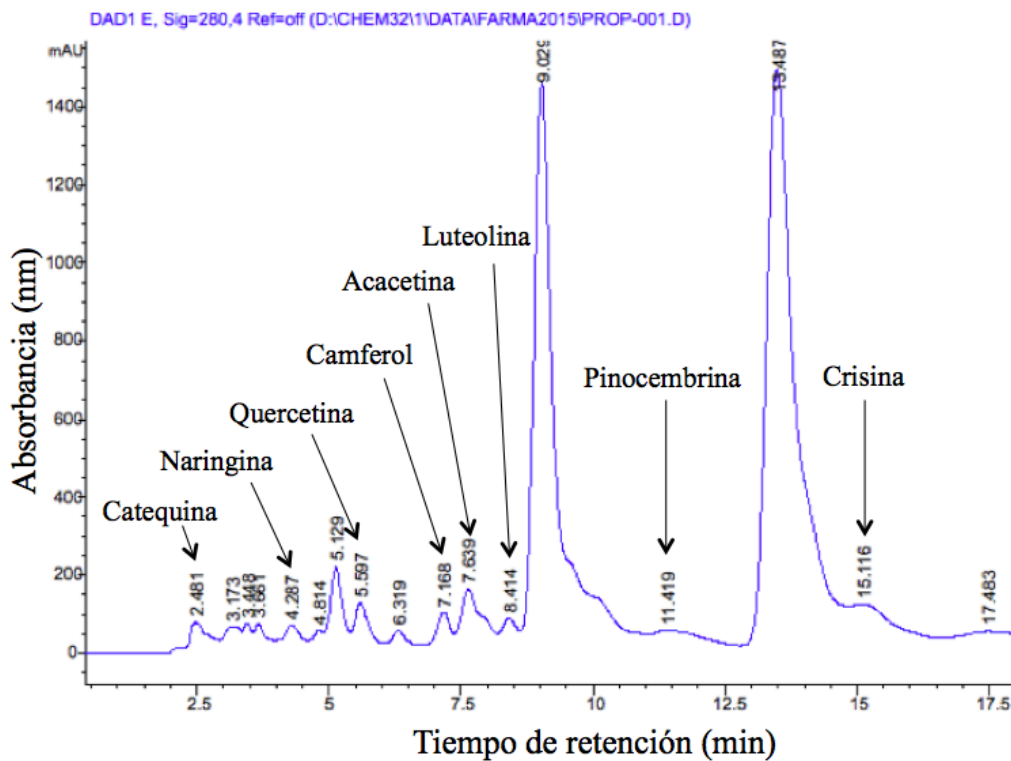
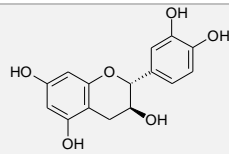
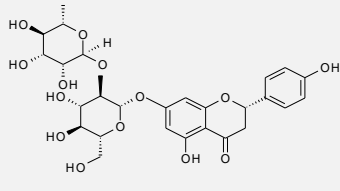
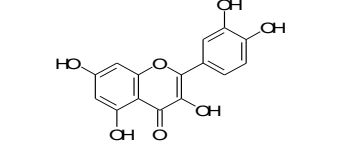
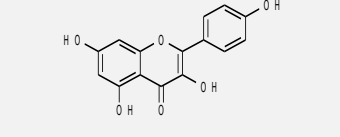
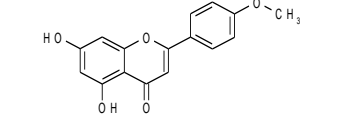
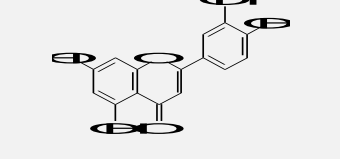
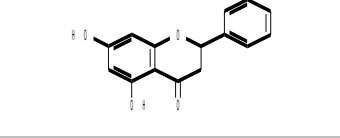
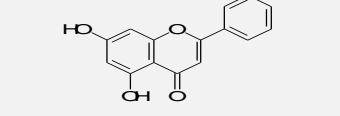


Figura 25. Cromatograma de la partición metanólica del EEP.

Cuadro 13. Metabolitos secundarios presentes en la partición metanólica del EEP. Se muestra el tiempo de retención y $\lambda_{\text{máx}}$ de cada uno de los compuestos identificados. N.I.= no identificado.

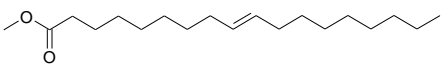
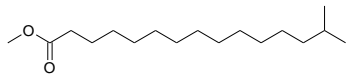
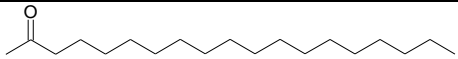
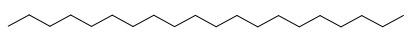
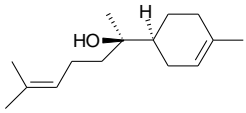
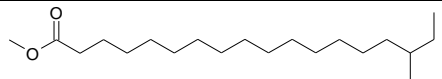
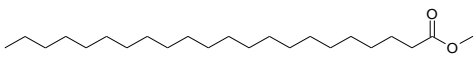
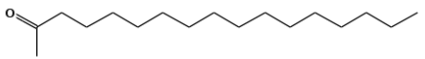
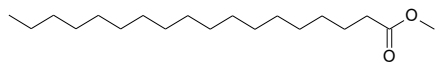
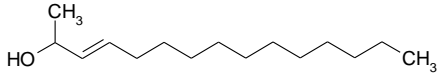
No. Compuesto	Tiempo de Retención (min)	$\lambda_{\text{máx}}$. (nm)	Compuesto	Estructura química
1	2.46	218, 276	Catequina	
2	3.14	216, 288, 328	Flavanona	
3	3.44	218, 288, 320	Flavanona	
4	3.65	216, 294, 326	Flavanona	

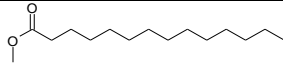
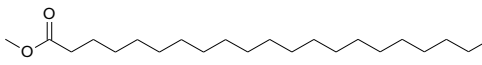
5	4.27	208, 228, 284	Naringina	
6	5.59	202, 256, 356	Quercetina	
7	7.17	220, 266, 366	Camferol	
8	7.63	210, 266, 346	Acacetina	
9	8.4	204, 254, 266, 356	Luteolina	
10	11.41	210, 290	Pinocembrina	
11	15.11	210, 266, 312	Crisina	

Apéndice 4. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Partición hexánica del EEPC.

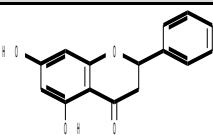
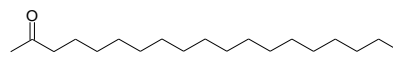
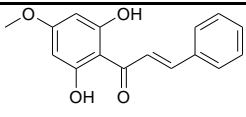
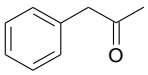
Cuadro 14. Metabolitos secundarios identificados en la partición hexánica del EEPC.

Nombre	Tiempo de Retención (min)	Porcentaje de abundancia	Tipo de compuesto	Estructura química
Éster metílico del ácido 9 – octadecanoico	25.043	20.113%	Ácido graso	
14-metil-, metil éster del ácido pentadecanoico	22.859	18.651%	Ácido graso	
2-Nonadecanona	27.389	14.466%	Cetona	
Eicosano	26.156	7.806%	Alcano	
α bisabolol	19.832	7.529%	Sesquiterpeno	
Metil 18-metilnonadecanoato	27.561	6.435%	Ácido graso	
Metil éster del ácido behénico	29.556	5.999%	Ácido graso	
2-Heptadecanona	25.098	5.144%	Cetona	
Éster metílico del ácido octadecanoico	25.317	4.550%	Ácido graso	
E-3-Pentadecen-2-ol	26.507	1.112%	Alcohol	

Miristato de metilo	20.200	0.664%	Ácido graso	
Metil éster del ácido heneicosanoico	28.584	0.445%	Ácido graso	

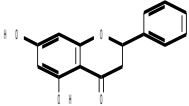
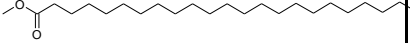
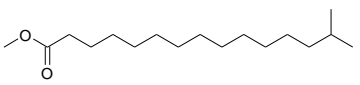
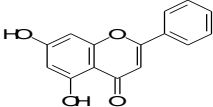
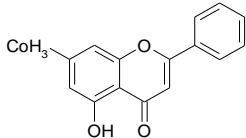
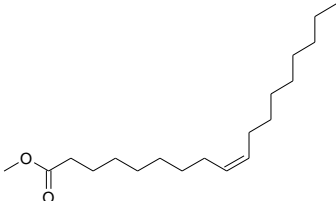
Partición con diclorometano del EEPC.

Cuadro 15. Metabolitos secundarios identificados en la partición diclorometánica del EEPC.

Nombre	Tiempo de Retención (min)	Porcentaje de abundancia	Tipo de compuesto	Estructura química
Pinocembrina	29.599	89.02%	Flavanona	
N.I.	13.379	2.35%		
2-Nonadecanona	27.381	1.67 %	Cetona	
Chalcona pinostrobrina	28.674	1.62%	Chalcona	
Fenilacetona	10.433	1.55%	Fenol-Cetona	

Partición metanólica del EEPC.

Cuadro 16. Metabolitos secundarios identificados en la partición metanólica del EEPC.

Nombre	Tiempo de Retención (min)	Porcentaje de abundancia	Tipo de compuesto	Estructura química
Pinocembrina	26.589	10.273%	Flavanona	
Tetracosanoato de metilo	26.871	2.954%	Ácido graso (monoglicérido)	
Isohexadecanoato de metilo	22.876	2.438%	Ácido graso	
Crisina	26.400	2.275%	Flavona	
Tectocrisina	22.161	2.270%	Flavona	
Ester metílico del ácido oleico	25.051	1.009%	Ácido graso	

Apéndice 5. Conteo de Fenoles totales.

La concentración de fenoles totales se mide por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, donde es empleado el reactivo de Folin-Ciocalteu. El reactivo de coloración amarillo y pH ácido, contiene molibdato y tungstato de sodio que tienen la capacidad de reaccionar con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngsticos. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngsticos en óxidos, cromógenos de color azul intenso de tungsteno (W_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de las moléculas [106].

Para la curva de calibración se emplea ácido gálico, que es una pequeña molécula que, debido, a su estabilidad y estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a tres grupos hidroxilo.

Curva de calibración

Se utiliza una solución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL. A partir de esta solución se forman alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.00625, 0.0125, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL); a cada una se le agrega el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas de en un volumen final de 1 mL.

Preparación del extracto

Se prepara una solución estándar (200 μ g/mL) de la cual se toma una alícuota de 250 μ L y se agregan 750 μ L de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL.

Se toma 1mL de cada concentración y se transfiere a un tubo de ensayo con 7 mL de agua destilada; a continuación, se adicionan 500 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu.

Después de cinco minutos se añaden 1.5 mL de una solución de Na_2CO_3 (200g/L) y agua hasta completar un volumen de 10 mL. La mezcla resultante se deja reposar durante dos horas, tiempo en el cual todos sus componentes reaccionan a temperatura ambiente, y se lee la absorbancia a 760 nm. Cada concentración se lee por triplicado.

Tubo	Ácido gálico (mg/mL)	Patrón (ácido gálico μ L)	Agua destilada (μ L)	Agua destilada (mL)	Folin-Ciocalteu (μ L)	Na ₂ CO ₃ (mL)
Blanco	-----	-----	-----	7	500	1.5
1	0.00625	31.25	968.75	7	500	1.5
2	0.0125	62.5	937.5	7	500	1.5
3	0.0250	125	875	7	500	1.5
4	0.05	250	750	7	500	1.5
5	0.1	500	500	7	500	1.5
6	0.2	1000	0	7	500	1.5
Problema	-----	250	750	7	500	1.5
Problema	-----	500	500	7	500	1.5

Para la interpretación de resultados se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener una curva patrón de ácido gálico. Para conocer la concentración de fenoles del extracto problema, se utiliza un análisis de regresión lineal, interpolando la absorbancia de las muestras evaluadas.

Apéndice 6. Flavonoides totales.

Este método se basa en el viraje de color de una solución de AlCl_3 a color amarillo por la formación de complejos estables ácidos con el grupo ceto en C-4, o bien el grupo hidroxilo C-3 o C-5 de flavonas y flavonoides, así como la formación de complejos lábiles ácidos con los grupos orto-dihidroxil en el anillo A o B de los flavonoides. En el stock de quercetina se pesan 3 mg de quercetina, los cuales se disuelven en 3 mL de MeOH grado HPLC.

Curva patrón

Se toman alícuotas necesarias del stock de quercetina para la preparación de la curva patrón, con las concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ppm y se les agrega 1 mL de AlCl_3 al 2%.

El stock del extracto se realiza pesando 3mg del extracto etanólico y se disuelven en 3 mL de MeOH grado HPLC. Para el blanco se toma 1 mL del stock del extracto y 1 mL de MeOH grado HPLC. Por último, el problema se realiza tomando 1 mL del stock del extracto y se le agrega 1 mL de AlCl_3 al 2%.

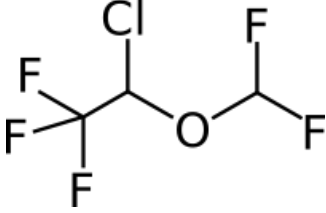
Se vierten 200 μL de las soluciones preparadas para la curva patrón, el problema, el blanco y el control negativo en una placa de ELISA y se lee por triplicado. Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 450 nm.

En la interpretación de resultados se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de quercetina. Para el problema, se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola el promedio de la absorbancia de la muestra a evaluar.

Apéndice 7. Isoflurano.

El Isoflurano es un éter halogenado, utilizado para la inducción y mantenimiento de la anestesia general por inhalación (Cuadro 17). Al igual que otros anestésicos generales, el Isoflurano inhibe la conducción de los potenciales de acción y su transmisión sináptica. El mecanismo de acción exacto a nivel subcelular no está todavía totalmente aclarado. La inducción y especialmente la recuperación son rápidas [107].

Cuadro 17. Nombre y estructura química del Isoflurano.

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

Se utilizó la presentación Lisorane de laboratorio Baxter (Figura 26), siguiendo el método que se muestra a continuación: se coloca un algodón dentro de un tubo cónico de 15 mL, posteriormente el algodón es impregnado con 30 μ L/ratón de Isoflurano; esta dosis fue estandarizada y se usa para ratones que cuenten con un peso de 20-30 g. Para su uso 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.

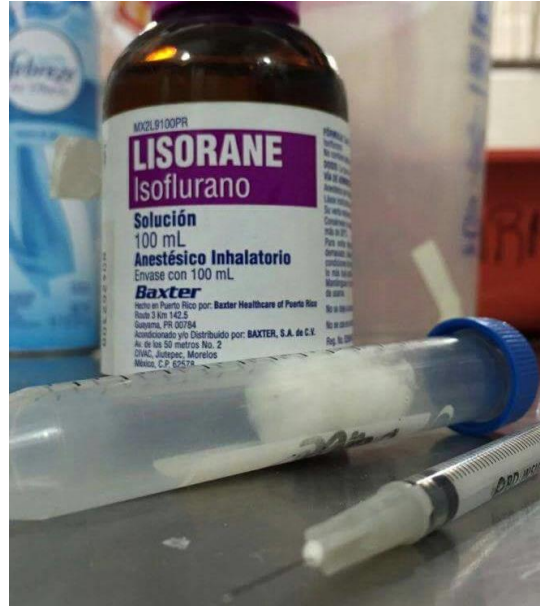


Figura 26. Presentación comercial del Isoflurano empleado en este estudio.

Apéndice 8. Recoverón-NC.

El ácido acexámico es un fármaco utilizado para acelerar el proceso de cicatrización y la regeneración tisular; además, la presentación de Recoverón-NC (Figura 27), contiene neomicina al 5% con el fin de eliminar o prevenir cualquier agente patógeno que pueda retrasar el proceso cicatrizante (Cuadro 18).

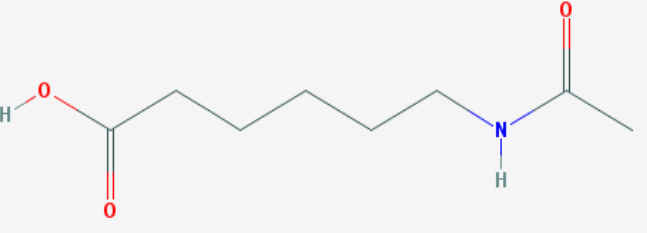
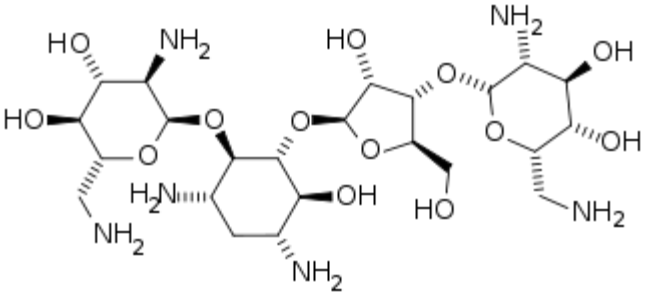


Figura 27. Recoverón-NC, presentación comercial en crema.

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 proteica 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 [25]. Por otro lado, la neomicina es un antibiótico de amplio espectro, entre las especies de gramnegativos, muy sensibles a la neomicina están: *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*. Los microorganismos Gram positivos inhibidos incluyen: *S. aureus*, *Enterobacter faecali*, *Mycobacterium tuberculosis*.

Sin embargo, como cualquier otro medicamento ha presentado casos de ardor que suele presentarse en el momento de su aplicación, el cual cede en pocos minutos. En general ha mostrado buena tolerancia, a excepción de algunos casos de hipersensibilidad al principio activo o a cualquiera de sus excipientes.

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

Principios activos	Estructura química
Ácido acexámico	 <p>The image shows the chemical structure of acetic acid (CH₃COOH). It consists of a central carbon atom double-bonded to an oxygen atom (shown in red) and single-bonded to a hydroxyl group (H-O, with the oxygen in red) and a methyl group (CH₃). The methyl group is connected to a nitrogen atom (shown in blue) which is also bonded to a hydrogen atom (H) and another methyl group (CH₃).</p>
Neomicina	 <p>The image shows the chemical structure of neomycin, a complex aminoglycoside antibiotic. It features a central 2-deoxystreptamine ring system with two amino groups (NH₂) and one hydroxyl group (OH). This central ring is linked via glycosidic bonds to three other rings: a 2-deoxyribose sugar, a ribose sugar, and a 2-amino-2-deoxyribose sugar. Each of these outer rings has its own set of hydroxyl and amino groups, creating a highly complex and polar molecule.</p>

Apéndice 9. Técnica histológica.

La técnica histológica tradicional inicia obteniendo las muestras de tejido para inmediatamente fijarlas con formol al 10% amortiguado con sales de fosfato durante 24 horas, una vez pasado ese tiempo se someten a deshidratación en alcoholes de concentración creciente desde el 70 % hasta el alcohol absoluto, durante dos horas en cada uno. Después, con el fin de aclarar las muestras, se pasan por butanol I y II durante dos horas, para finalmente ser incluidas en parafina, constituyendo así los bloques histológicos que serán cortados con el micrótopo. Los cortes deberán tener un grosor de cinco micras y se colocarán en el portaobjetos con unas gotas de alcohol al 50% para la extensión del tejido, posteriormente, será colocado por unos segundos en el baño de flotación para asegurar que el tejido quede pegado al portaobjetos.

Apéndice 10. Tinción Hematoxilina – Eosina (H-E).

Para realizar la tinción, los cortes se colocan 24 horas antes en un horno para ser desparafinados por medio de calor. Para eliminar cualquier exceso de parafina se realizan lavados con xilol; posteriormente, se hidratan los cortes realizando lavados con alcoholes en orden decreciente del 100 al 70% de concentración para finalmente lavarlos en agua, después los cortes se dejan tres minutos en Hematoxilina, pasado ese tiempo, se continua haciendo lavados en agua amoniacal y después se colocan en Eosina por siete minutos, continuando con la deshidratación de los cortes con alcoholes en forma creciente del 70 al 100%, para finalmente ser montados con resina sintética. Una vez que la resina este seca las laminillas están listas para ser observadas al microscopio.

Apéndice 11. Método tensiométrico.

El método tensiométrico [33] se utiliza para evaluar la fuerza de cierre en el proceso de cicatrización, mediante la resistencia que presente la cicatriz al colocarle un contrapeso. Para este método se realizará una herida paravertebral de un centímetro de longitud en el dorso de los animales (Figura 28), se aplicará tratamiento durante catorce días y el último día los ratones serán sacrificados utilizando una cámara de CO₂. Se medirá la fuerza con la que se abre la cicatriz utilizando la técnica de flujo de agua con ayuda de un dispensador de garrafrones al centro, conectado mediante mangueras a un recipiente de agua de cada lado; posteriormente, con pinzas Halsted se sujetará la piel del ratón a 3 mm de la cicatriz, esta pinza está sujeta a una piola atada a los recipientes de agua que se encuentran en los lados, tal como se muestra en la figura 29. Posteriormente, se permitió el flujo de agua hasta notar que la cicatriz comenzaba a abrirse (Figura 30), en ese momento se tomará el volumen del agua recaudada en cada uno de los recipientes y dada la densidad del agua, se convirtió este volumen en gramos que se utilizaron para evaluar la fuerza de cierre que presentó la cicatriz.

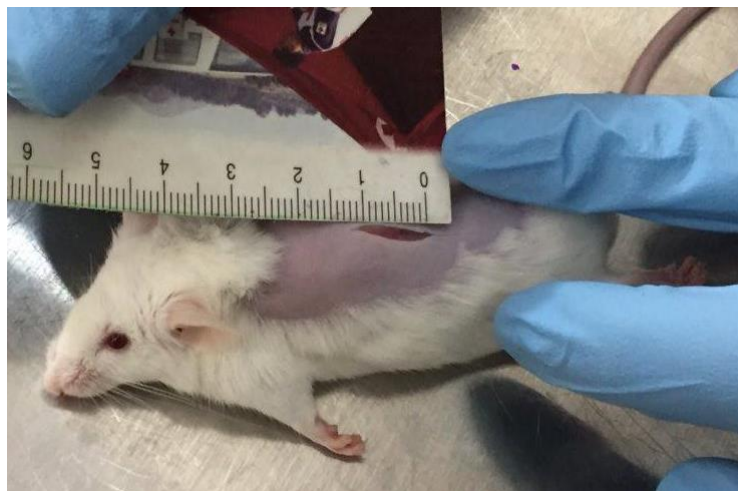


Figura 28. Realización de las heridas paravertebrales de 1 cm de longitud.



Figura 29. Sistema utilizado para la evaluación de la fuerza de cierre, mediante el método tensiométrico.



Figura 30. Momento exacto cuando la herida alcanza el peso necesario y se abre.

REFERENCIAS

1. Hidalgo Alegria, O., *Determinación del efecto cicatrizante del extracto acuotánico de la planta Bacopa procumbens en la línea celular 3t3 de fibroblastos de ratón*. 2010.
2. Rivera, E.V., V. Molina, y J.E. Coka. *Fisiología de la cicatrización*. 2004; Disponible en: www.medicosecuador.com/librosecng/articulos/1/fisiologia_de_la_cicatrizacion.
3. García, G.M., et al., *La cicatrización de las heridas*. Enfermería Dermatológica, 2008. **3**.
4. Teller, P. y T.K. White, *Fisiología de la cicatrización de la herida: de la lesión a la maduración*. Surg Clin N Am, 2009. **89**(3): p. 599-610.
5. Brunicardi, F., et al., *Principles of surgery*. Principles of surgery, 2005.
6. Eming, S.A., T. Krieg, y J.M. Davidson, *Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms*. Journal of Investigative Dermatology, 2007. **127**(3): p. 514-525.
7. Schugart, R.C., et al., *Wound angiogenesis as a function of tissue oxygen tension: a mathematical model*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(7): p. 2628-2633.
8. Martin, P., *Wound healing--aiming for perfect skin regeneration*. Science, 1997. **276**(5309): p. 75-81.
9. Vélez Correal, F.X., *Actividad Cicatrizante In Vivo de los Extractos Metanólicos de justicia Chlorostochya y Plectranthus Amboinicus en ratones diabéticos inducidos mediante Estreptozotocina*. 2015, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
10. Pardo, V. y D. Alexandra, *Evaluación de la actividad cicatrizante y caracterización fitoquímica de Dracontium croatii/Evaluation of the wound healing activity and phytochemistry characterization of Dracontium croatii*. 2009, Universidad Nacional de Colombia.

11. Ramos, A. y J.D. Miranda, *Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions*. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 2007. **13**(4): p. 697-710.
12. Ivanovska, N., et al., *Immunodulatory action of propolis: VII. A comparative study on cinnamic and caffeic acid lysine derivatives*. Dokladi na Bulgarskata Akademia na Naukite, 1993. **46**(10): p. 115-118.
13. Castaldo, S. y F. Capasso, *Propolis, an old remedy used in modern medicine*. Fitoterapia, 2002. **73**: p. S1-S6.
14. Marcucci, M.C., *Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity*. Apidologie, 1995. **26**(2): p. 83-99.
15. Park, Y.K., et al., *Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1998. **18**(3): p. 313-318.
16. Khayyal, M., M. El-Ghazaly, y A. El-Khatib, *Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract*. Drugs under experimental and clinical research, 1993. **19**(5): p. 197-203.
17. Ghisalberti, E., *Propolis: a review*. Bee world, 1979. **60**(2): p. 59-84.
18. Kartal, M., et al., *Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia*. Journal of Ethnopharmacology, 2003. **86**(1): p. 69-73.
19. Grunberger, D., et al., *Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis*. Cellular and Molecular Life Sciences, 1988. **44**(3): p. 230-232.
20. Mathews, K.A. y A. Binning, *Wound management using honey*. Compend. Con. Edu, 2002. **24**(1): p. 53-59.
21. Rivera Yañez, N., *Comparación de las propiedades biológicas del propóleo de diferentes estados de la República Mexicana*, in *Escuela Superior de Medicina*. 2013, Instituto Politécnico Nacional: México, D.F. p. 156.
22. De Albuquerque-Júnior, R.L.C., et al., *Effect of Bovine Type-I Collagen-Based Films Containing Red Propolis on Dermal Wound Healing in Rodent Model*. International Journal of Morphology, 2009. **27**(4).
23. Domínguez, X., *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Limusa. 2*. Edición. México, 1973.

24. Linstrom, P. y W. Mallard, *NIST standard reference database number 69, NIST Chemistry WebBook*. 2013, Retrieved November.
25. NCBI. *PubMed Compound del National Center of Biotechnology Information*. . 2005 Diciembre de 2016; Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2005>.
26. Franco, E.M., *Actividad antioxidante in vitro de las bebidas de frutas*. Bebidas-Alfa Editores Técnicos, Junio/Julio, 2006: p. 20-27.
27. Singleton, V.L., R. Orthofer, y R.M. Lamuela-Raventós, [14] *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent*. *Methods in enzymology*, 1999. **299**: p. 152-178.
28. Ramamoorthy, P.K. y A. Bono, *Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of Morinda citrifolia fruit extracts from various extraction processes*. *Journal of Engineering Science and Technology*, 2007. **2**(1): p. 70-80.
29. Vaden, B. y A. Vlietinck, *Screening Methods For Antibacterial And Antiviral Agents From Higher Plants*. *Methods for plant Biochemistry*, 1991. **6**: p. 47-68.
30. De Aluja, A.S., *Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999)*. *Gac Med Mex*, 2002. **138**(3): p. 295-8.
31. OECD., *Guidelines for the Testing of Chemicals OECD 402. Acute Dermal Toxicity*. *Organisation for Economic Cooperation and Development*. 1987: Paris.
32. Hawk, T.C., S.L. Leary, y T.H. Morvis., *Formulary for Laboratory Animals*. 2da ed. 1999: Blackwell Publishing.
33. Vaisberg, A.J., et al., *Taspine is the cicatrizant principle in Sangre de Grado extracted from Croton lechleri*. *Planta medica*, 1989. **55**(02): p. 140-143.
34. Zeghad, N. y R. Merghem, *Antioxidant and antibacterial activities of Thymus vulgaris L*. *Med. Aromat. Plant Res. J*, 2013. **1**: p. 5-11.
35. Jabbari, M. y F. Gharib, *Solvent dependence on antioxidant activity of some water-insoluble flavonoids and their cerium (IV) complexes*. *Journal of Molecular Liquids*, 2012. **168**: p. 36-41.
36. Salas, M.P., et al., *Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species*. *Food Chemistry*, 2011. **124**(4): p. 1411-1415.

37. Cvetnic, Z. y S. Vladimir-Knezevic, *Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract*. Acta Pharm, 2004. **54**(3): p. 243-250.
38. Ribeiro, I.A., et al., *Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2008. **52**: p. 13-18.
39. Diaz-Uribe, C.E., et al., *Study of scavenging capacity of naringin extracted from Citrus uranum peel against free radicals*. Prospectiva, 2016. **14**(2): p. 31-35.
40. Makovšek, K., *Isolation and Characterisation of Flavonoids From Citrus Peels*. 2013, University of Maribor, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering.
41. Song, N., et al., *Naringin promotes fracture healing through stimulation of angiogenesis by regulating the VEGF/VEGFR-2 signaling pathway in osteoporotic rats*. Chemico-biological interactions, 2017. **261**: p. 11-17.
42. Modak, B., et al., *Actividad antibacteriana de flavonoides aislados del exudado resinoso de Heliotropium sinuatum: efecto del tipo de estructura*. Boletín de la Sociedad Chilena de Química, 2002. **47**(1): p. 19-23.
43. Vargas-Sánchez, R., et al., *Study of the molecular structure and chemical reactivity of pinocembrin by DFT calculations*. Computational and Theoretical Chemistry, 2015. **1058**: p. 21-27.
44. Yang, S., et al., *Bioassay-guided isolation and identification of antifungal components from propolis against Penicillium italicum*. Food Chemistry, 2011. **127**(1): p. 210-215.
45. Rasul, A., et al., *Pinocembrin: a novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities*. BioMed research international, 2013. **2013**.
46. Sala, A., et al., *Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside*. European journal of pharmacology, 2003. **461**(1): p. 53-61.
47. Zhou, L.-t., et al., *Pinocembrin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators production in BV2 microglial cells through suppression of PI3K/Akt/NF- κ B pathway*. European journal of pharmacology, 2015. **761**: p. 211-216.

48. Lan, X., et al., *The natural flavonoid pinocembrin: molecular targets and potential therapeutic applications*. Molecular neurobiology, 2016. **53**(3): p. 1794-1801.
49. Tanjung, M., T.S. Tjahjandarie, y M.H. Sentosa, *Antioxidant and cytotoxic agent from the rhizomes of Kaempferia pandurata*. Asian Pacific journal of tropical disease, 2013. **3**(5): p. 401-404.
50. Fan, R., et al., *Anti-inflammatory and anti-arthritic properties of naringenin via attenuation of NF- κ B and activation of the heme oxygenase HO-1/related factor 2 pathway*. Pharmacological Reports, 2017.
51. Pinho-Ribeiro, F.A., et al., *The citrus flavonone naringenin reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and leukocyte recruitment by inhibiting NF- κ B activation*. The Journal of nutritional biochemistry, 2016. **33**: p. 8-14.
52. Helle, J., et al., *Assessment of the proliferative capacity of the flavanones 8-prenylnaringenin, 6-(1.1-dimethylallyl) naringenin and naringenin in MCF-7 cells and the rat mammary gland*. Molecular and cellular endocrinology, 2014. **392**(1): p. 125-135.
53. Cheng, H.-L., et al., *Antiinflammatory and antioxidant flavonoids and phenols from Cardiospermum halicacabum (Dào Dì Líng)*. Journal of traditional and complementary medicine, 2013. **3**(1): p. 33-40.
54. Pinelo, M., et al., *Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (Prunus amygdalus) and pine sawdust (Pinus pinaster)*. Food Chemistry, 2004. **85**(2): p. 267-273.
55. Hollman, P.C., et al., *Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man*. FEBS letters, 1997. **418**(1-2): p. 152-156.
56. Zhao, M.-H., et al., *Flavonoids in Juglans regia L. leaves and evaluation of in vitro antioxidant activity via intracellular and chemical methods*. The Scientific World Journal, 2014. **2014**.
57. Abdallah, H.M., et al., *Anti-inflammatory activity of flavonoids from Chrozophora tinctoria*. Phytochemistry letters, 2015. **13**: p. 74-80.
58. Cabral, I.S.R., et al., *Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira*. Química Nova, 2009.

59. Li, A.-N., et al., *Resources and biological activities of natural polyphenols*. Nutrients, 2014. **6**(12): p. 6020-6047.
60. Seelinger, G., I. Merfort y C.M. Schempp, *Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin*. Planta medica, 2008. **74**(14): p. 1667-1677.
61. Ueda, H., C. Yamazaki y M. Yamazaki, *Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of Perilla frutescens*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2002. **25**(9): p. 1197-1202.
62. Ren, J., et al., *Two new phenanthrene glycosides from Liparis regneri Finet and their antibacterial activities*. Phytochemistry Letters, 2016. **18**: p. 64-67.
63. Kanekar, Y., et al., *Regioselective synthesis of phenanthrenes and evaluation of their anti-oxidant based anti-inflammatory potential*. European journal of medicinal chemistry, 2013. **67**: p. 454-463.
64. Ding, D.-J., et al., *Synthesis and antioxidant activity of hydroxylated phenanthrenes as cis-restricted resveratrol analogues*. Food chemistry, 2012. **135**(3): p. 1011-1019.
65. Girardi, F.A., et al., *Phytochemical profile and antimicrobial properties of Lotus spp.(Fabaceae)*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2014. **86**(3): p. 1295-1302.
66. Suzuki, J., et al. *Catechins attenuate myocardial cell infiltration and fibrosis but do not prolong graft survival in murine cardiac allografts*. in *Transplantation proceedings*. 2005. Elsevier.
67. Lambert, J.D., et al., *Synthesis and biological activity of the tea catechin metabolites, M4 and M6 and their methoxy-derivatives*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2005. **15**(4): p. 873-876.
68. Martínez-Flórez, S., et al., *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*. Nutr Hosp, 2002. **17**(6): p. 271-278.
69. Pérez Trueba, G., *Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 2003. **22**(1): p. 0-0.
70. Fujimoto, A., *Identificação de compostos orgânicos voláteis e antibióticos produzidos por Bacillus spp. envolvidos no controle da mancha preta dos citros*. 2017.

71. Da Costa Abreu, V.G., *Estudo fitoquímico e biológico das folhas, caule e flores de lychnophora pinaster mart.* 2009.
72. Berry, E., et al., *Eicosanoids: Emerging contributors in stem cell-mediated wound healing.* Prostaglandins & other lipid mediators, 2016.
73. Kamatou, G.P. y A.M. Viljoen, *A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils.* Journal of the American Oil Chemists' Society, 2010. **87**(1): p. 1-7.
74. De Sousa Oliveira, F., et al., *Evaluation of the antibacterial and modulatory potential of α -bisabolol, β -cyclodextrin and α -bisabolol/ β -cyclodextrin complex.* Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017. **92**: p. 1111-1118.
75. Vila, R., et al., *Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampaensis*, a new source of α -bisabolol.* Bioresource technology, 2010. **101**(7): p. 2510-2514.
76. Ortiz, M.I., et al., *Isolation, identification and molecular docking as cyclooxygenase (COX) inhibitors of the main constituents of *Matricaria chamomilla* L. extract and its synergistic interaction with diclofenac on nociception and gastric damage in rats.* Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016. **78**: p. 248-256.
77. Muñoz, O., et al., *Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante.* Química Nova, 2007. **30**(4): p. 848.
78. Cabral, I.S.R., *Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira.* 2008, Universidade de São Paulo.
79. Reidel, R.V.B., *Potencial antifúngico e antibiofilme de diferentes tipos de própolis brasileiras sobre isolados patogênicos de espécies de candida não-albicans.* 2014.
80. Tuchinda, P., et al., *Anti-inflammatory cyclohexenyl chalcone derivatives in *Boesenbergia pandurata*.* Phytochemistry, 2002. **59**(2): p. 169-173.
81. Almeida, R.F.d., *Estudo químico de rizomas de *Alpinia zerumbet*: inibidores da enzima de conversão da angiotensina, com potencial antioxidante e de inibição da acetilcolinesterase.* 2012.
82. Al-Fatimi, M., et al., *Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen.* Journal of Ethnopharmacology, 2007. **111**(3): p. 657-666.

83. Lee, K., et al., *Effect of Ampelopsis Radix on wound healing in scalded rats*. BMC complementary and alternative medicine, 2015. **15**(1): p. 213.
84. Palacios-Cruz, N., *Análisis químico de una muestra de propóleo recolectada en Chihuahua, México* in *Facultad de Química*. 2016, Universidad Nacional Autónoma de México: México, D.F. p. 63.
85. Chaillou, L.L. y M.A. Nazareno, *Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition*. LWT-Food Science and Technology, 2009. **42**(8): p. 1422-1427.
86. Catarino, M., et al., *The Antiinflammatory Potential of Flavonoids: Mechanistic Aspects*. 2016.
87. Leppkes, M., et al., *Pleiotropic functions of TNF- α in the regulation of the intestinal epithelial response to inflammation*. International immunology, 2014. **26**(9): p. 509-515.
88. Moura, S.A.L.d., et al., *Aqueous extract of Brazilian green propolis: primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges*. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine, 2009. **2011**: p. 35.
89. Hu, F., et al., *Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models*. Journal of Ethnopharmacology, 2005. **100**(3): p. 276-283.
90. Carhuallanqui, E. y V. Vanessa, *Actividad Analgésica del Extracto y Antiinflamatoria de una Crema Formulada a Base del Extracto Hidroalcohólico de las Hojas Frescas de Artocarpus Altilis (Park.) Fosberg "Pan de Árbol" en Ratones*. 2016.
91. Li, Y.-C., et al., *Anti-inflammatory activity of patchouli alcohol isolated from Pogostemonis Herba in animal models*. Fitoterapia, 2011. **82**(8): p. 1295-1301.
92. Fernández-Calienes Valdés, A., et al., *Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de Artemia salina L*. Revista Cubana de Medicina Tropical, 2009. **61**(3): p. 254-258.
93. Islas, P., et al., *Intoxicación aguda por fenoles*. Revista chilena de pediatría, 1987. **58**(5): p. 402-404.

94. Camps, I.B., et al., *Evaluación de la irritabilidad dérmica, oftálmica y el efecto sensibilizante de la crema ulceprol*. Anuario Toxicología, 2001. **1**(1): p. 93-7.
95. Capote, M.R.P., et al., *Evaluación toxicológica de una tintura de propóleos*. Acta Farm. Bonaerense, 2003. **22**(1): p. 61-4.
96. Khorasgani, E.M., A. Karimi y M. Nazem, *A comparison of healing effects of propolis and silver sulfadiazine on full thickness skin wounds in rats*. Pak Vet J, 2010. **30**(2): p. 72-74.
97. Mulisa, E., K. Asres y E. Engidawork, *Evaluation of wound healing and anti-inflammatory activity of the rhizomes of Rumex abyssinicus J.(Polygonaceae) in mice*. BMC complementary and alternative medicine, 2015. **15**(1): p. 341.
98. Guzmán, R.A., *Dermatología, Atlas, Diagnóstico y Tratamiento*. 6ta. ed. 2015, México: McGraw-Hill.
99. Welsch, U. y J. Sobotta, *Histología*. 2008: Ed. Médica Panamericana.
100. Sepúlveda Saavedra, J., *Texto atlas de histología: biología celular y tisular*. 2013: McGraw Hill Mexico.
101. Navarrete, F.G., *Histología de la piel*. Revista de la Facultad de Medicina, UNAM, 2003. **46**(4): p. 130-133.
102. Huether, E. y L.K.M. Canse, *Understanding Pathophysiology*. 2da. ed. 2000, Estados Unidos de América: Editorial Mosby.
103. INAFED. *Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México, Aquiles Serdán*. [citado 13 de febrero, 2017]; Disponible en: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM08chihuahua/municipios/08004a.html>.
104. Estrada-Castillón, E. y J.Á. Villarreal-Quintanilla, *Flora del centro del estado de Chihuahua, México*. Acta botánica mexicana, 2010(92): p. 51-118.
105. Rzedowski, J., *Vegetación de México*. 4ta. ed. 1978, México, D.F.: Editorial Limusa.
106. Avella, D.M.G., C.A.O. García y A.M. Cisneros. *Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal*. En *Memorias del Simposio de Metrología*. Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Nacional de Querétaro. 2008.

107. Agencia Española de Medicina y Productos Naturales, *Ficha Técnica: Isoflurano NIBSA*. 2008, Madrid, España: Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad.
108. Draize, J.H., G. Woodard y H.O. Calvery, *Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1944. **82**(3): p. 377-390.
109. Madigan, M.T., J.M. Martinko y J.P. Brock, *Biología de los microorganismos*. 10 a ed. 2004, Madrid, España: Pearson-Prentice Hall.