



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE CICATRIZACIÓN IN VITRO Y DESARROLLO DE PRUEBAS ADICIONALES A LAS ESTABLECIDAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA CRUDA DE *Iostephane heterophylla* (Cav.) Benth. Ex Hemsl.

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. Agrícola. Karina Liliana Zarco Tovar

TUTORA

Dra. María Isabel Aguilar Laurents

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE CICATRIZACIÓN IN VITRO Y DESARROLLO DE
PRUEBAS ADICIONALES A LAS ESTABLECIDAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE
LA DROGA CRUDA DE *Iostephane heterophylla* (Cav.) Benth. Ex Hemsl.**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q. Agrícola. KARINA LILIANA ZARCO TOVAR



TUTORA: DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, Noviembre 2018

Jurado

Presidente	Dr. Manuel Jiménez Estrada
Vocal	Dra. Rachel Mata Essayag
Vocal	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal	Dr. Higinio Arzate
Secretario	Dr. Andrés Navarrete Castro

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:

- Laboratorio 111, Conjunto E, Departamento de Farmacia. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Las pruebas biológicas se realizaron en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Odontología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Higinio Arzate.

Q. Agrícola. Karina Liliana Zarco Tovar

Sustentante

Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Tutora

El presente trabajo se presentó en los congresos internacionales:

1. 14^a. Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. “Pruebas de proliferación celular con extractos obtenidos de la raíz de *Iostephane heterophylla* (escorcionera)”. Karina Zarco Tovar, J. Fausto Rivero Cruz, Higinio Arzate, María I. Aguilar Laurents. del 23 al 26 de mayo de 2018, Cuernavaca, Morelos, México
2. 57-th Annual Meeting of the Phytochemical Society of North America (PSNA). “Wound healing *in vitro* assays by *Iostephane heterophylla* extracts and HS-SPME/GC-MS-TOF analysis of the volatile compounds from its roots”. María I. Aguilar, Karina Zarco Tovar, Sonia López Letayf, Higinio Arzate, del 4 al 8 de agosto de 2018 en la ciudad de San Luis Potosí, México.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Facultad de Química, por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación académica.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA), por la beca otorgada a través del proyecto IN 225017, a cargo de la Dra. María Isabel Aguilar Laurents.

Este trabajo de tesis fue apoyado por los proyectos PAPIIT IN 225017 y PAIP 50009131.

A la Dra. María Isabel Aguilar Laurents por brindarme su confianza, su apoyo incondicional, por ser una guía, compartiéndome sus conocimientos y su calidad humana.

A los miembros del jurado: Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dra. Rachel Mata Essayag, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dr. Higinio Arzate y Dr. Andrés Navarrete Castro, por la revisión del presente trabajo y por sus valiosos comentarios que ayudaron a mejorarlo.

Al Dr. Higinio Arzate por su invaluable asesoría durante la realización de las pruebas biológicas de este proyecto de investigación, así como a la M. en C. Sonia López Letayf.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz por su apoyo en las pruebas de identidad, así mismo a la Q. Karen Tatiana Hernández Osorio por su asesoría durante parte de las pruebas de composición.

A la Dra. Nuria Esturau Escofet, por su asesoría en la realización de los experimentos de RMN¹H.

A la Q. Georgina Duarte Lisci por su apoyo en la realización de las pruebas de identidad por DSA-HR-APCI-MS.

Al personal técnico de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI), particularmente se agradece a las M. en C. Rosa Isela del Villar, M. en C. Nayeli López Balbiaux y Q. Marisela Gutiérrez de la FQ, UNAM, por el registro de los espectros para el análisis de espectroscopía y espectrometría.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 111, 113 y 126 así como a los del Instituto de Química, porque hicieron de este tiempo inolvidable al compartir buenos momentos y que el trabajo fuera más ligero: Valeria, Alfredo, Ulises, Gonzalo, Giuseppe, Tania, Araceli, Sergio, Montse, Karen, Marco, Christian, Mario, Alejandra, Rocío, Olivia y en especial a Laura Navarro.

A Oscar Palomino por llegar a sacudir mi vida, convertirse en un amigo y una inspiración en este camino así como a los que siguen a mi lado: Mauricio A. Bernal, Priscila Chávez, Cristian Z. Bernal y Francisco J. Mondragón.

A mi familia por su apoyo incondicional y seguir alentándome a pesar de todo lo que pasó para llegar hasta aquí. La vida no me alcanzará para agradecerles todo.

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
1. ANTECEDENTES	3
1.1 Familia botánica Asteraceae	3
1.2 Características del género <i>Iostephane</i>	3
1.3 Características de la especie <i>Iostephane heterophylla</i>	3
1.3.1 Distribución y hábitat	3
1.3.2 Composición química.....	4
1.3.3 Clasificación taxonómica.....	8
1.3.4 Descripción botánica.....	8
1.3.5 Nombres comunes.....	9
1.3.6 Usos	10
1.4 Antecedentes farmacológicos	10
1.5 Control de calidad de <i>I. heterophylla</i>	12
1.6 Cicatrización de heridas.....	14
1.6.1 Fase inflamatoria	15
1.6.2 Fase proliferativa	15
1.6.3 Fase de remodelación	17
1.7 Fibroblastos y su participación en la reparación de heridas	18
1.8 Tratamiento.....	18
1.9 Fitoterapia para heridas y cicatrización.....	18

2. JUSTIFICACIÓN	21
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Objetivo general	22
3.2 Objetivos particulares	22
4. PARTE EXPERIMENTAL	23
4.1 Material y equipo utilizado	23
4.2 Adquisición e identificación del material vegetal	23
4.3 Obtención del extracto acuoso y fracción de cloroformo	23
4.4 Obtención de extractos orgánicos por proceso de fraccionamiento por reparto.....	24
4.5 PRUEBA DE EFICACIA	25
4.5.1 Preparación de las muestras para el ensayo biológico	25
4.5.2 Evaluación de la confluencia de fibroblastos gingivales, simulando una “herida”	25
4.6 PRUEBAS DE COMPOSICIÓN.....	27
4.6.1 Obtención del aceite esencial de <i>I. heterophylla</i>	27
4.6.2 Determinación de compuestos volátiles por microextracción en fase sólida (HS-SPME-EM-TOF) de la raíz de <i>I. heterophylla</i>	27
4.6.2.1 Preparación de la muestra	27
4.6.2.2 Análisis por CG-EM	28
4.6.2.3 Procesamiento de datos para el análisis por SPME	28
4.6.2.4 Identificación de los compuestos volátiles	29
4.6.3 Determinación del contenido de fenoles totales.....	29
4.7 PRUEBAS DE IDENTIDAD	30
4.7.1 Análisis de diferentes lotes de <i>I. heterophylla</i> considerando al xantorrizol como compuesto marcador.....	30

4.7.1.1 Aislamiento de xantorrizol del extracto de cloroformo	30
4.7.1.1.1 Fraccionamiento cromatográfico primario	30
4.7.1.1.2 Fraccionamiento cromatográfico secundario	31
4.7.1.2 Preparación de las muestras	32
4.7.1.3 Identificación del xantorrizol por cromatografía en capa fina (CCF)	33
4.7.1.4 Identificación del xantorrizol utilizando DSA-HR-APCI-MS	33
4.7.1.5 Identificación del xantorrizol por resonancia magnética nuclear (RMN	34
4.7.2 Efecto de los extractos de prueba sobre la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC y determinación de la concentración mínima inhibitoria por el método de microdilución en placa	34
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
5.1 Obtención de la decocción y sus fracciones a partir de la raíz de <i>I. heterophylla</i> . Análisis por RMN ¹ H	36
5.2 PRUEBAS DE EFICACIA.....	39
5.2.1 Evaluación de la confluencia de fibroblastos gingivales, simulando una “herida”	39
5.3 Pruebas de composición.....	47
5.3.1 Identificación de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de la raíz de <i>I. heterophylla</i>	47
5.3.2 Compuestos volátiles mayoritarios por microextracción en fase sólida (HS-SPME-EM-TOF) de la raíz de <i>I. heterophylla</i>	49
5.3.3 Determinación de contenido de fenoles totales.....	51
5.4 PRUEBAS DE IDENTIDAD	54
5.4.1 Análisis de diferentes lotes de <i>I. heterophylla</i> considerando al xantorrizol como compuesto marcador.....	54

5.4.1.1 Aislamiento e identificación de xantorizol	54
5.4.1.2 Obtención de los extractos de metanol a partir de diferentes lotes de <i>I. heterophylla</i>	55
5.4.1.2.1 Identificación del xantorizol por cromatografía en capa fina (CCF)	58
5.4.1.2.2 Identificación del xantorizol por DSA-HR-APCI-MS	59
5.4.1.2.3 Identificación del xantorizol por resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ¹ H).....	60
5.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	64
6. CONCLUSIONES	66
7. PERSPECTIVAS.....	66
8. REFERENCIAS.....	67
9. ANEXO.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribución geográfica de <i>I. heterophylla</i> .	4
Figura 2.	Diterpenos aislados de <i>I. heterophylla</i> .	5
Figura 3.	Sesquiterpenos aislados de <i>I. heterophylla</i> .	6
Figura 4.	Otros constituyentes aislados de <i>I. heterophylla</i> .	7
Figura 5.	(a) Partes aéreas de <i>I. hererophylla</i> (Cav.) Benth.	9
	(b) Droga cruda.	9
Figura 6.	Esquema de extracción de <i>I. heterophylla</i> .	24
Figura 7.	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, D ₂ O) de la decocción.	36
Figura 8.	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) del extracto de cloroformo.	37
Figura 9.	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, D ₂ O) del extracto de AcOEt.	38
Figura 10.	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, D ₂ O) del remanente acuoso de la partición.	39
Figura 11.	Fórmula para la determinación del porcentaje de cicatrización de la “herida”.	39
Figura 12.	Porcentaje de cicatrización de fibroblastos gingivales en el ensayo con la decocción. Cada punto representa la media ± EEM n=18.	41
Figura 13.	Porcentaje de cicatrización de fibroblastos gingivales en el ensayo con el extracto de AcOEt. Cada punto representa la media ± EEM n=18.	42
Figura 14.	Porcentaje de cicatrización de fibroblastos gingivales en el ensayo con el extracto acuoso remanente de la extracción. Cada punto representa la media ± EEM n=18.	44
Figura 15.	Micrografías representativas de la evaluación de la confluencia de fibroblastos gingivales simulando una “herida”, con los diferentes extractos a la concentración donde tuvieron una mejor respuesta.	46
Figura 16.	Cromatograma del aceite esencial de la raíz de <i>I. heterophylla</i> .	47

Figura 17.	Cromatograma de los compuestos volátiles de la raíz de <i>I. heterophylla</i> .	51
Figura 18.	Curva de calibración para la determinación de fenoles totales.	52
Figura 19.	Comparación del contenido de fenoles totales expresados en mg de equivalentes de ácido gálico/g de extracto de metanol de raíz.	53
Figura 20.	Estructura del xantorrizol (1).	54
Figura 21.	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) del xantorrizol.	76
Figura 22.	Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) del xantorrizol.	77
Figura 23.	Cromatograma en capa fina de los extractos de metanol de los diferentes lotes de <i>I. heterophylla</i> (lh1-lh12), <i>I. madrensis</i> (lm), <i>Curcuma xanthorrhiza</i> (Cx) y xantorrizol (X). Revelador sulfato cérico amoniacal. Sistema de elución: cloroformo 100%.	58
Figura 24.	Comparación de los espectros de RMN ¹ H (700 MHz, CDCl ₃ , 25°C) de todos los extractos de metanol de los lotes analizados.	62
Figura 25.	Espectro de RMN ¹ H (700 MHz, CDCl ₃ , 25°C) de la muestra de referencia, xantorrizol.	63
Figura 26.	Multiplaca del ensayo para la determinación de la CMI. Tinción con resazurina.	64
Figura 27.	Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol lh-1.	78
Figura 28.	Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol lh-2.	78
Figura 29.	Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol lh-3.	78
Figura 30.	Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol lh-4.	78
Figura 31.	Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol lh-5.	79

Figura 32.	Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol lh-6.	79
Figura 33.	Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol lh-7.	79
Figura 34.	Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol lh-8.	79
Figura 35.	Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol lh-9.	80
Figura 36.	Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol lh-10.	80
Figura 37.	Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol lh-11.	80
Figura 38.	Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol lh-12.	80
Figura 39.	Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol lm.	81
Figura 41.	Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol Cx.	81

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Fraccionamiento cromatográfico primario de la fracción de cloroformo.	31
Tabla 2.	Fraccionamiento cromatográfico secundario de la fracción de cloroformo.	32
Tabla 3.	Compuestos identificados en el aceite esencial de la raíz de <i>I. heterophylla</i> .	48
Tabla 4.	Compuestos volátiles identificados en la raíz de <i>I. heterophylla</i> por microextracción en fase sólida.	50
Tabla 5.	Datos espectroscópicos de RMN para el xantorrizol en CDCl ₃ .	55
Tabla 6.	Resultados de los ensayos realizados a los extractos de metanol de los diferentes lotes de <i>Iostephane heterophylla</i> , <i>I. madrensis</i> , <i>Curcuma xanthorrhiza</i> , xantorrizol	57
Tabla 7.	Datos de <i>m/z</i> del xantorrizol en los espectros de masas.	60
Tabla 8.	Datos espectroscópicos de RMN para el xantorrizol en CDCl ₃ con 0.01% de TSP (¹ H a 700 MHz).	61

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
μg	Microgramo
μL	Microlitro
AcOEt	Acetato de etilo
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa delgada
CD_3OD	Metanol deuterado
CH_3OH	Metanol
CDCl_3	Cloroformo deuterado
CDCl_3	Metanol
RMN^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
CV	Coeficiente de variación
δ	Desplazamiento químico
DMEM	Medio MEM modificado por Dulbeco
DSA-HR-APCI-MS	Análisis directo de muestra-Alta resolución-Ionización química a presión atmosférica-espectrometría de masas
EM (MS)	Espectrometría de masas
EtOH	Etanol
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
g	Gramo
GeSi	Gel de sílice
HCl	Ácido clorhídrico
Hex	Hexano
H_2O	Agua
RMN^1H	Resonancia Magnética Nuclear protónica
J	Constante de acoplamiento
λ	Longitud de onda
MeOH	Metanol
MHz	MegaHertz
min	Minuto
mL	Mililitro

mg	Miligramo
m/z	Relación masa/carga
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
R _f	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
S (SD ó DS)	Desviación estándar
SFB	Suero fetal bobino
USAII	Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación y a la Industria
z	Carga

RESUMEN

La raíz de *Iostephane heterophylla* (escorcionera) ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana en forma de preparados herbolarios con fines terapéuticos y de manera muy importante, relativos a la cicatrización. Aunque actualmente es una de las drogas que integran la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM), existe una propuesta para la actualización de las monografías de plantas existentes en la mencionada Farmacopea. Con base en lo anterior, en el presente trabajo se desarrollaron pruebas de eficacia terapéutica adicionales a las ya reportadas para esta planta que cubren los usos más representativos de esta droga; este estudio se realizó empleando extractos orgánicos obtenidos por fraccionamiento por reparto de la decocción, en un modelo *in vitro* de cicatrización con fibroblastos gingivales. Además como pruebas de composición se utilizó microextracción en fase sólida de la raíz, el análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) del aceite esencial y la determinación de fenoles totales a partir de extractos de metanol. Dentro de pruebas de identidad adicionales a las ya publicadas, el xantorizol (**1**) fue aislado y seleccionado como compuesto marcador, y éste se identificó en extractos de metanol de 12 diferentes lotes de *I. heterophylla* por cromatografía en capa fina, por análisis directo de muestra a alta resolución por ionización química a presión atmosférica acoplado a espectrometría de masas (DSA-HR-APCI-MS) y por resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H). Los resultados obtenidos constituyen material adicional para incluirse en una nueva versión de la monografía de la droga estudiada y apoyan la actividad conferida como cicatrizante dentro de la medicina tradicional.

ABSTRACT

The root of *Iostephane heterophylla* (escorcionera) has been widely used in Mexican traditional medicine in diverse herbal preparations for wound healing purposes, among others. Although this herbal medicine is included in the Herbolary Pharmacopeia of the Mexican United States (Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, FHEUM), there is a proposal to update the information of several monographs included in the FHEUM. In this work, new therapeutical efficacy assays were developed directed to the main medicinal use of the drug. This study was carried out using fractionated organic extracts by decoction distribution, in an *in vitro* healing model with gingival fibroblasts. In addition this work reports composition tests such as solid phase microextraction of roots, the analysis of volatile compounds in the essential oil by GC-MS and determination of total phenols in methanol extracts. In identity tests, xanthorrhizol (**1**) was isolated and selected as a marker compound. It was identified in twelve methanol extracts by thin layer chromatography, direct sample analysis-high resolution in atmospheric pressure chemical ionization coupled to mass spectrometry (DSA-HR-APCI-MS) and by hydrogen nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$). The results provide additional information worth to be included in a new version of the monograph of the studied drug and support the proposed activity given its traditional use as wound healer.

1. ANTECEDENTES

1.1 Familia botánica Asteraceae

Las asteráceas (Asteraceae), también son llamadas compuestas; son plantas que reúnen a nivel mundial entre 24 000 y 30 000 especies, repartidas en unos 1600 géneros, por lo que son la familia de Angiospermas con mayor riqueza y diversidad biológica al ser su distribución cosmopolita (Funk *et al.*, 2009; Jeffrey., 2007).

La familia se caracteriza por presentar las flores dispuestas en una inflorescencia compuesta denominada capítulo, la cual se halla rodeada de una o más filas de brácteas, sus flores por lo general son pentámeras (García-Sánchez *et al.*, 2014).

1.2 Características del género *Iostephane*

Iostephane es un género perteneciente a la familia Asteraceae, el cual fue descrito por George Brentham. (Global Compositae Checklist, 2018) y comprende cuatro especies aceptadas las cuales son:

- *Iostephane heterophylla* (Cav.) Benth.
- *Iostephane madrensis* (S. Watson) Strother
- *Iostephane papposa* J.J. Fay.
- *Iostephane trilobata* Hemsl.

1.3 Características de la especie *Iostephane heterophylla*

1.3.1 Distribución y hábitat

I. heterophylla es una especie originaria de México (Argueta, 1994), habita en climas semisecos y templados, asociado a matorrales, xerófilo, bosque de pino y encino. De hábito terrestre, crece a una altitud de 1500 a 3000 msnm. La planta se distribuye en varios estados de la República como se muestra en la Figura 1.

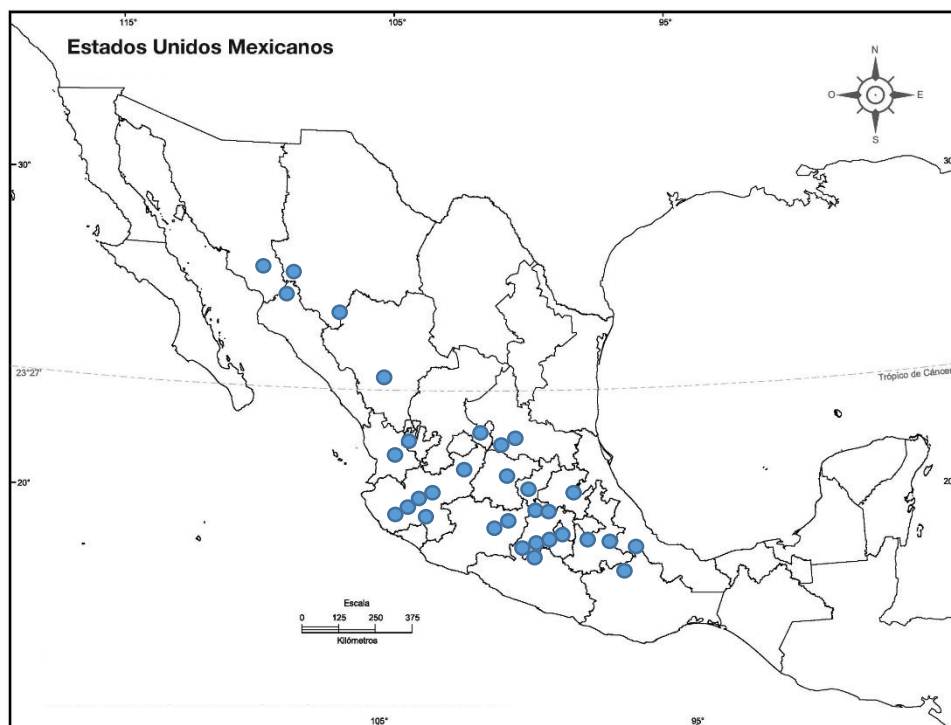


Figura 1. Distribución geográfica de *I. heterophylla* (Zarco, K.)

1.3.2 Composición química

Las raíces de *I. heterophylla* contienen compuestos del tipo de sesquiterpenos, monoterpenos así como cromenos, cumarinas, glucósidos de esteroides, glucósidos de sesquiterpenoides, entre otros. Algunos de los compuestos que han sido aislados se muestran en las Figuras 2,3 y 4.

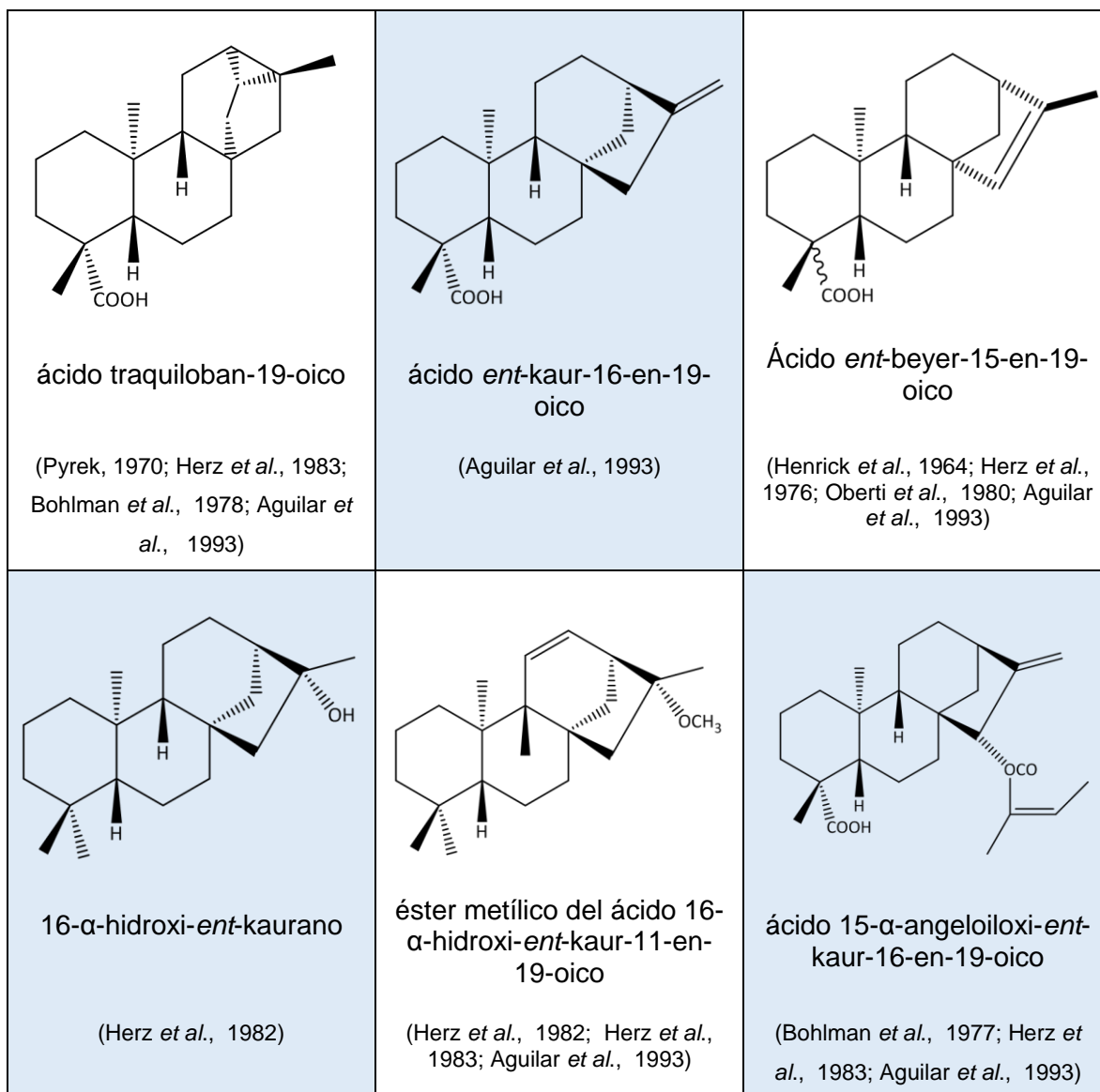


Figura 2. Diterpenos aislados de *I. heterophylla*.

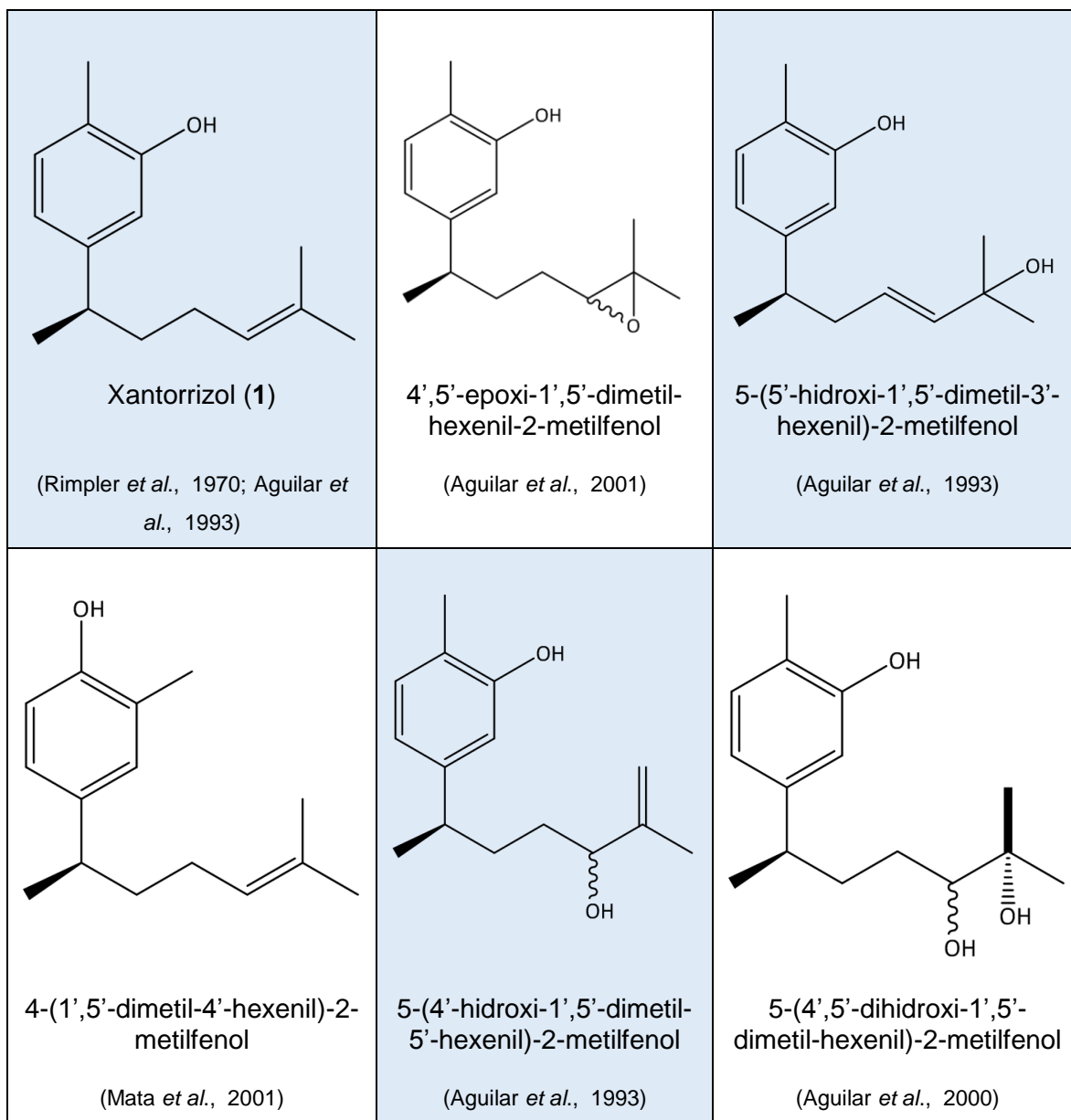


Figura 3. Sesquiterpenos aislados de *I. heterophylla*.

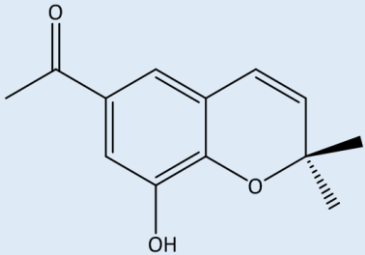
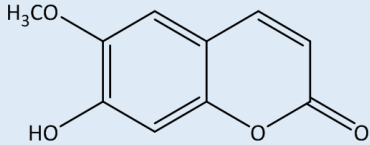
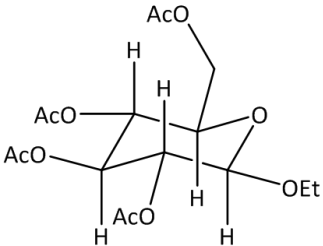
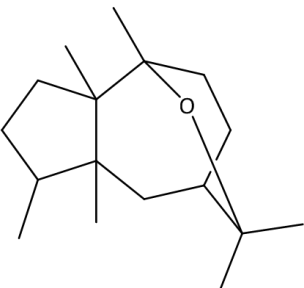
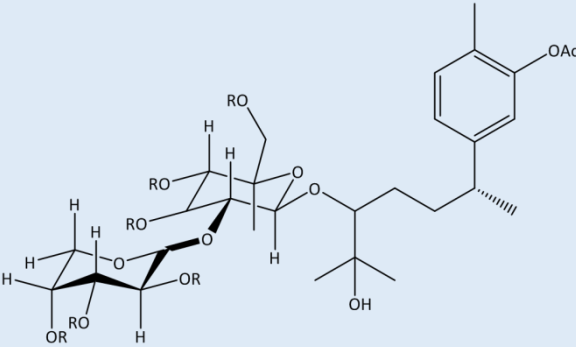
 <p>8-hidroxi-6-acetil-2,2-dimetil-cromeno (Bohlman <i>et al.</i>, 1978; Aguilar <i>et al.</i>, 1993)</p>	 <p>escopoletina (Dean <i>et al.</i>, 1969; Shafizadeh <i>et al.</i>, 1970; Ballantyne <i>et al.</i>, 1971; Aguilar <i>et al.</i>, 1993)</p>
 <p>1-O-etil-2,3,4,6-tetra-O-acetal-β-D-glucopiranososa (Aguilar <i>et al.</i>, 1995)</p>	 <p>kessano (Bernal <i>et al.</i>, 2007)</p>
 <p>peracetil-1'-O-12-O-(12<i>R</i>)-12,13-dihidroxi-xantorrizol-β-L-arabinopiranosil-(1-2)-β-D-glucopiranosío (R=Ac) (Aguilar <i>et al.</i>, 1995)</p>	

Figura 4. Otros constituyentes aislados de *I. heterophylla*.

1.3.3 Clasificación taxonómica

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Iostephane</i>
Especie	<i>Iostephane heterophylla</i> (Cav) Benth.

1.3.4 Descripción botánica

Iostephane heterophylla (Figura 5), es una planta subscapiforme, perenne, robusta, vellosa, pilosa; parte de una base tuberosa con raíz central gruesa (ubicada a bastante profundidad), crece a más de 45 cm de longitud y hasta 8 cm de ancho (cubierta por crestas corrugadas longitudinales). La raíz da lugar a un tallo erecto leñoso de 2 a 7 cm de largo, desde donde crece la roseta basal de las hojas. Su tallo es erecto, hasta de 1 m de alto, con pocas hojas. Las hojas basales son lobuladas, las hojas principales concentradas cerca de la base pecioliforme son anchas y alternas, que miden hasta 40 cm de largo, hasta 15 cm de ancho, márgenes crenados e irregularmente dentados, hirsutas y con pubescencia en el haz, pecíolos ligeramente alados, y mucho más pálidas en el envés, las hojas superiores sésiles.

Sus flores son moradas en cabezuelas sostenidas por un tallo central. Por lo general en la parte superior del tallo sobre pedúnculos hasta de 35 cm de largo tiene unas cabezuelas solitarias, heterógamas y abultadas en la fructificación (aunque se pueden encontrar hasta cinco cabezas adicionales en algunas hierbas), en el extremo del tallo en forma de un escapo, cada una de 4-5 cm de diámetro, con las lígulas numerosas, moradas o morado-blanquecinas.

Sus brácteas 16-22 oblongas a lanceoladas, de 10 a 28 mm de largo, agudas o acuminadas, hirsutas en el envés; receptáculo convexo, paleas oblongas, de más o menos 1 cm de largo, solitarias o reunidas en corto número.



(a)



(b)

Figura 5. (a) Partes aéreas de *I. heterophylla* (Cav.) Benth.

(b) Droga cruda.

1.3.5 Nombres comunes

El nombre dado a la planta por Francisco Hernández es Tacopatli Quautotollanensi (Hernández, 1959) y Alzate lo refiere como Tlalpopotl (Villada, 1888). La planta es comúnmente conocida en su zona con los nombres comunes raíz de manzo, raíz de manso (México, Puebla), raíz del Indio (SLP), hierba del manzo, Zacapal, Tecpachtli (náhuatl, Morelos), Bauji (Nayarit: tepehuano), Corsonera (Yecora y el Campanero, Sonora: pima), Escorcionera (Sonora: guarijíos), Ezcorzonera (Chihuahua), Liga o raíz de liga (México), Hierba de oso, Tlacopatli (Jalisco), Tlapopote (Michoacan) (Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana).

1.3.6 Usos

La droga vegetal consiste de la raíz seca de *Iostephane heterophylla*, Figura 5 (b). Usualmente se utiliza en decocción.

Normalmente la raíz se colecta de las poblaciones silvestres durante la estación seca después de que las hojas y los escapes se hayan marchitado y antes del rebrote, principalmente durante los meses de agosto a octubre.

Esta especie (reportada con el nombre Náhuatl "chipaoacític" o "hierba contraria a los venenos") ha sido identificada en el periodo Colonial mexicano como un tratamiento efectivo para las heridas, mordeduras de animales y dolores (Valdés y Flores, 1985).

Los usos que popularmente se le dan *I. heterophylla* incluyen los siguientes: como cicatrizante, en el tratamiento de heridas, llagas, úlceras externas y otras afecciones de la piel como granos, infecciones y picaduras ponzoñosas, el cataplasma de la raíz fresca es usado como tópico mientras que la raíz en polvo o la raíz quemada son esparcidas sobre el área afectada y vendada. Las mordeduras de animales venenosos se tratan con el cataplasma o decocciones de las raíces. La decocción se bebe diariamente para tratar la diabetes, afecciones pulmonares, dolencias hepáticas y afecciones gastrointestinales que incluyen diarreas, disenterías; como purgante y catártico. De manera tópica se aplica el cataplasma para dolores diversos por golpes, dolor por cansancio, dolores artríticos y reumáticos. Otro uso es para "afirmar las articulaciones", en problemas osteoarticulares: "falseaciones" o "dislocaduras de huesos" y fracturas. También se recomienda como baños post-parto en el "temascal".

1.4 Antecedentes farmacológicos

Se han evaluado extractos y algunos de los constituyentes químicos de *I. heterophylla*, demostrando actividades antifúngicas moderadas contra *Trychophyton mentagropytes* y *Microsporum gypseum* (Aguilar et al., 2001). Se han identificado como los principales componentes antimicrobianos de un extracto de *I. heterophylla* al xantorizol (**1**) y al 4-(1',5'-dimetilhex-4'-enil)-2-metilfenol. Ambos

presentaron un bajo nivel de actividad contra estafilococos resistentes a meticilina y contra enterococos resistentes a vancomicina. Fueron además inactivos o pobremente activos contra bacterias Gram negativas y levaduras. El xantorrizol obtenido de *I. heterophylla* no brindó protección a ratones infectados con estafilococo dorado (Mata *et al.*, 2001).

Una revisión hecha por Oon en 2015 sobre el xantorrizol, informa diferentes actividades biológicas comprobadas científicamente como antimicrobiano, anti-inflamatorio, antioxidante, antihiperlipidémico, antihipertensivo, antiplaquetario, nefroprotectivo y hepatoprotectivo, estrogénico y antiestrogénico.

También se reporta que el xantorrizol y sus derivados son productos naturales antibacterianos estables al calor y de amplio espectro.

Por otra parte, existen reportes sobre el xantorrizol con actividad antitumoral en ratones contra el Sarcoma 180 en ascitis (Itokawa *et al.*, 1985).

Existe una patente registrada en 2004 (US Patent 6696404) asignada a la empresa “LG Household & Healthcare” en los Estados Unidos, en torno a la obtención de extractos de la raíz cúrcuma de Java (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb., *zingiberaceae*), para la elaboración de una mezcla antibacteriana que contiene xantorrizol del cual se describe una serie de aplicaciones antimicrobianas, destacando su alta termoestabilidad. La patente menciona como una fuente alterna de xantorrizol a *I. heterophylla*.

Un estudio realizado por Ponce-Monter y colaboradores en 2000 demostró el efecto relajante de músculo liso y de tejido de aorta precontraído por parte de un extracto clorofórmico de *I. heterophylla*. El principal compuesto activo responsable de esta actividad fue el xantorrizol.

Otros ensayos biológicos

El extracto clorofórmico de *I. heterophylla* y algunos de sus constituyentes como el xantorrizol, el ácido traquilobanoico y el derivado semisintético éster metílico del ácido traquilobanoico, mostraron actividad potencial herbicida mediante su interacción con el transporte de electrones fotosintético, así como por la inhibición del fotosistema II e interferencia con el CF₀ de la H⁺-ATPasa de cloroplastos de

espinacas (González-Bernardo *et al.*, 2003; Hernández-Terrones *et al.*, 2003; Hernández-Terrones *et al.*, 2003)

Toxicidad aguda

La evaluación de la toxicidad aguda por vía oral de un extracto metanólico de *I. heterophylla* en ratones mostró ausencia de efectos tóxicos visibles y anomalías en el análisis microscópico de órganos y tejido (Déciga-Campos *et al.*, 2007).

1.5 Control de calidad de *I. heterophylla*

En el año 2009 fue editada la monografía de *Iostephane heterophylla* con el nombre popular de “Raíz del manso”, que es el nombre popular para la planta medicinal por algunas comunidades de México, Puebla y el estado de Morelos (Aguilar *et al.*, 2009). Estas monografías tipo OMS documentan una serie de aspectos de la planta medicinal tales como usos medicinales populares, datos históricos, el hábitat de la planta, distribución geográfica, fuentes comerciales, manejo, colecta, fenología y las preparaciones más comunes. Por otra parte, se reportan los requisitos mínimos para el control de seguridad como es la prueba de toxicidad aguda, pruebas de eficacia preclínica tales como actividades antimicrobianas y efecto sobre músculo liso y por otra parte, se describen pruebas para asegurar la calidad de la droga. Éstas incluyen pruebas de identidad (histoquímicas e histológicas, análisis por cromatografía en capa fina, cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas para la identificación de la mayoría de componentes principales de la raíz) y por último, como prueba de composición se desarrolló y validó un método por HPLC para la cuantificación de xantorizol en la droga. En el mismo documento se asentaron datos de pruebas de pureza tales como límites microbiano, de metales pesados, de material orgánico extraño, de cenizas totales, de cenizas insolubles en ácido, de pérdida de humedad al secado y de material extraíble, Posteriormente, bajo el nombre popular de escorcionera,

esta droga fue incluida dentro de las monografías de tipo farmacopeico que conforman la edición 2013 de la FHEUM 2013.

La importancia de establecer los criterios de calidad en las plantas medicinales radica en que son de principal elección para procurar el alivio de diversas enfermedades en países desarrollados pero sobre todo en aquellos en vías de desarrollo; así, mediante un adecuado control de calidad de las plantas medicinales se garantiza su seguridad y eficacia.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en 1988 el documento “Quality Control Methods for Medical Plant Materials”, el cual ha tenido varias actualizaciones, y en él se establecen las recomendaciones y procedimientos para el aseguramiento de la calidad (OMS, 2011). La evaluación de la calidad abarca parámetros de identidad, pureza y composición de drogas crudas y preparados herbolarios.

Pruebas de identidad

Las pruebas de identidad de las drogas crudas permiten su identificación a través de pruebas botánicas, químicas y genéticas. Cuando estos parámetros se desconocen es necesario establecerlos para garantizar la eficacia y seguridad de las drogas.

Las pruebas de identidad botánica consisten en la identificación mediante el uso de la definición botánica, sus características microscópicas y macroscópicas, auxiliándose de materiales de referencia (Bandaranayake, 2006). Las pruebas de identidad química están dirigidas a la detección de compuestos marcadores, que son constituyentes químicamente definidos de las plantas, útiles para fines analíticos, independientemente de presentar o no actividad farmacológica (Li, *et al.*, 2008). Mediante estas pruebas, se pueden detectar perfiles cromatográficos (CG, CLAE, CLUE).o espectroscópicos (UV, IR, RMN) de los extractos (huellas digitales).

Las pruebas de identidad genética consisten en el análisis de los marcadores moleculares, los cuales son únicos, estables y específicos para cada especie, y no

están influenciados por la edad, las condiciones fisiológicas y los factores ambientales.

Pruebas de pureza

Las pruebas de pureza permiten garantizar que las drogas crudas estén libres de contaminantes: microorganismos, radioactividad, metales pesados, residuos de plaguicidas, insectos, piedras y todo aquello que no pertenezca a la materia prima. Generalmente, estas pruebas son de carácter general, por lo que se realizan de acuerdo a procedimientos establecidos en las farmacopeas y directrices de la OMS.

Pruebas de composición

Las pruebas de composición (también llamadas de valoración) consisten en la cuantificación de los principios activos (compuestos responsables de las propiedades terapéuticas de las drogas), si éstos son conocidos, o de los marcadores en las drogas crudas o preparados herbolarios con la finalidad de garantizar la obtención de extractos estandarizados y cuantificados.

I. heterophylla tiene como componente mayoritario al xantorizol que es de naturaleza fenólica, además se ha demostrado que éste es el responsable de la actividad antimicótica y de la inhibición de la contracción tónica uterina en rata, que presenta esta especie (Aguilar *et al.*, 1993; Aguilar *et al.*, 2001), por lo que se ha empleado como sustancia marcadora de calidad. De hecho, un estudio de valoración previo realizado con colectas de diferentes sitios mostró un alto contenido de xantorizol en la raíz (Aguilar *et al.*, 2007).

1.6 Cicatrización de heridas

Una herida es definida como la región anatómica donde queda interrumpida la continuidad normal de las estructuras celulares o tisulares (Dorland, 2005). En la actualidad, las heridas ocupan un lugar importante en cuando a las demandas de atención en un servicio de urgencias. Si bien la mayoría de heridas cicatrizan por sí solas, su reparación y tratamiento oportuno reduce infecciones, diversas

molestias y secuelas. Las principales complicaciones de una herida son: infección, pérdida de sensibilidad, o pérdida de extremidades, además algunos problemas estéticos y funcionales de una herida no cicatrizada correctamente como cicatrices queloides, hipertróficas y atróficas (Arenas, 2015).

La cicatrización es el resultado de la regeneración de los tejidos y del cierre de una herida, su evolución está condicionada por una serie de factores bioquímicos a nivel de la solución de continuidad que representa la lesión, por unos cambios en las estructuras tisulares y por una serie de procesos que determinan la formación de la cicatriz (Romo, 2005). Independientemente de la causa de la herida se inicia un proceso cuyo fin es restablecer la integridad de los tejidos afectados. En este proceso se distinguen varias etapas:

1.6.1 Fase inflamatoria

Dura aproximadamente de 3 a 5 días y comienza inmediatamente después de que el tejido sea lesionado. Se diferencian dos etapas: La vascular que comienza con una vasoconstricción para evitar la pérdida excesiva de sangre promoviendo así la coagulación de la zona dañada. Seguidamente comienza una fase de vasodilatación que permitirá la formación de espacios entre las células endoteliales lo que dará lugar a un aumento de permeabilidad y migración del plasma y linfocitos a la zona, con lo que diluirán los contaminantes y formarán un edema.

La otra fase de la inflamación es la celular, en la que los leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos) ayudados por los macrófagos se encargarán de destruir las bacterias y otros materiales extraños y destruirán el tejido necrótico.

1.6.2 Fase proliferativa

Esta fase se por la formación de tejido para cubrir la herida y la restauración de la red vascular. La base de la nueva matriz de tejido conectivo es guiada bajo el control de citoquinas reguladoras como IFN- γ , TGF- β , EGF, KGF, IGF-1, NGF y el

PDGF que sirven para la migración y proliferación de fibroblastos. (Reinke *et al.*, 2012).

Es caracterizada por angiogénesis, depósito de colágeno, formación de tejido de granulación, epitelización y contracción de la herida. En la angiogénesis, nuevos vasos sanguíneos crecen a partir de las células endoteliales. En la formación de tejido de granulación y fibroplasia, los fibroblastos crecen y forman una nueva matriz extracelular por excretar colágeno y fibronectina, la cual es provisional (Kuwahara *et al.*, 2007).

Alrededor de dos o tres días después de que se presenta la herida, los fibroblastos empiezan a ingresar a la herida, incluso antes de que la fase inflamatoria haya terminado completamente.

En esta fase los fibroblastos comienzan a depositar tropocolágeno, precursor del colágeno, así como otras sustancias comenzando la reparación de la herida. Inicialmente el colágeno es producido en exceso y se va depositando de manera desorganizada, esto es necesario para darle cierta resistencia a la herida. Debido a esta falta de organización en la disposición de las fibras colágenas de la herida no es capaz de soportar tensiones durante esta fase que dura de 2 a 3 semanas. Si la herida es sometida a tensión al final de esta etapa provocará la unión entre las fibras nuevas y viejas de colágeno produciéndose la herida dura eritematosa por el alto grado de vascularización. En este periodo se alcanza del 70% al 80% de resistencia respecto al tejido anterior a la lesión.

Angiogénesis

También llamada neovascularización. Ocurre al tiempo que los fibroblastos proliferan; las células endoteliales migran a la herida (Kuwahara *et al.*, 2007). Ya que la actividad de los fibroblastos y de las células epiteliales requiere oxígeno, la angiogénesis es imperativa para la cicatrización.

Fibroplasia y formación de tejido de granulación

Simultáneamente con el tejido de granulación, los fibroblastos se acumulan en la herida; esto sucede de 2 a 5 días luego de la herida y cuando la fase inflamatoria está finalizando y alcanza su mayor población una a dos semanas después de la herida. Al final de la primera semana, los fibroblastos son las células más comunes en la herida (Stadelmann *et al*, 1998); la fibroplasia termina 2-4 semanas después de la herida.

Los fibroblastos depositan moléculas de la matriz extracelular como glicoproteínas, glicosaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos, elastina y fibronectina que usan luego para migrar a través de la herida. Los factores de crecimiento y la fibronectina estimulan la proliferación, la migración al lecho de la herida y la producción de moléculas extracelulares por los fibroblastos.

Depósito de colágeno

Una de las tareas más importantes de los fibroblastos es la producción de colágeno (Kuwahara *et al.*, 2007). Esta producción es notable en el segundo y tercer día post herida, y es máxima en una a tres semanas. La producción de colágeno continúa por dos a cuatro semanas y luego de este tiempo, su destrucción se incrementa cesando así su crecimiento (Greenhalgh, 1998).

El colágeno incrementa la fuerza de la herida. Antes del depósito de colágeno, lo que sostiene la herida cerrada es el coágulo de fibrina-fibronectina que no da mucha resistencia al traumatismo.

Epitelización

En la epitelización las células epiteliales avanzan lentamente a través del lecho de la herida para cubrirla.

1.6.3 Fase de remodelación

En esta fase muchas de las fibras que se colocaron de manera desordenada en la fase anterior desaparecen y son sustituidas por fibras colágenas nuevas que

se orientan de manera correcta para soportar las tensiones en el área de la herida. Durante este periodo disminuye la vascularidad y por tanto el enrojecimiento.

1.7 Fibroblastos y su participación en la reparación de heridas

Los fibroblastos son un elemento celular muy activo e importante, ya que pueden migrar, adherirse, proliferar y diferenciarse a miofibroblastos durante la cicatrización (Gabbianni, 2003). Además poseen una amplia variedad de receptores, secretan diversos factores de crecimiento y citosinas, los que pueden actuar en forma autocrina y/o parácrina y finalmente son blanco para una amplia variedad de estímulos tanto mecánicos como neuroendocrinos. En condiciones normales, la principal función de los fibroblastos es producir proteínas de la matriz extracelular (MEC), que participan en el proceso de cicatrización (Booz y Baker, 1995).

1.8 Tratamiento

El tratamiento de las heridas es mucho más eficaz cuando se tratan correctamente con lo que se acelera su cicatrización y se disminuye la probabilidad de aparición de complicaciones y molestias. El entendimiento de las fases de reparación de heridas, permite comprender el impacto benéfico de remedios herbolarios y de otros medicamentos.

1.9 Fitoterapia para heridas y cicatrización

La fitoterapia es usada ampliamente entre la población mundial para procurar la salud o prevenir enfermedades, por su bajo costo, fácil acceso y su origen natural.

El tratamiento fitoterapéutico de las heridas y quemaduras implica el uso de plantas cicatrizantes, antisépticas y antiinflamatorias.

Para pequeñas heridas se utilizan plantas de carácter antiséptico como *Thymus vulgaris*, *Lavandula* sp. y *Melaleuca alternifolia*.

Heridas con necesidad de cicatrización, también se tratan con especies antisépticas y es importante seguir el tratamiento con una especie que posea como característica fundamental la cicatrización/repitelización (Castillo, 2016). Dentro de las plantas más empleadas a nivel global para la cicatrización se encuentran las siguientes:

- ***Centella asiática* L.** Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los preparados de centella están indicados por vía tópica como cicatrizante, para acelerar la curación de heridas postraumáticas y posquirúrgicas. Los principios activos son las saponinas triterpénicas pentacíclicas, entre las cuales destacan el asiaticósido (provoca la síntesis de colágeno tipo I en seres humanos y promueve la proliferación de fibroblastos) y el madecasósido.
- ***Aloe vera* L.** El gel de áloe o tejido mucilaginoso del parénquima de la hoja ha adquirido en los últimos años una gran popularidad como remedio para la curación de heridas y quemaduras por sus propiedades cicatrizantes y antiinflamatorias. Se utiliza por vía tópica, y se aplica sobre la herida directamente. Se ha aislado una fracción glucoproteica que probada en cultivos celulares, ha demostrado que estimula la formación del tejido epidérmico necesario para la cicatrización (aumentando la biosíntesis de colágeno, así como su degradación).
- ***Calendula officinalis* L.** La droga son los capítulos florales, ricos en glicósidos triterpénicos, agliconas y aceites esenciales. Es una especie completa para el tratamiento de las heridas puesto que a sus propiedades cicatrizantes se suman las antisépticas y antiinflamatorias. Estudios clínicos llevados a cabo tanto con extractos alcohólicos, secos y acuosos, han mostrado actividad epitelizante de la caléndula combinada con alantoína (incrementa el metabolismo de las glucoproteínas, las nucleoproteínas y el colágeno).
- ***Rosa rubiginosa* L.** El aceite de la rosa mosqueta es una solución rica en ácido linoleico (41%) y linolénico (39%) con efectos benéficos para la cicatrización.

- ***Echinacea purpurea* Moench.** Es de gran utilidad para el tratamiento de heridas superficiales y úlceras crónicas. Estudios *in vivo* demuestran que la aplicación diaria de pomadas, con jugo obtenido de la droga, al 15%, reduce significativamente el área afectada de la herida.
- ***Hypericum perforatum* L.** Se ha usado de forma tópica el aceite de hipérico como cicatrizante y antiséptico para tratar heridas, quemaduras y contusiones. Se reconoce la capacidad de éste para estimular la epitelización. Su poder antiséptico, necesario para evitar la infección de las heridas y que es atribuible a un componente abundante: la hiperforina.
- ***Melaleuca alternifolia* Maident & Betche ex Cheel (Myrtaceae).** Comúnmente conocido como el árbol de té, contiene un aceite esencial al que se le atribuye propiedades como antiséptico y cicatrizante en general y en cuya composición tiene alcoholes mono y sesquiterpenicos derivados del terpineno (Carson *et al.*, 1994).
- ***Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret (Leguminosae).** Comúnmente llamada tepzcohuite se utiliza por sus propiedades regenerativas de la piel, particularmente para curar las quemaduras con la decocción de la corteza del tronco. En esta planta se han identificado triterpenos saponinicos, esteroides, glucósidos de campesterol y estigmasterol y alcaloides indólicos derivados de la 5-hidroxi-triptamina y N,N-dimetil-triptamina. (Argueta, 1994). El extracto acuoso de *M. tenuiflora* a 10 g/mL estimuló la proliferación de fibroblastos (Zippel *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICACIÓN

La implementación de metodologías apropiadas para el control de calidad de materias primas vegetales medicinales es de primordial necesidad para poder utilizar esos recursos medicinales de manera racional, segura y efectiva. En el caso particular de *Isoetes macrospora heterophylla* (escorcionera), a pesar de que ya existen métodos desarrollados que cumplen con las recomendaciones de la OMS para su control de calidad, dada su demanda por los usuarios consumidores de la planta, justifica la actualización de técnicas analíticas que permitan asegurar su identidad, valoración y eficacia *in vitro*. A pesar de que se ha comprobado la actividad citotóxica del xantorizol como un componente mayoritario de la escorcionera, estudios preliminares de la decocción sobre líneas de cáncer mostraron capacidad de proliferación en todos los casos (datos no presentados). Como se mencionó en el apartado 1.5 en el año 2009 fue editada la monografía *I. heterophylla* con el nombre popular “Raíz del manso” por Aguilar y colaboradores en la cual se documenta una serie de aspectos de la planta tales como usos tradicionales que incluyen tratamiento de heridas como cicatrizante, para llagas y úlceras externas y otras afecciones de la piel. Por esta razón uno de los enfoques del presente trabajo está dirigido a analizar el potencial de los extractos acuosos para promover la cicatrización. Adicionalmente, es pertinente el desarrollo de ensayos importantes que merecen ser añadidos a la monografía ya existente en la FHEUM (2013) tales como contenidos de fenoles totales, contenidos de compuestos volátiles en el aceite esencial y otros detectados por el método de microextracción en fase sólida directamente en la raíz. También es importante describir la correlación de alguna de las actividades biológicas de la droga con algunos de sus contenidos metabólicos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Desarrollar pruebas para comprobar la eficacia *in vitro*, así como establecer pruebas adicionales de identidad química y composición de la droga cruda de *I. heterophylla* con el fin de actualizar la monografía correspondiente dentro de la tercera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.

3.2 Objetivos particulares

- Evaluar la confluencia de fibroblastos gingivales en un ensayo de “herida” *in vitro* con los extractos acuoso y por los obtenidos por reparto de éste.
- Analizar los componentes volátiles del aceite esencial de la raíz de *I. heterophylla* que se extraigan mediante el proceso de hidrodestilación y comparar la composición con la de los compuestos volátiles que se obtengan por la técnica de microextracción en fase sólida (HS-SPME-EM-TOF).
- Aislar e identificar al xantorizol a partir de un extracto de cloroformo por métodos cromatográficos, espectroscópicos y espectrométricos.
- Obtener extractos de metanol de varios lotes de *I. heterophylla*, para realizar las siguientes pruebas de identidad: CCF, DSA-HR-APCI-MS y RMN ¹H, empleando al xantorizol como compuesto marcador.
- Determinar, como prueba de composición, el contenido de fenoles totales en el extracto de metanol de diferentes colectas de *I. heterophylla*, así como la CMI empleando al microorganismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Material y equipo utilizado

Para las cromatografías en capa fina se utilizaron placas cromatográficas TLC Silica gel 60 F₂₅₄ Merck. Como revelador se usó solución de sulfato cérico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ al 1% con H_2SO_4 2N y los compuestos se visualizaron a las longitudes de onda 254 y 365 nm empleando una lámpara de luz UV UVLMS-38 EL Series 3UV Lamp UVP.

Para el fraccionamiento de los extractos se utilizaron columnas de vidrio abiertas y como fase estacionaria, gel de sílice 60 (malla 0.063-0.200 nm) Merck.

Los espectros de RMN de ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz), en un espectrómetro de alta resolución Varian Unity Inova, utilizando como disolventes CDCl_3 , CD_3OD y como referencia interna TMS.

Para la microextracción en fase sólida se utilizó una fibra con las siguientes características: 2 cm-50/30 μm DVB/Carboxen/PDMS Stable flex, marca Supelco. Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro marca Thermo-Electron, modelo DFS (Double Focus Sector), acoplado a CG-EM y de ionización por impacto electrónico.

4.2 Adquisición e identificación del material vegetal

La raíz de *I. heterophylla* seca fue comprada en el Mercado de Sonora, CDMX, en agosto de 2016 (IH-2-17) y comparada con una muestra de herbario (R. Bye and E. Linares 17986) en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.3 Obtención del extracto acuoso y fracción de cloroformo

El extracto acuoso se obtuvo por decocción de la materia prima, seca y molida (300 g en 2 L de agua, 5 min), se filtró con algodón desgrasado y el extracto

acuoso resultante se evaporó a vacío y se guardó en refrigeración, se obtuvieron 72 g de extracto acuoso.

El material vegetal que se utilizó para obtener la decocción, se extrajo con cloroformo por maceración con cloroformo. Se filtró y concentró a presión reducida resultando 9.4 g de extracto de cloroformo. La Figura 6 resume el esquema de extracción de la raíz de *I. heterophylla*.

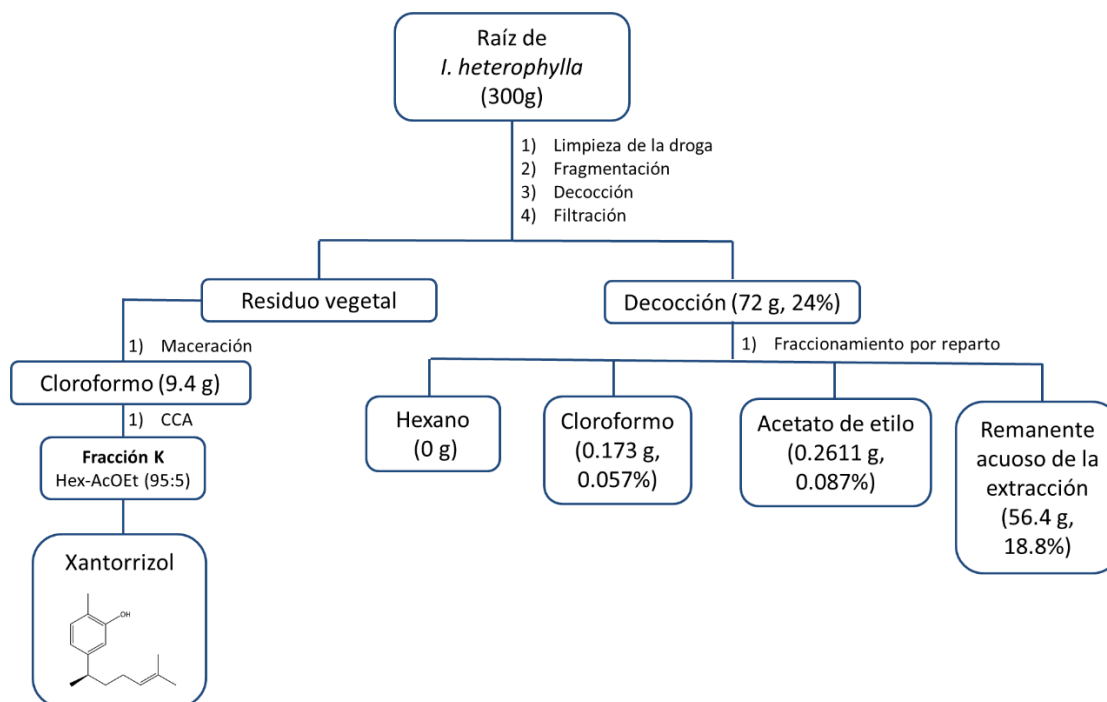


Figura 6. Esquema de extracción de *I. heterophylla*.

4.4 Obtención de extractos orgánicos por proceso de fraccionamiento por reparto

Los extractos orgánicos se obtuvieron por un proceso de fraccionamiento por reparto de la decocción (D) con disolventes de distinta polaridad. Para esto, el extracto semiseco se disolvió en 150 mL de agua y se extrajo exhaustiva y consecutivamente con hexano (H), cloroformo (Cl) y acetato de etilo (AcOEt). Cada

una de las fracciones obtenidas se filtró y concentró a presión reducida. Obteniéndose 0 g, 0.173 g y 0.2611 g respectivamente además de un remanente acuoso de la extracción (56.4 g), como se puede observar en la Figura 6.

4.5 PRUEBA DE EFICACIA

4.5.1 Preparación de las muestras para el ensayo biológico

Se pesó 1 mg de cada muestra en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se disolvió en 500 μ L de agua. Cada solución se esterilizó por filtración (con filtros de jeringa, Acrodisc® con un diámetro de poro de 0.22 micras) para el ensayo. Las soluciones que se evaluaron fueron la decocción (D), la fracción de cloroformo (Cl), acetato de etilo (AcOEt) y el remanente acuoso de la extracción (R).

4.5.2 Evaluación de la confluencia de fibroblastos gingivales, simulando una “herida”

Todas las operaciones se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad, empleando una campana de flujo laminar clase II. Los fibroblastos gingivales se obtuvieron de tejido transquirúrgico por medio del método de explante. Una vez obtenido el tejido se lavó en amortiguador de fosfatos pH 7.3 en tres ocasiones. Posteriormente se tomaron fragmentos de encía de 2X2 mm, los cuales fueron sujetos a la acción enzimática de colagenasa tipo IV (2 mg/mL durante una hora a 37°C). Estos explantes se sembraron en cajas de 25 cm², en medio DMEM suplementado con piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales, antibióticos (penicilina 100 UL, estreptomina 100 μ g/mL) hasta que el crecimiento permitió establecer una línea celular.

Se utilizaron multiplacas de cultivo celular de 24 pozos. Previo al ensayo, en el fondo de cada pozo se adhirió una cinta adhesiva de 0.5 mm de ancho en forma ecuatorial; en éstos se sembraron los fibroblastos, en medio DMEM con SFB al 10%. Se incubaron a 37°C hasta que los fibroblastos llegaron a su confluencia.

Una vez que los fibroblastos formaron una monocapa visible en su observación con microscopio invertido, en la campana de flujo laminar se retiró el medio DMEM con una pipeta graduada de vidrio de 5 mL y también se retiró la cinta adherida al pozo para simular una “herida”. Se lavó el pozo conteniendo la monocapa con 1 mL de DMEM, para retirar los posibles fibroblastos desprendidos. Se realizó el mismo procedimiento en cada uno de los pozos.

Se agregó a cada pozo 2 mL de DMEM con SFB al 0.2%, y la cantidad de extracto necesaria para evaluar las concentraciones de 0, 1, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$, en la misma placa por duplicado. El experimento se evaluó midiendo el porcentaje de cierre de la “herida” a las diferentes concentraciones mencionadas y a diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72 horas), considerando el número de pozos necesarios para fijar dos pozos por tratamiento. Se preparó un control positivo con medio DMEM con SFB al 10% y un control negativo con SFB al 0.2%. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y 95% aire, humedad al 100%.

Una vez que se cumplió el tiempo de cada ensayo se retiró el medio del mismo modo que en párrafos anteriores y se fijaron los fibroblastos con alcohol etílico al 70%. Para teñir los fibroblastos, se agregaron a cada pozo 300 μL de cristal violeta al 0.1% durante una hora, al término de lo cual se lavaron las placas con agua corriente y se secaron a temperatura ambiente.

Se observó la migración de los fibroblastos en la “herida” con un estereomicroscopio acoplado a una AxioCam MRc5 y en éste se hicieron las mediciones del cierre con el Microscope Software ZEN 2 lite acoplado al microscopio Axiophot 2, (Carl Zeiss). Los datos fueron procesados con el software graphpad prism 6.

Cada tratamiento fue evaluado por duplicado; a cada pozo se le tomaron 3 impresiones fotográficas y a cada una de éstas se hicieron 3 mediciones, dando un total de 18 repeticiones de cada tratamiento.

4.6 PRUEBAS DE COMPOSICIÓN

4.6.1 Obtención del aceite esencial de *I. heterophylla*

50 g de material vegetal se sometieron al proceso de hidrodestilación descrito en la FHEUM (2013) (MGA-FH 0090) con 200 mL de agua destilada utilizando el aparato descrito en la FHEUM. La fracción oleosa obtenida se guardó a -20°C y posteriormente ésta se separó con pipeta Pasteur del hielo-agua (2.3 g). Una muestra se analizó mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas.

4.6.2 Determinación de compuestos volátiles por microextracción en fase sólida (HS-SPME-EM-TOF) de la raíz de *I. heterophylla*

4.6.2.1 Preparación de la muestra

En un vial con tapa de silicón se colocaron 5 mg de la raíz fragmentada (2 mm) de *I. heterophylla*, 10 mL de agua Milli Q y 100 mg de NaCl. Se agitó constantemente con un agitador magnético. Por otra parte, una vez que se estabilizó la fibra (especificada en 4.1) de la jeringa del equipo de SPME por exposición dentro del inyector y a las condiciones de temperatura del cromatógrafo de gases (apartado 4.6.2.2), se procedió a retirarla. Seguidamente se perforó la tapa del vial (silicón) con la jeringa, se presionó el émbolo y se expuso la fibra por 5 min, cuidando que ésta no tocara la solución en agitación contenida en el vial. Transcurrido este tiempo, se retrajo la fibra cuidadosamente con ayuda del émbolo, se sustrajo la aguja del equipo y acto seguido se introdujo ésta en el inyector del CG exponiendo la fibra con ayuda del émbolo para que el equipo detectara los compuestos adsorbidos a la misma.

4.6.2.2 Análisis por CG-EM

Se acondicionó el equipo con las siguientes condiciones:

- Temperatura del inyector: 300°C
- Programa de temperatura del horno: 40°C (por 3 min), rampa de 20°C por minuto (aumentando 20°C cada minuto hasta llegar a los 300°C)
- Tipo y tiempo de inyección: Split, división de flujo 1:20
- Gas acarreador (fase móvil) y flujo: helio (marca Praxair, grado 5.0 de ultra alta pureza) a un flujo de 1mL/min.
- Temperatura línea de transferencia: 250°C.
- Tipo de ionización: Ionización por impacto electrónico (IE).
- Analizador másico: tiempo de vuelo (TOF).
- Adquisición espectral: 20 espectros/s.
- Retraso del encendido del filamento: 3 min.
- Intervalo de masas: 33-400 u.
- Temperatura de la cámara de ionización: 200°C
- Compuestos de calibración: Perfluorotributilamina (PFTBA)

Como se mencionó anteriormente, en esas condiciones, se colocó la jeringa en el inyector hasta acondicionarla 2 horas antes de su uso.

4.6.2.3 Procesamiento de datos para el análisis por SPME

Se obtuvieron los cromatogramas de gases con los respectivos espectros de masas de las diferentes muestras. El equipo, mediante el programa Chroma TOF, emite diferentes parámetros para los compuestos volátiles detectados en la fase sólida, dentro de los cuales los más relevantes son: % área, índice de retención de Kovats experimental (IR_E), índice de retención y espectros de masas de cada compuesto volátil de la muestra. Se obtiene además un listado de compuestos como resultado de la comparación de los espectros de masas obtenidos de los compuestos volátiles con los reportados en una base de datos del equipo de acuerdo a un índice de Kovats de la literatura (IR_T) (Adams, 2007; NIST, 2002).

4.6.2.4 Identificación de los compuestos volátiles

Del listado de compuestos obtenidos por el equipo se eliminaron los compuestos interferentes (disolventes, silanoides, etc.) y posteriormente se realizó la confirmación de la identidad de cada uno de ellos, correlacionando los índices de retención de Kovats experimentales (IR_E) de los compuestos volátiles con aquellos valores reportados en la biblioteca electrónica del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, 2018) y en la literatura (Adams, 2007).

4.6.3 Determinación del contenido de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se determinó espectrofotométricamente mediante el método de Folin-Ciocalteu a microescala siguiendo la metodología descrita (Singleton *et al*, 1998).

Para la curva de calibración se preparó una disolución de ácido gálico (Sigma-Aldrich), en un intervalo de concentración de 0.77 a 24.68 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados del contenido de fenoles totales se expresan en equivalentes de ácido gálico (μg de equivalentes de ácido gálico/mL de muestra) y se obtuvieron interpolando cada absorbancia en la curva de calibración.

Para este análisis se pesó 1 mg de cada extracto de metanol de las muestras mencionadas en la Tabla 3 preparadas de acuerdo al punto 4.7.1.4; se disolvieron en 1 mL de metanol.

La reacción se realizó en una placa de 96 pozos. En cada pozo se adicionaron 160 μL de agua desionizada, 40 μL de cada extracto o compuesto a evaluar y 20 μg de reactivo de Folin y la placa se incubó durante 8 min en la oscuridad. Posteriormente, se adicionaron 80 μL de una solución de Na_2CO_3 al 8% y la mezcla se mantuvo en la oscuridad por una hora. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Epoch (BioTek) UV-Vis para microplacas a $\lambda = 760 \text{ nm}$. Las determinaciones de cada muestra se realizaron por triplicado.

4.7 PRUEBAS DE IDENTIDAD

4.7.1 Análisis de diferentes lotes de *I. heterophylla* considerando al xantorizol como compuesto marcador

4.7.1.1 Aislamiento de xantorizol del extracto de cloroformo

4.7.1.1.1 Fraccionamiento cromatográfico primario

El fraccionamiento de la fracción primaria de cloroformo obtenida según el numeral 4.3 se llevó a cabo mediante una cromatográfica en columna abierta. En una columna de vidrio que contenía 100 g de gel de sílice en hexano, se aplicaron 5 g de extracto de cloroformo adsorbidos en 6 g de sílica gel. La elución se realizó con una mezcla de disolventes hexano-AcOEt de polaridad creciente. La composición de los eluatos (fracciones de 100 mL) se analizó por cromatografía en capa fina con luz UV 254/365 nm y se reveló con sulfato cérico amoniacal. Las fracciones se fueron agrupando de acuerdo a su similitud cromatográfica. Tabla 1.

Tabla 1. Fraccionamiento cromatográfico primario de la fracción de cloroformo.

Sistema de elución	Fracciones recolectadas	Clave	Sistema de elución	Fracciones recolectadas	Clave
Hexano	1-5	A	Hexano-AcOEt (8:2)	131-136	S
	6-10	B		137-142	T
	11-15	C		143-163	U
	16-19	D	Hexano-AcOEt (75:25)	164-181	V
	20-25	E	Hexano-AcOEt (7:3)	182-189	W
	26-33	F		190-196	X
Hexano-AcOEt (95:5)	34-35	G	Hexano-AcOEt (6:4)	197-223	Y
	36-40	H	Hexano-AcOEt (1:1)	224-229	Z
	41-45	I		230-241	AA
	46-50	J	Hexano-AcOEt (4:6)	242-247	AB
	51-55	K		248-253	AC
	56-60	L	Hexano-AcOEt (3:7)	254-259	AD
	61-70	M		260-265	AE
	71-80	N	Hexano-AcOEt (2:8)	266-271	AF
	81-86	Ñ		272-276	AG
Hexano-AcOEt (9:1)	87-95	O	AcOEt	277-287	AH
	96-113	P	Acetona	288-297	AI
Hexano-AcOEt (85:15)	114-120	Q			
		121-130	R		

4.7.1.1.2 Fraccionamiento cromatográfico secundario

La fracción G (1.8 g) del fraccionamiento primario de la fracción de cloroformo se adsorbió en 2.5 g de gel de sílice. En una columna de vidrio conteniendo 55 g de gel de sílice en hexano, se aplicó la muestra que previamente se preparó. La elución se realizó con una mezcla de disolventes hexano-AcOEt de polaridad creciente. La composición de los eluatos (fracciones de 50 mL) se observó por cromatografía en

capa fina con luz UV 254/365 nm y se reveló con sulfato cérico amoniacal. Las fracciones se fueron agrupando de acuerdo a su similitud cromatográfica y el xantorrizol se identificó en la fracción K (Tabla 2).

Tabla 2. Fraccionamiento cromatográfico secundario de la fracción de cloroformo.

Sistema de elución	Fracciones recolectadas	Clave
Hexano	1-78	A
	70-114	A´A
	115-123	A´B
	124-132	K
	133-195	E
	196-212	A´D
	213-215	A´E
	216-266	A´F
	267-290	A´G

Sistema de elución	Fracciones recolectadas	Clave
Hexano-AcOEt (95:5)	291-296	AC
	297-314	AD
	315-323	AF
Hexano-AcOEt (9:1)	324-330	AG
	331-339	AH
Hexano-AcOEt (8:2)	340-350	AI
Hexano-AcOEt (7:3)	351-359	AJ
Hexano-AcOEt (1:1)	360-365	AK
Hexano-AcOEt (25:75)	366-368	AL
AcOEt	369-371	AM
Acetona	372-374	AN

4.7.1.2 Preparación de las muestras

Se pesó 1 g de cada lote (Tabla 6) de *I. heterophylla* (Ih), de *I. madrensis* (Im), la cual es una planta que no contiene xantorrizol y de *Curcuma xanthorrhiza* (Cx) que es una especie que contiene xantorrizol. Cada droga cruda (Ih-1 a Ih-12, Cx, Im) fue previamente triturada y tamizada a un diámetro de 2 mm y se colocó en un matraz en donde se dejó macerando con 12 mL de metanol por 24 h, después cada uno de los extractos obtenidos se filtró y concentró a presión reducida.

4.7.1.3 Identificación del xantorizol por cromatografía en capa fina (CCF)

1 mg de cada muestra de los extractos (o del compuesto marcador) señalados en la Tabla 6 se disolvió en 100 μL de metanol; 10 μL de cada muestra se aplicaron a una placa cromatográfica de 10 cm de altura por 15 cm de ancho. Se empleó cloroformo como fase móvil y como revelador se usó sulfato cérico amoniacal. Se dejó secar a temperatura ambiente y se observó con la lámpara de UV a longitudes de 254 y 365 nm. Posteriormente, se roció con el revelador y se colocó en una plancha de calentamiento a 100°C.

4.7.1.4 Identificación del xantorizol utilizando DSA-HR-APCI-MS

Como marcador analítico se estableció al xantorizol, tomando en cuenta su masa molecular teórica (m/z) de 219.1748 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Se pesaron 5 mg de cada una de las muestras (obtenidas de acuerdo a “Preparación de las muestras”), se disolvieron en aproximadamente 200 μL de MeOH, se introdujeron en el aditamento Direct Sample Analysis (DSA) (PerkinElmer, Waltham, MA) y se ionizaron en un equipo AxiON TOF 2, PerkinElmer. El espectrómetro de masas trabajó en un modo de trampa de iones positivos. Los resultados fueron procesados mediante el software AxiON 2 TOF MS (USB) Driver 6.2.

Condiciones para el análisis:

- Descarga en el puente corona: 3 μA
- Temperatura de la cámara APCI: 300°C
- Adquisición espectral: 5 espectros/s
- Vacío: 1.8×10^{-7} mBar

Condiciones del gas nitrógeno:

- Temperatura del gas de secado: 25°C
- Presión del gas nebulizador: 80 APCI
- Flujo del gas: 4 L/min
- Flujo de gas auxiliar: 4 L/min

4.7.1.5 Identificación del xantorizol por resonancia magnética nuclear (RMN)

Para determinar la presencia de xantorizol en los extractos de metanol (obtenidos de acuerdo a “Preparación de las muestras”), se disolvieron 20 mg de cada muestra (Tabla 3) en 600 μL de CDCl_3 con 0.01% de TMS (tetrametilsilano) y se colocaron en un tubo de RMN de 5 mm de diámetro. Los espectros de resonancia magnética protónica (RMN ^1H) se registraron en un equipo Bruker AVANCE III de 16.44 Teslas (700 MHz para ^1H) equipado con una criosonda TCO de 5 mm.

Las FIDs se exportaron al programa MestReNova versión 12.0.0-20080 X 2007 Mestrelab Research S. Los espectros se referenciaron a la señal del TSP (0 ppm).

Las muestras fueron procesadas por Dra. Nuria Esturau Escofet del Instituto de Química de la UNAM y el trabajo supervisado por el Dr. José Fausto Rivero Cruz de la Facultad de Química de la UNAM.

4.7.2 Efecto de los extractos de prueba sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC y determinación de la concentración mínima inhibitoria por el método de microdilución en placa

Para determinar el efecto de los extractos de los diferentes lotes (Tabla 3) sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, se pesaron 2 mg de cada muestra (apartado 4.7.1.4), se disolvieron en DMSO al 10% (CLSI, 2006). Se utilizaron microplacas estériles de 96 pozos y se realizaron diluciones seriadas a distintas concentraciones (500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en medio de cultivo BHI (Merck KGaA). Las bacterias que se utilizaron en el ensayo se ajustaron a 0.5 en la escala de Mc Farland (1×10^6 UFC/mL) y en a cada pozo se agregaron 20 μL de éstas. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. El ensayo se hizo por triplicado y como control positivo se utilizó una solución de digluconato de clorhexidina al 20% en H_2O (Sigma-Aldrich). Se calculó la CMI. Como control de actividad negativo se inoculó la bacteria en el medio BHI.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la realización del proyecto de tesis, primeramente se realizó la identificación botánica del ejemplar de *I. heterophylla*, posteriormente se preparó la decocción de la raíz que es la parte de la planta que se utiliza en los tratamientos tradicionales. A partir de ésta se hizo un fraccionamiento por reparto con hexano, cloroformo y acetato de etilo. Se ponderó actividad de confluencia de fibroblastos gingivales tanto a la decocción como a las fracciones.

Por otra parte, se obtuvo el aceite esencial así como una microextracción en fase sólida HS-SPME-EM-TOF de la raíz de *I. heterophylla* para la identificación de compuestos volátiles y una determinación de fenoles totales.

A partir del extracto de cloroformo proveniente del material vegetal posterior a la decocción, se aisló el xantorizol (1).

Se obtuvieron extractos de metanol de 12 lotes de *Iostephane heterophylla*, uno de *I. madrensis* y otro de *Curcuma xanthorrhiza*. El empleo de *I. madrensis* y de *C. xanthorrhiza* en este trabajo fue para establecer una comparación en las pruebas de identidad con dos especies muy relacionadas con *I. heterophylla*: la primera, del mismo género y diferente especie y carente del compuesto marcador (1), la segunda de género y especie diferente que contiene al compuesto marcador (1). En todos los extractos analizados se buscó la identificación de xantorizol (1) por CCF, por DSA-HR-APCI-MS y RMN ¹H y se analizó el impacto de los mencionados extractos sobre una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, calculándose en cada caso la CMI. Todo lo anterior para observar diferencias de resultados en cuanto a colectas, géneros y especies diferentes.

5.1 Obtención de la decocción y sus fracciones a partir de la raíz de *I. heterophylla*. Análisis por RMN ^1H

El extracto obtenido por decocción se obtuvo en buen rendimiento y a partir de éste se obtuvieron las fracciones de cloroformo y de acetato de etilo por reparto, ambas con muy bajo rendimiento; además se obtuvo un remanente acuoso del reparto. Se analizaron, la decocción y las fracciones, por RMN ^1H con el fin de buscar señales diagnósticas de alguno de los metabolitos secundarios reportados en la literatura para esta planta para eventualmente correlacionar la actividad de cierre de herida con alguno de esos metabolitos secundarios. El espectro de la decocción mostró mayoritariamente señales correspondientes de carbohidratos entre δH 3.0 y 5.5 (Figura 7).

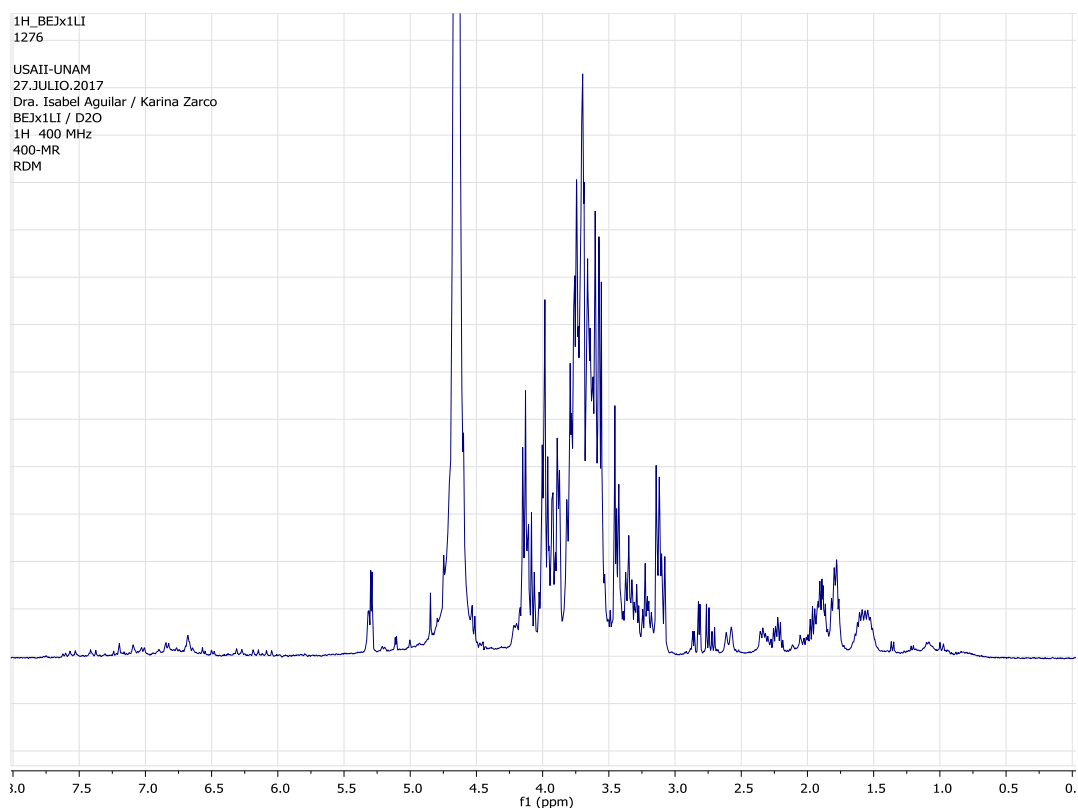


Figura 7. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, D_2O) de la decocción.

El espectro de la fracción de cloroformo mostró señales entre δ H 0.7 y 2.5 características de hidrógenos alifáticos de los diterpenos y sesquiterpenos reportados en la literatura para esta especie. Resaltan las señales simples de los grupos metilo del xantorizol en δ H 1.54, 1.69 y 2.23. Por otra parte, también son evidentes las señales del segmento aromático del mismo compuesto entre δ H 6.62 y 7.04. Otras señales minoritarias entre δ H 3.3 y 4.5 para hidrógenos en carbonos base de oxígeno sugieren la presencia de un componente carbohidrato en la fracción. Por último, se observan señales de hidrógenos de olefinas entre δ H 4.7 y 5.8 (Figura 8).

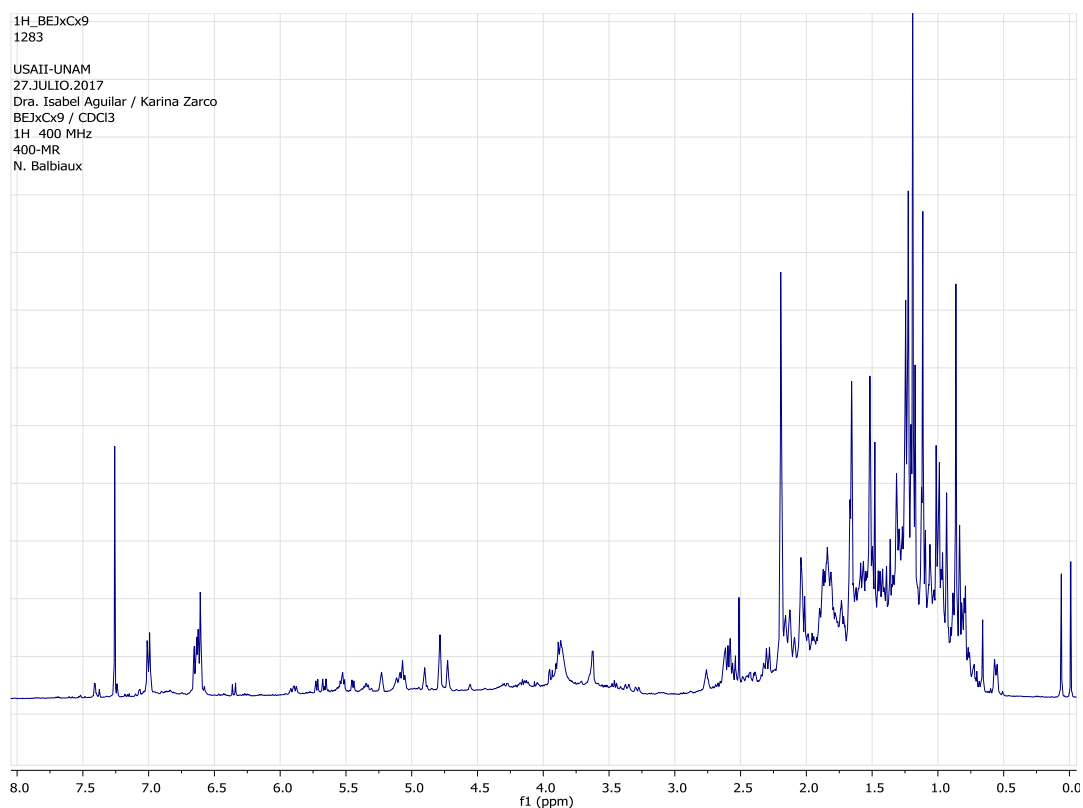


Figura 8. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del extracto de cloroformo.

El espectro de la fracción de acetato de etilo mostró una mezcla de compuestos de tipo terpénico (señales entre δ H 0.7 y 2.3), señales para azúcares (δ H 3.3 y 5.2) y múltiples señales de hidrógenos en carbonos de tipo sp^2 (Figura 9).

Por último, el espectro de la fracción acuosa remanente de la extracción fue muy similar al de la decocción (Figura 10).

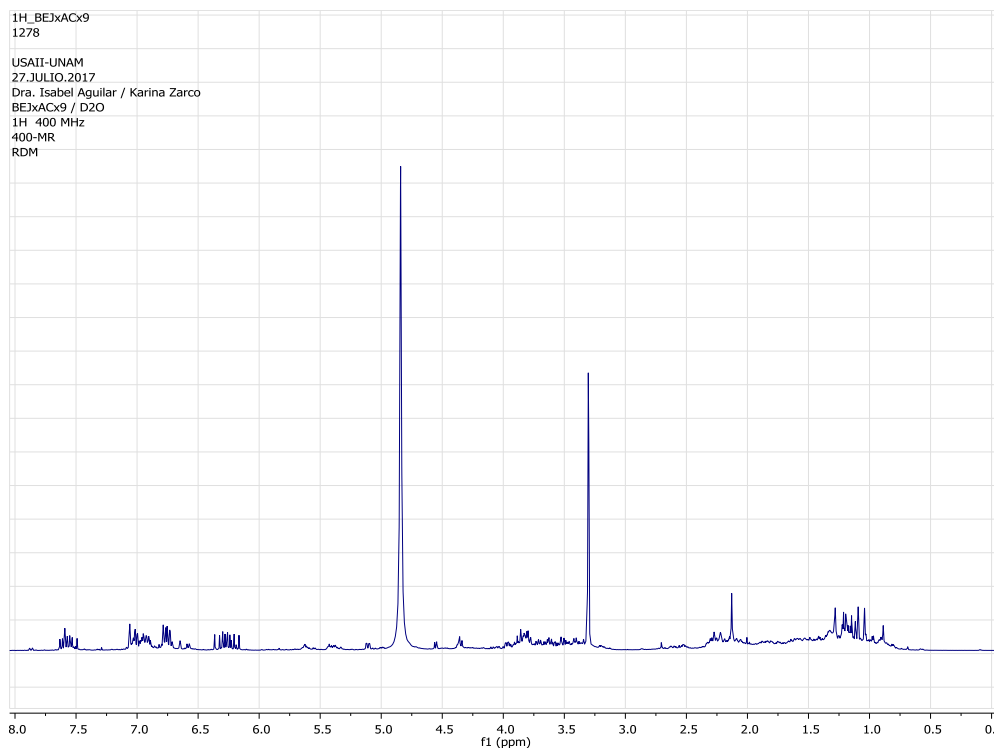


Figura 9. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, D_2O) del extracto de AcOEt.

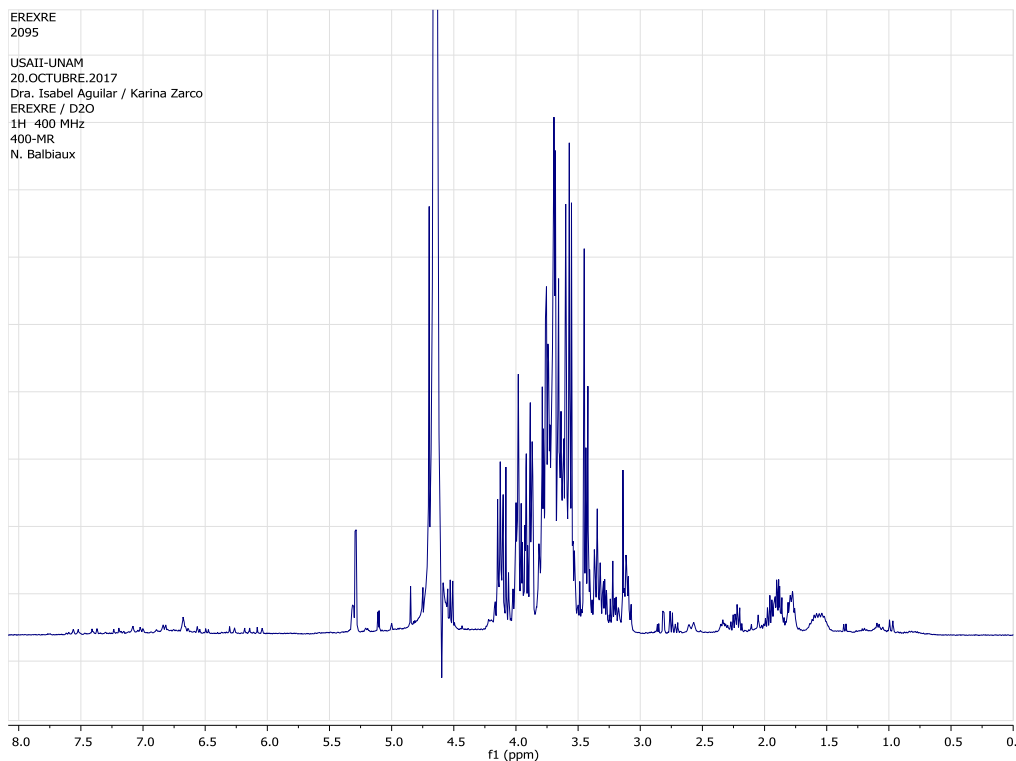


Figura 10. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, D_2O) de la fracción remanente del extracto acuoso.

5.2 PRUEBAS DE EFICACIA

5.2.1 Evaluación de la confluencia de fibroblastos gingivales, simulando una “herida”

Se calculó el porcentaje de cierre de la herida, empleando la Fórmula 11. Se realizó una prueba estadística ANOVA de dos vías, seguida de una prueba post hoc de Tukey.

$$\% \text{ Cierre de la herida} = \frac{\text{Distancia inicial de la herida (mm)} - \text{Distancia final de la herida (mm)}}{\text{Distancia inicial de la herida (mm)}} \times 100$$

Figura 11. Fórmula para la determinación del porcentaje de cicatrización de la “herida”.

Se seleccionó SFB al 10% como control positivo ya que corresponde a una concentración óptima para el crecimiento celular. A las 24 h de adicionar el control positivo a la monocapa de fibroblastos a la que se había hecho la “herida”, se observó un porcentaje de cicatrización de 12.7%; a las 48 h el porcentaje fue de 55% llegando hasta un 59.4 % a las 72 h.

Por otra parte, se empleó SFB 0.2% como control negativo debido a que es solamente la concentración requerida para que las células se mantengan vivas. En este caso, al adicionar éste a la monocapa de fibroblastos con “herida”, se observó que a las 48 h apenas alcanzaba el 0.9% del cierre de la herida y al cabo del experimento llegó a sólo 12.8%.

En el ensayo con la decocción (Figura 12), comparando la respuesta de la concentración de 1 µg/mL comparada con el control positivo no se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) a partir de las 48 horas. En el caso de las concentraciones de 5 µg/mL y 10 µg/mL, se observó que éstas tuvieron un comportamiento similar entre sí y al analizarlas estadísticamente no se apreció que tuvieran diferencia significativa ($p < 0.05$), pero sí se presentó en los dos casos, diferencia significativa con respecto al porcentaje de cierre de la herida del control positivo.

El experimento adicionado con 10 µg/mL de la decocción, presentó un 67% de cierre de la herida a las 24 h, 84.2% a las 48 y 91.4% a las 72 h. Estos resultados fueron los más destacados, y se pueden deber a que en la decocción exista un efecto sinérgico entre los compuestos que confieren propiedades de cicatrización. Estos resultados sugieren que la decocción de *I. heterophylla* promovió eficazmente la migración de fibroblastos en las “heridas” simuladas en los pozos de la placa.

El análisis espectroscópico por RMN ^1H de este extracto (Figura 7) mostró casi exclusivamente la presencia de azúcares, por lo que es probable que exista una participación de éstos para hacer un medio rico en una parte de los nutrientes que requieren los fibroblastos para su crecimiento.

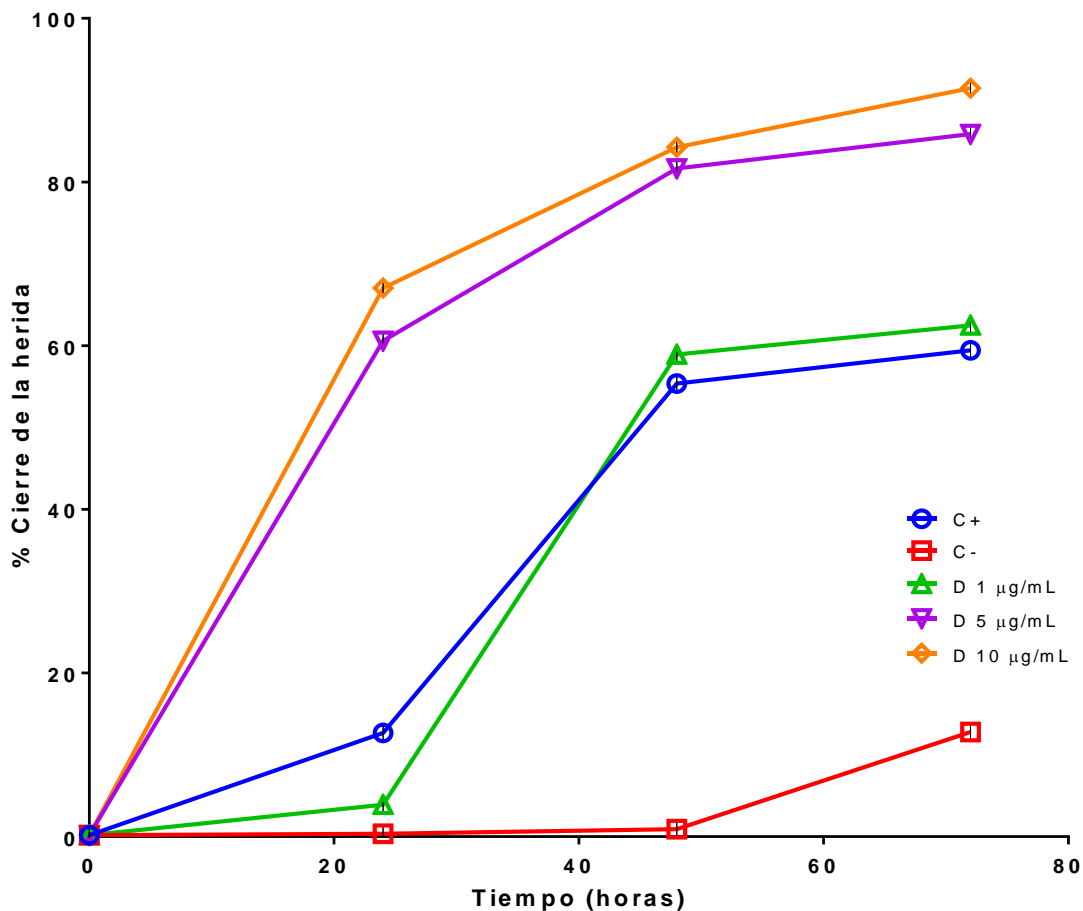


Figura 12. Porcentaje de cicatrización de fibroblastos gingivales en el ensayo con la decocción. Cada punto representa la media \pm EEM $n=18$.

Por otra parte, al evaluar las concentraciones de 5 $\mu\text{g/mL}$ y 10 $\mu\text{g/mL}$ de la fracción de acetato de etilo sobre la monocapa de fibroblastos con “herida” no se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) en el porcentaje de cierre de la herida y al final del ensayo (72 h) se observó un 76.7 % de cierre. Cabe resaltar que comparando estos resultados con los del control positivo, sí se observa diferencia significativa ($p < 0.05$) y sí se ve favorecida la confluencia de los fibroblastos (Figura 13).

En este mismo caso, a la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ se presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) durante todo el ensayo con respecto al del control positivo. A

las 24 h se observó un porcentaje de cierre de la herida de 62.7, a las 48 h de 71.2% y al final del ensayo llegó a 80.4%.

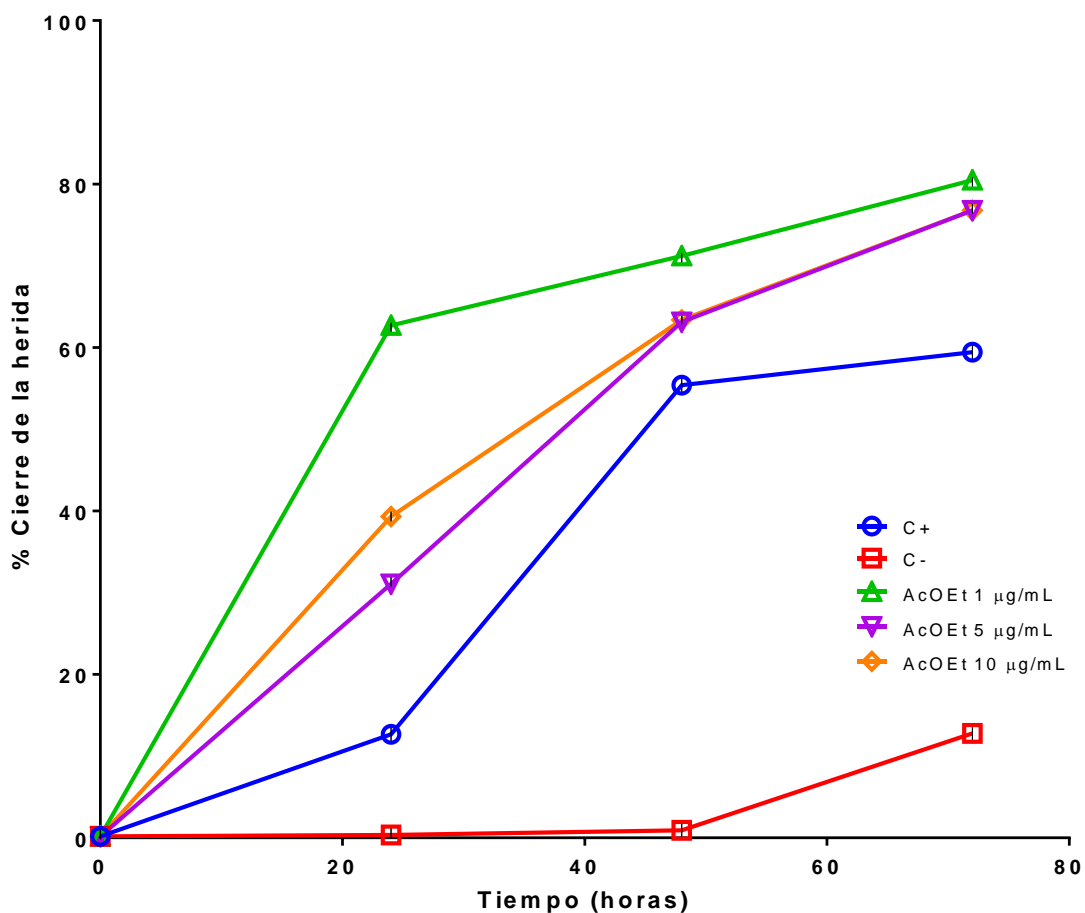


Figura 13. Porcentaje de cicatrización de fibroblastos gingivales en el ensayo con la fracción de AcOEt. Cada punto representa la media \pm EEM $n=18$.

Cabe mencionar que los compuestos visualizados en el espectro de RMN ^1H de esta fracción se apreciaron como una mezcla de azúcares y terpenos (Figura 9) que se intentó separar por CCF, pero debido a la escasa cantidad de muestra no fue posible obtener compuestos puros en cantidad suficiente para su identificación.

Al evaluarse el remanente acuoso de la extracción a las concentraciones de 5 µg/mL y 10 µg/mL no existió diferencia significativa ($p < 0.05$) entre éstas, en el porcentaje de cierre de la herida, con valores de 35.6 y 34.8% respectivamente hasta las 48 h; sin embargo se observó que a las 24 h y con respecto al control positivo sí se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) y estas concentraciones favorecieron el cierre de la herida (Figura 14).

A la concentración de 10 µg/mL de esta misma fracción, a las 24 h promovió un porcentaje de cierre de la herida de 64.7; este resultado es semejante al obtenido en el ensayo con la decocción; además, a las 48 h se observó un porcentaje de cierre de la herida de 65.1% y a las 72 h de 74.3%. Comparando estos resultados con los del control positivo y las otras dos concentraciones evaluadas de esta misma fracción, la concentración de 10 µg/mL del remanente acuoso, mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$) (Figura 14).

De acuerdo al espectro de RMN ^1H de esta fracción remanente se observa una composición muy parecida a la decocción, en la que el contenido metabólico es principalmente azúcares.

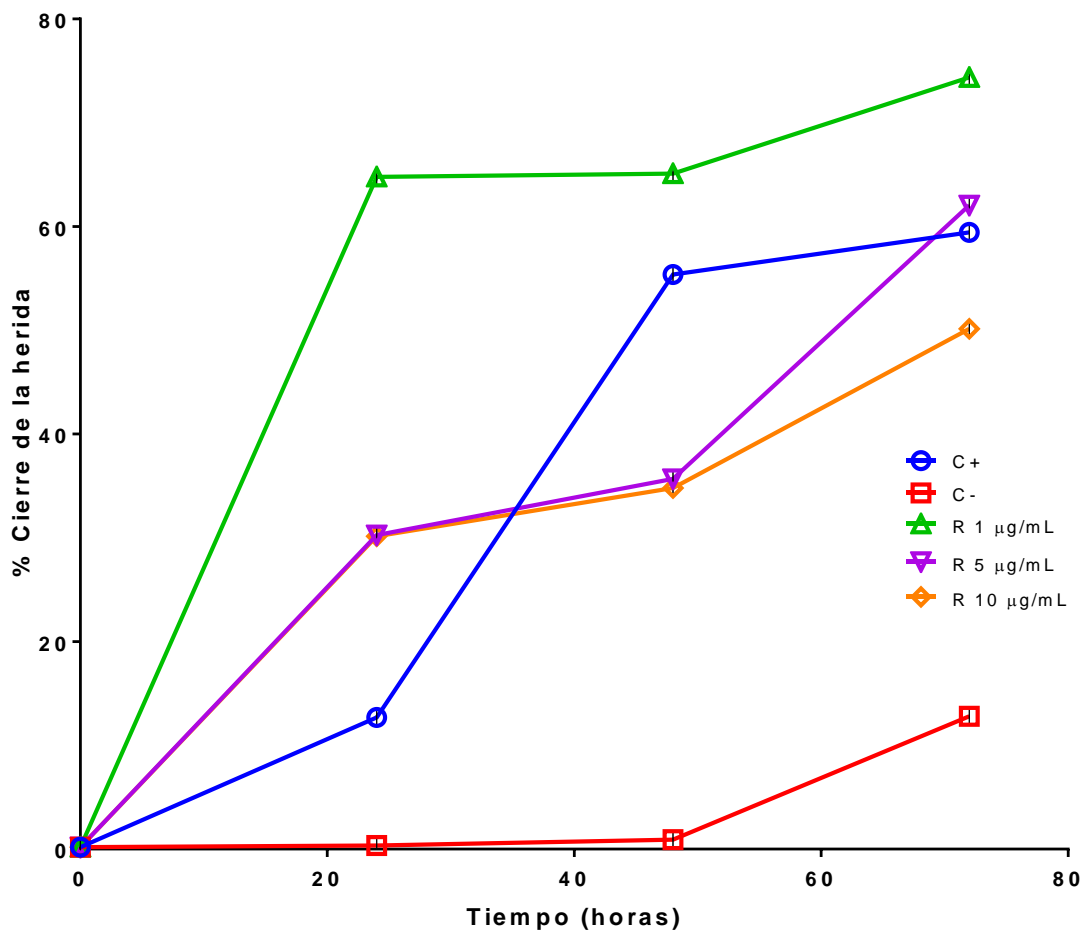


Figura 14. Porcentaje de cicatrización de fibroblastos gingivales en el ensayo con la fracción del remanente acuoso de la partición. Cada punto representa la media \pm EEM $n=18$.

En la Figura 15 se aprecian las microfografías representativas del ensayo de la migración de los fibroblastos con las tres muestras (D, AcOEt y R) a la concentración que mejor respuesta mostró cada una para el cierre de la “herida”: D=10 µg/mL, AcOEt=1 µg/mL y R=1 µg/mL, así como de los controles positivo y negativo, evaluados a diferentes tiempos. En éstas microfografías se puede observar cómo se dio la migración a los diferentes tiempos evaluados y a las 72 h cómo los fibroblastos llegan a su confluencia.

Algunas de las ventajas de trabajar *in vitro* estriban en la versatilidad del diseño experimental; nos brinda resultados más rápidos, menos costosos y no genera los problemas éticos de trabajar directamente con animales. Entre las limitaciones se encuentra principalmente la dificultad de extrapolar los resultados ya que éstos no sustituyen los ensayos *in vivo* (Boyko *et al.*, 2017). Sin embargo los ensayos *in vitro* como el que se llevó a cabo en esta tesis ofrece la posibilidad de realizar un ensayo biodirigido y auxiliar en la búsqueda de nuevas moléculas con propiedades de nuestro interés.

Se buscó evaluar las propiedades cicatrizantes de *I. heterophylla* mediante este ensayo *in vitro* con fibroblastos gingivales porque éstos están relacionados directamente con una de las fases de la cicatrización.

Cuando la monocapa de fibroblastos es seccionada mecánicamente, ésta responde a la interrupción de contacto célula-célula aumentando la concentración de los factores de crecimiento y las citoquinas en el borde de la “herida”, iniciando así la proliferación y la migración (Ghafourian, 2015).

Existen reportes de la literatura sobre ensayos de este tipo, como el llevado a cabo con extractos acuoso de corteza de *Ficus asperifolia* y hojas de *Gossypium arboreum*, utilizados en Ghana para la cicatrización de heridas, los cuales tuvieron efectos en el crecimiento de fibroblastos dérmicos humanos a 50 g/mL (Annan *et al.*, 2008). En otro caso se reportó que el extracto de metanol de *Moringa oleífera* aumenta significativamente la proliferación así como la migración de fibroblastos, llegando al cierre de la herida a las 72 h a una concentración de 25 µg/mL (Amali *et al.*, 2013). Balekar y colaboradores en 2012 probaron fracciones orgánicas obtenidas de las hojas de *Wedelia trilobata* y encontraron que la fracción de acetato de etilo a una concentración de 3 g/mL, indujo una migración de fibroblastos del 70% a las 48h. El mucílago obtenido de *Sambucus ebulus* L. a una concentración de 50 µg/mL constituyó la dosis efectiva después de 72 horas de tratamiento para la proliferación de fibroblastos (Pes *et al.*, 2010).

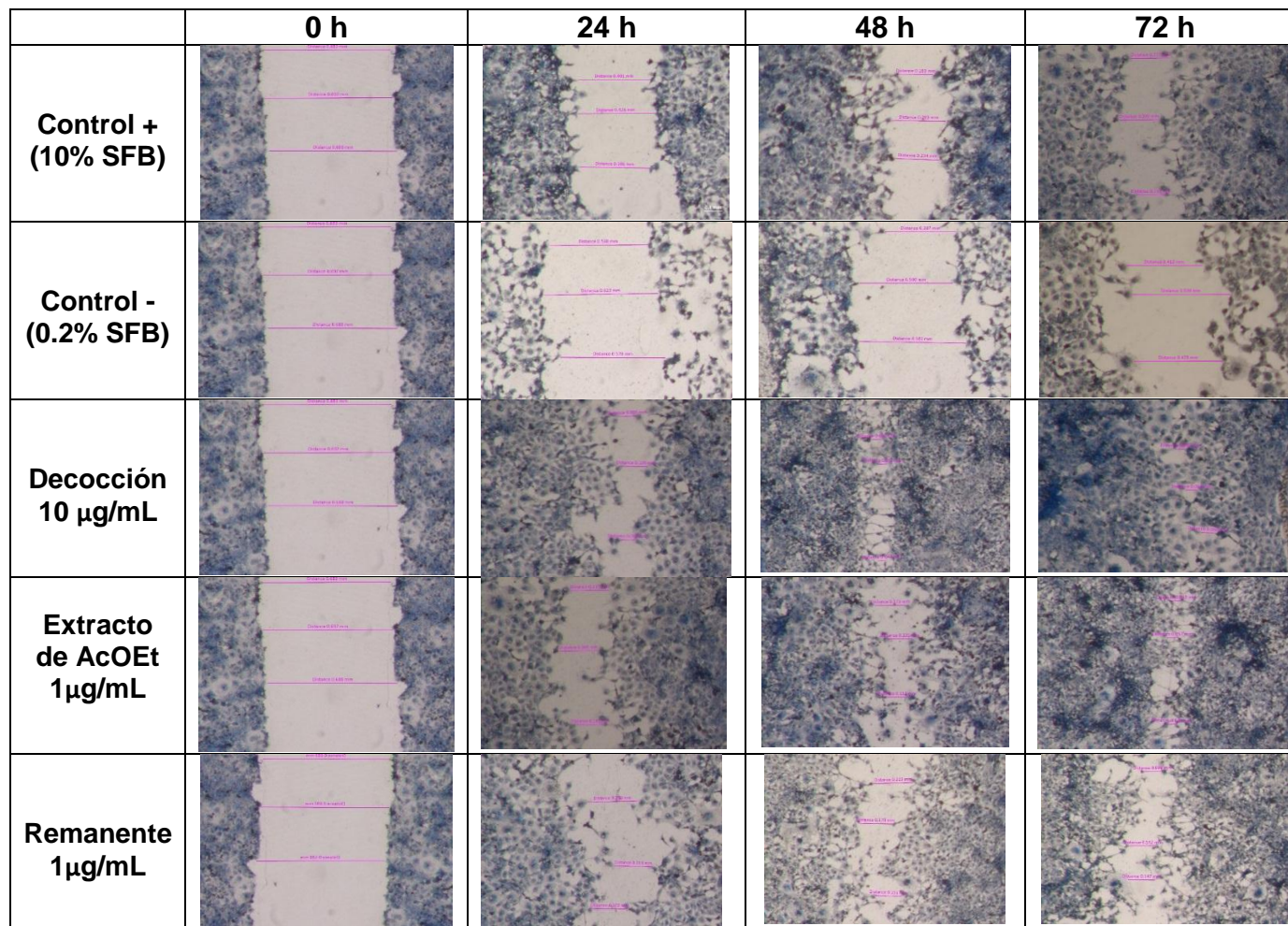


Figura 15. Micrográficas representativas de la evaluación de la confluencia de fibroblastos gingivales simulando una “herida”, con diferentes muestras probadas a la concentración donde se observó una mejor respuesta.

5.3 Pruebas de composición

5.3.1 Identificación de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de la raíz de *I. heterophylla*

Por el proceso de hidrodestilación, se obtuvo un aceite muy aromático de color ámbar a partir de la droga cruda, desecada y fragmentada de *I. heterophylla* cuyo análisis por CG/EM dio evidencia de 27 compuestos mayoritarios, los cuales se presentan en el Tabla 3 y en la Figura 16 se presenta el cromatograma.

En el listado se observa como compuestos mayoritarios sesquiterpenos como el xantorrizol (**1**) (6.5%), el cual es el compuesto considerado como marcador en este trabajo, el 4-metil-1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-benceno (14.55%) el cual muy probablemente sea un compuesto precursor en la biogénesis del xantorrizol, el α -triciclano (14.6%) y el isocomeno; (11.78%) todos ellos presentes en diferentes especies de asteráceas (Bohlman *et al.*, 1983). Es de notarse que 11 de los 27 compuestos detectados están presentes también en el análisis por microextracción en fase sólida.

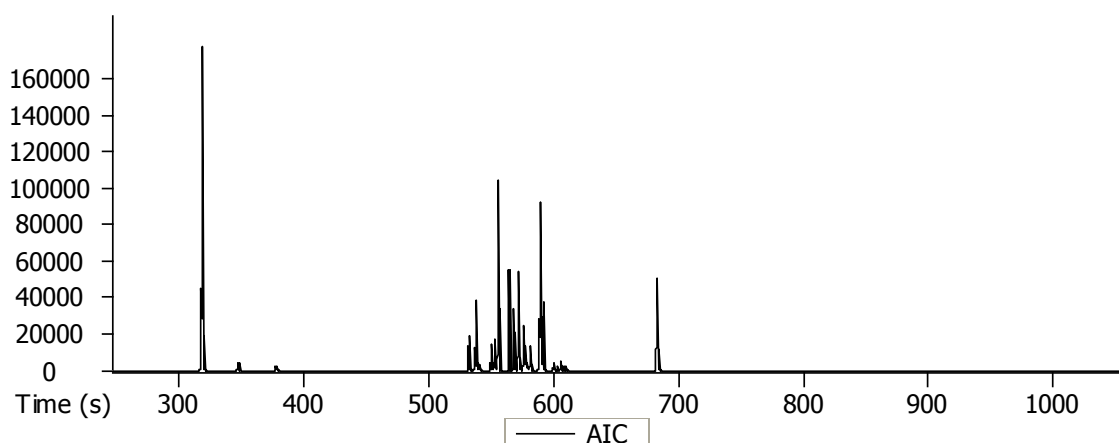


Figura 16. Cromatograma del aceite esencial de la raíz de *I. heterophylla*.

Tabla 3. Compuestos identificados en el aceite esencial de la raíz de *I. heterophylla*.

Pico	Nombre	Área (%)	T.R. (s)	I.R.E. ^I	I.R.T. ^{II}	Peso	Formula	Método identificación ^{III}	Ref.
1*	α -Triciclono	14.653	318.654	930.61	927	136	C ₁₀ H ₁₆	a,b,c	2
2	β -Pineno	1.3505	347.654	971.92	973	136	C ₁₀ H ₁₆	a,b,c	2
3*	<i>p</i> -Cimeno	1.1618	377.654	1019.5	1024	134	C ₁₀ H ₁₄	a,b,c	2
4	Presilfiperfol-7-eno	3.2952	532.054	1337.8	1336	204	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	1
5*	Silfiperfol-5 eno	5.2047	537.854	1351.3	1348	204	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	1
6	α -Longipineno	0.6398	539.904	1356	1352	204	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	1
7*	Silfiperfol-6-eno	3.0884	549.954	1379.4	1379	204	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	1
9*	Isocomeno	11.778	555.854	1393.1	1388	204	C ₁₄ H ₂₀ O	a,b,c	1
10	cis- α -Bergamoteno	5.0673	564.354	1414.7	1410	204	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	2
11*	Cariofileno	2.0741	568.104	1424.6	1420	204	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	2
13*	trans- α -Bergamoteno	4.1631	571.904	1434.7	1438	204	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	2
14*	γ -Muurooleno	2.3194	575.904	1445.3	1445	204	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	2
15	β -Sesquifelandreno	1.3051	577.404	1449.3	1524	204	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	2
17*	Humuleno	1.119	581.404	1459.9	1455	204	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	2
18*	Di-epi- α -cedreno	1.8025	588.304	1478.2		204	C ₁₅ H ₂₄	a,c	2
20*	1-(1,5-Dimetil-4-hexenil)-4-metil benceno	14.553	589.554	1481.5	1482	202	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	2
21	1,6,10-Dodecatrieno, 7,11-dimetil-3-metileno	5.6042	591.654	1487	1458	204	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	2
23	Germacreno	0.5876	603.204	1517.7	1480	204	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	2
25	α -Farneseno	0.3460	607.854	1530	1509	204	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	
26	10- <i>epi</i> -Cubebol	1.3254	609.754	1535	1535	222	C ₁₅ H ₂₆ O	c	3
27	Xantorizol	6.5055	683.154	1746.6	1749	218	C ₁₅ H ₂₂ O	c	2

*Compuesto identificado por HS-SPME de *I. heterophylla*. **I.** Índice de retención de Kovats experimental en columna DB-5. **II.** Índice de retención de Kovats teórico en columna DB-5. **III.** Compuesto identificado por: **a.** Tiempo de retención, **b.** Índice de retención, **c.** espectros de masas. Referencia: **1.** Adams, 2007, **2.** NIST, **3.** Adams, 2017

5.3.2 Compuestos volátiles mayoritarios por microextracción en fase sólida (HS-SPME-EM-TOF) de la raíz de *I. heterophylla*

Las plantas producen y emiten numerosos compuestos volátiles. Siempre se ha reconocido el olor que producen, por su importancia comercial y estética, que liberan no sólo de flores y frutos sino también de tejidos vegetativos. La identificación de los compuestos volátiles es un asunto delicado ya que la extracción y concentración de los compuestos antes de su análisis depende de la eficiencia del método de extracción utilizado.

La microextracción representa una técnica que hace posible desarrollar el análisis en el laboratorio en un lapso de tiempo relativamente corto además en cuanto al procesamiento de la muestra es muy simple. El método por HS-SPME resulta aún más conveniente para trabajar con compuestos volátiles a partir de matrices de alta complejidad, ya que los analitos difunden a partir de la matriz en el aire y luego desde el aire hacia el recubrimiento de la fibra. Entre las ventajas de este sistema es que el análisis cualitativo de toda una gama de compuestos puede llevarse a cabo con una sola inyección, el ahorro de tiempo, el nulo uso de disolventes y sin la pérdida de analitos que debido a la temperatura conlleva un proceso de extracción (Marín-Loaiza *et al.*, 2007).

Los compuestos volátiles se determinaron utilizando HS-SPME-GC-EM-TOF. Un total de 19 compuestos mayoritarios fueron identificados a partir de la muestra (Tabla 4). En contraste con los compuestos identificados en el aceite esencial, (que en su mayoría fueron sesquiterpenos) el análisis por microextracción en fase sólida de la raíz mostró que predominan en la muestra mono y sesquiterpenos tricíclicos; esto tal vez debido a que es un análisis más directo en el cual, los componentes más volátiles quedan inmediatamente adheridos a la matriz de la fibra. El α -triciclono también en este caso fue mayoritario (20.45%) y se observó ausencia de xantorrizol. Otros compuestos mayoritarios fueron el 1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil benceno (6.0%), silfineno (5.9%), cedreno-V6 (5.9%), isocomeno (7.4%), di-epi- α -cedreno (6.09%). Salvo el silfineno y el cedreno-V6, los demás componentes se detectaron por ambos procedimientos.

Tabla 4. Compuestos volátiles identificados en la raíz de *I. heterophylla* por microextracción en fase sólida.

Pico	Nombre	Área (%)	T.R. (s)	I.R.E. ^I	I.R.T. ^{II}	Peso	Formula	Método identificación ^{III}	Ref.
1*	α-Triciclono	20.453	316.247	927.18	927	136	C ₁₀ H ₁₆	a,b,c	2
2	Camfeno	1.2453	327.247	942.85	953	136	C ₁₀ H ₁₆	a,b,c	2
3	α-Pineno	3.0548	346.647	970.49	939	136	C ₁₀ H ₁₆	a,b,c	2
4	α-Fellandreno	0.8386	364.697	996.2	1005	136	C ₁₀ H ₁₆	a,b,c	2
5*	ρ-Cimeno	1.6786	376.797	1017.9	1024	134	C ₁₀ H ₁₄	a,b,c	2
6	Limoneno	2.2713	379.697	1023.4	1029	136	C ₁₀ H ₁₆	a,b,c	2
7	Timol	0.2067	484.447	1227.1	1235	164	C ₁₁ H ₁₆ O	a,b,c	2
8*	Silfiperfol-5 eno	1.9776	528.097	1328.6	1328	204	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	1
9	Silfineno	5.8899	536.747	1348.7	1347	204	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	1, 2
10	Cedreno-V6	5.884	538.147	1352		204	C ₁₅ H ₂₄	a,c	2
11*	Silfiperfol-6-eno	3.9175	549.297	1377.9	1379	204	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	1
12*	Isocomeno	7.4091	555.147	1391.5	1388	204	C ₁₄ H ₂₀ O	a,b,c	1
13*	Cariofileno	1.7309	567.447	1422.9	1420	204	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	2
14*	trans-α-Bergamoteno	1.0156	571.247	1433	1438	204	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	2
15*	γ-Muuroleno	1.937	575.297	1443.7	1477	204	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	2
16*	Humuleno	0.6899	580.797	1458.3	1455	204	C ₁₅ H ₂₄	a,b,c	2
17*	Di-epi- α-cedreno	6.0938	587.547	1476.2		204	C ₁₅ H ₂₄	a,c	2
18*	1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil benceno	6.0962	588.647	1479.1	1481	202	C ₁₅ H ₂₂	a,b,c	2
19	Ácido n-hexadecanoico	0.6965	744.447	1941.9	1970	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	c	2

*Compuesto identificado en el aceite esencial de *I. heterophylla*. **I.** Índice de retención de Kovats experimental en columna DB-5. **II.** Índice de retención de Kovats teórico en columna DB-5. **III.** Compuesto identificado por: **a.** Tiempo de retención, **b.** Índice de retención, **c.** espectros de masas. Referencia: **1.** Adams, 2007, **2.** NIST

En el análisis de los compuestos volátiles por CG-EM se utilizaron métodos combinados que incluyen el cálculo de índices de retención (IR) y el análisis de los espectros de masas.

En la identificación de los compuestos volátiles basada en la metodología de Kovats se utilizaron como estándares externos una mezcla de hidrocarburos constituida por una serie homóloga de n-alcenos (C-8- a C-24); el proceso de elución se realizó utilizando las mismas condiciones cromatográficas que para las muestras.

Los índices de Kovats fueron calculados de manera automática por el software del equipo.

La comparación de los espectros de masas se realizó utilizando la base de datos que se incluye en el programa del equipo (Software ChromaTOF). Se realiza considerando el espectro obtenido y el incluido en la base de datos NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología).

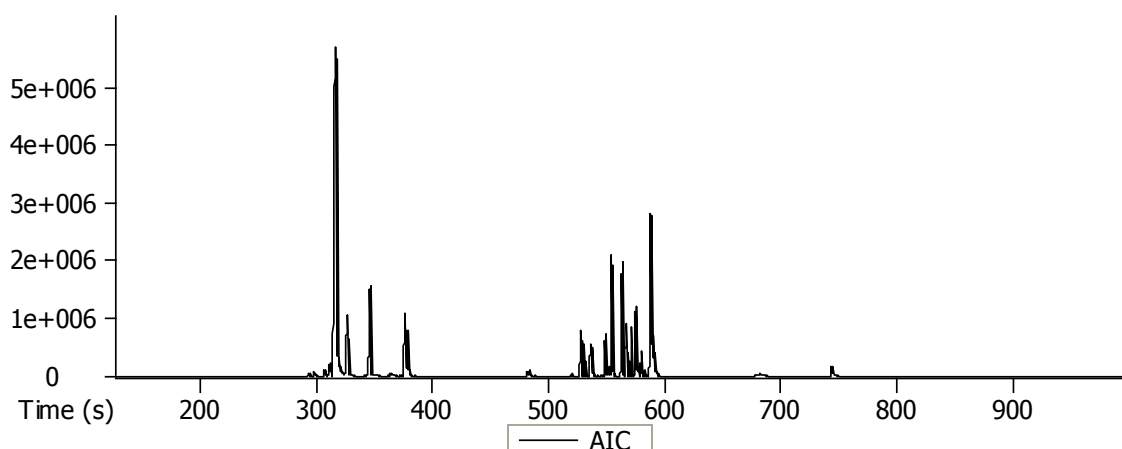


Figura 17. Cromatograma de los compuestos volátiles de la raíz de *I. heterophylla*.

5.3.3 Determinación de contenido de fenoles totales

El reactivo de Folin-Ciocalteu consiste en una mezcla de tungstato de sodio, molibdato de sodio y otros reactivos. Al reaccionar con fenoles, adquiere un color azul cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de fenoles

presentes y que emite espectrofotométricamente en alrededor de 760 nm. La reacción se lleva a cabo a un pH cercano a 10, que se logra con carbonato de sodio.

Para la determinación de la concentración de los fenoles totales en las muestras, se obtuvo una curva de calibración con el ácido gálico mostrada en la Figura 18. Como se observa, la curva de calibración obtuvo un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9993, que indica una buena correlación y por lo tanto mayor exactitud en la interpolación de la absorbancia para obtener la concentración de compuestos fenólicos totales en las muestras reportado como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de extracto de metanol.

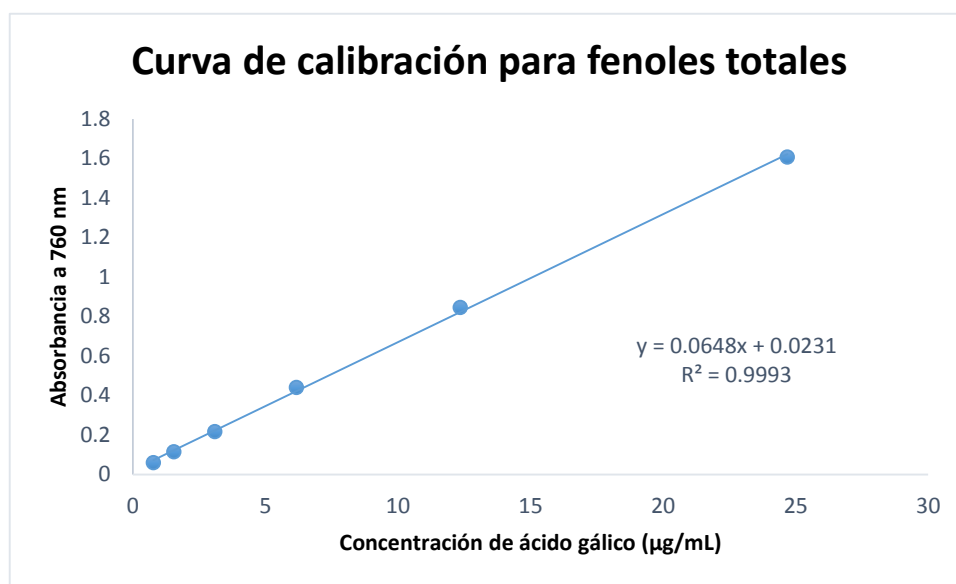


Figura 18. Curva de calibración para la determinación de fenoles totales.

Con los datos de la curva de calibración fue posible determinar el rango de concentraciones en las muestras que estuvo entre 24.68 y 0.77 µg/mL como se representa en la Figura 18. La interpolación de los datos de absorbancia obtenidos para cada una de las muestras de estudio permitió el cálculo de la concentración de fenoles totales como se observa en la Figura 19 y en la Tabla 6 la cual muestra que el extracto de metanol de *Curcuma xanthorrhiza* (Cx) es el que presentó el mayor contenido de fenoles totales, con 125 mg EAG/ g de extracto de metanol de raíz. Cabe mencionar que *C. xanthorrhiza* es una planta perteneciente a la familia Zingiberaceae, es originaria de la isla de Java en Indonesia y fue la materia prima

vegetal de la cual se aisló por vez primera al xantorrizol (Rimpler, 1970). Esta planta es rica en compuestos fenólicos de tipo curcuminoide pero también posee sesquiterpenos, el xantorrizol entre éstos (Mohd-Salleh *et al.*, 2016). De acuerdo a los resultados, los lotes lh-3, lh-4, lh-2, lh-7, lh-10, lh-11 e lh-12 mostraron un contenido de fenoles totales mayor a 20 mg EAG/g del extracto siendo el último caso el mayoritario que fue colecta del estado de Puebla; el lote lh-6 proveniente del Mercado Reforma en Chihuahua representó el de menor concentración. Esta variabilidad es multifactorial, desde la influencia en las condiciones climatológicas, el tipo de suelo, la época de colecta, etc.

Fue inesperado el resultado que se obtuvo con *I. madreensis* (12.82 mg EAG/g de extracto de metanol de raíz, por encima de la colecta lh-6). A pesar de ser bajo el contenido, se esperaba que fuera mínimo el resultado ya que existe un reporte en la literatura sobre el análisis de los contenidos químicos de este vegetal en donde solamente identificaron diterpenos y no fueron aislados compuestos fenólicos.

Iostephane heterophylla ha sido investigada desde el punto de vista fitoquímico de donde se ha aislado y caracterizado un grupo de compuestos fenólicos como los principales metabolitos secundarios presentes en esta especie (Aguilar *et al.*, 1993).

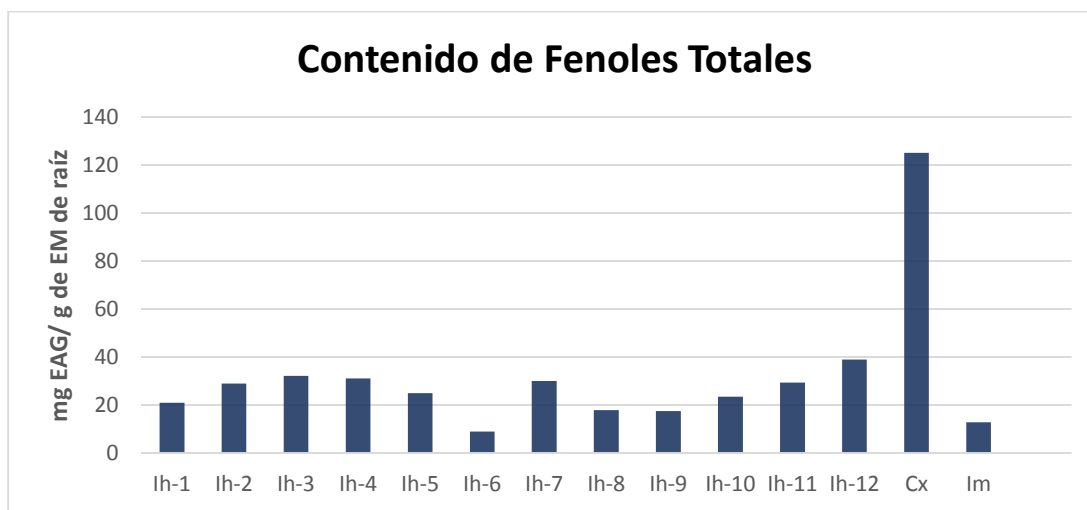


Figura 19. Comparación del contenido de fenoles totales expresados en mg de equivalentes de ácido gálico/g de extracto de metanol de raíz. *Iostephane heterophylla* (lh1-lh12), *I. madreensis* (lm), *Curcuma xanthorrhiza* (Cx)

5.4 PRUEBAS DE IDENTIDAD

5.4.1 Análisis de diferentes lotes de *I. heterophylla* considerando al xantorrizol como compuesto marcador

5.4.1.1 Aislamiento e identificación de xantorrizol

El compuesto aislado de la fracción K (Tabla 2) es un líquido denso de color ámbar y se identificó como xantorrizol (**1**) (Figura 20) y sus datos espectroscópicos se muestran en la Tabla 5.

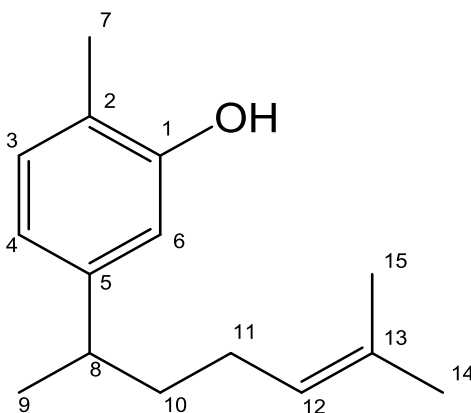


Figura 20. Estructura del xantorrizol (**1**).

Su fórmula molecular se estableció como $C_{15}H_{22}O$. El espectro de RMN ^{13}C (Figura 22) presentó señales de quince átomos de carbono, que sugiere la estructura de un sesquiterpeno, de las cuales 8 carbonos corresponden a tipo aromáticos y vinílicos. El espectro de RMN 1H (Figura 21) presentó tres señales de hidrógenos aromáticos en un anillo bencénico trisustituido en las posiciones 1, 2 y 5 presentándose en δH : 7.04 (1H d, $J=7.6$ Hz, H-3), 6.69 (1H, dd, $J=7.6, 1.6$ Hz, H-4) y 6.62 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-6); un hidrógeno vinílico de una doble ligadura trisustituida en δH 5.1 (1H, m, H-12); un hidrógeno de metino bencílico en δH 2.62 (1H, m, H-8); hidrógenos de dos grupos metileno en δH 1.57-1.61 (2H, m, H-10) y 1.88-1.89 (2H, m, H-11); un singulete de metilo unido al benceno en δH 2.23 (3H, s, H-7); dos metilos unidos a

un doble enlace en 1.69 (3H, s, H-15) y 1.54 (3H, s, H-14); un metilo unido a carbono terciario en δ H 1.21 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H-9). La identidad del xantorizol fue confirmada por comparación de sus características espectroscópicas y cromatográficas con las reportadas en la literatura (Aguilar *et al.* 1993).

Tabla 5. Datos espectroscópicos de RMN para el xantorizol en CDCl_3 .

RMN ^1H Figura 21.	400 MHz, CDCl_3 , δ_{H} : 7.04 (1H d, $J=7.6$ Hz, H-3), 6.69 (1H, dd, $J=7.6, 1.6$ Hz, H-4), 6.62 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-6), 5.10 (1H, m, H-12), 4.75 (1H, s, -OH), 2.62 (1H, m, H-8), 1.88-1.891 (2H, m, H-11), 1.57-1.61 (2H, m, H-10), 2.23 (3H, s, H-7), 1.69 (3H, s, H-15), 1.54 (3H, s, H-14), 1.21 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H-9).
RMN ^{13}C Figura 22.	100 MHz, CDCl_3 , δ_{C} : 153.75 (C-1), 147.35 (C-5), 131.55 (C-13), 130.89 (C-3), 124.65 (C-12), 120.97 (C-2), 119.56 (C-4), 113.67 (C-6), 39.18 (C-8), 38.52 (C-10), 26.29 (C-11), 25.85 (C-15), 22.52 (C-9), 17.82 (C-14), 15.47 (C-7).

El xantorizol, es un sesquiterpeno de tipo bisaboleno y como se mencionó, al ser mayoritario en la droga de estudio, se eligió como el compuesto marcador para las pruebas de identidad.

5.4.1.2 Obtención de los extractos de metanol a partir de diferentes lotes de *I. heterophylla*

Los rendimientos en cada caso fueron diferentes (Tabla 6), este resultado era de esperarse, considerando que las muestras son de distinto origen y de adquisición.

Los lotes con mayor rendimiento son lh-4 e lh-1, esto podría deberse a que los lugares de colecta comparten características similares, a pesar de que fueron adquiridos con diez años de diferencia (proviene de los estado de Morelos y de

México en colindancia). De acuerdo a los resultados de la Tabla 6 no se aprecia una correlación entre el rendimiento de extracto con el contenido de su contenido de fenoles totales, pero éste sí está relacionado con la actividad sobre el microorganismos de prueba, exceptuando al lote lh-2 adquirido en 2016 que comparado con el lote lh-3 obtenido más recientemente este tuvo mejor valor de CMI, lo que sugiere que los compuestos fenólicos sufren algún tipo de degradación.

Tabla 6. Resultados de los ensayos realizados a los extractos de metanol de los diferentes lotes de *I. heterophylla*, *I. madrensis*, *Curcuma xanthorrhiza* y xantorrizol

Muestra	Lugar de adquisición	Año de adquisición	Rendimiento del extracto MeOH (%)	mg EAG/ g de extracto metanólico de raíz	CMI (µg/mL) <i>Staphylococcus aureus</i>
Ih-1	Morelos	2016	36.9567	20.86	31.25
Ih-2	Mercado de Sonora (Toluca, Edo. de México)	2016	13.3386	28.94	62.5
Ih-3	Mercado de Sonora (Toluca, Edo. de México)	2018	12.2052	32.1	31.25
Ih-4	Toluca, Edo. de México	2006	38.7350	31.02	31.25
Ih-5	Mercado Reforma, Chihuahua	2004	1.1430	24.93	>500
Ih-6	Mercado Reforma, Chihuahua	2004	14.8166	8.88	62.5
Ih-7	Mercado Reforma, Chihuahua	2004	22.6062	29.94	125
Ih-8	Mercado Reforma, Chihuahua	2004	20.6789	17.83	>500
Ih-9	Mercado Reforma, Chihuahua	2004	1.1989	17.44	>500
Ih-10	Mercado Reforma, Chihuahua	2004	14.3136	23.38	31.25
Ih-11	Edo. de México	2000	10.8855	29.3	125
Ih-12	Puebla, Puebla	1998	2.4014	38.87	31.25
Cx	Mercado Reforma, Chihuahua	2004	13.8883	125	62.5
Im	Mercado Reforma, Chihuahua	2004	2.4014	12.82	>500
X	Xantorrizol, aislado en la sección 5.7		–	–	<15.625

**Iostephane madrensis* (Im), *Curcuma xanthorrhiza* (Cx), Xantorrizol (X).

5.4.1.2.1 Identificación del xantorrizol por cromatografía en capa fina (CCF)

La CCF, es la técnica más utilizada como prueba de identidad en las farmacopeas herbolarias, ya que es de implementación sencilla y permite tener conclusiones cualitativas de manera rápida (Mohammad *et al.*, 2010). Se ha convertido en una técnica de rutina para el análisis de huellas digitales de productos naturales.

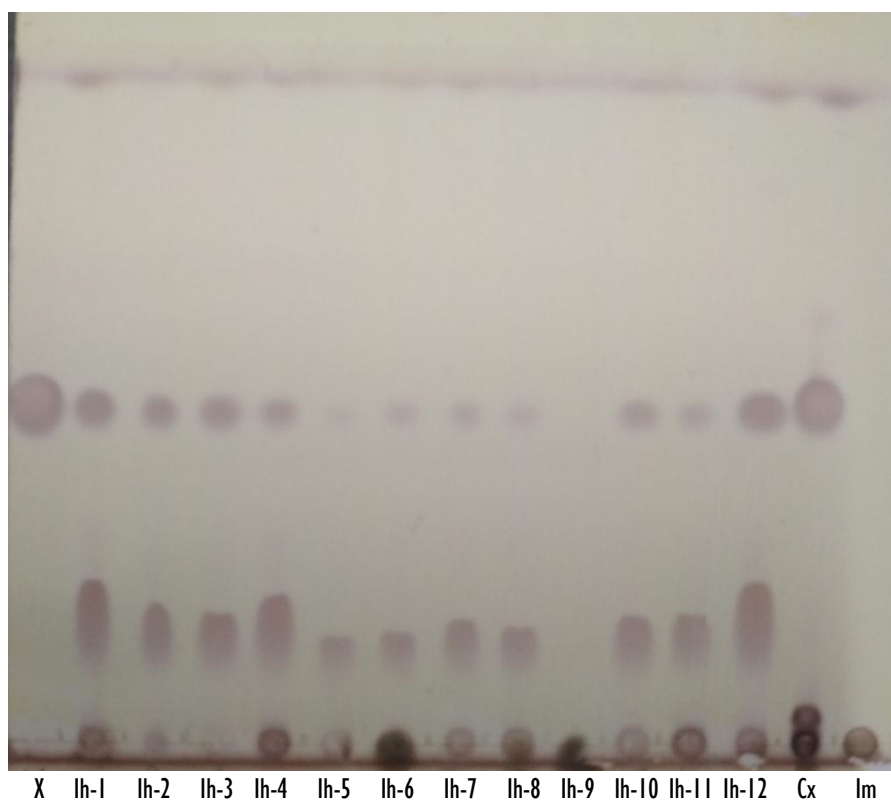


Figura 23. Cromatograma en capa fina de los extractos de metanol de los diferentes lotes de *I. heterophylla* (lh1-lh12), *Iostephane madrensis* (lm), *Curcuma xanthorrhiza* (Cx) y xantorrizol (X). Revelador sulfato cérico amoniacal. Sistema de elución: cloroformo 100%.

En la Figura 23, se presenta una fotografía de la cromatoplaqueta realizada a los extractos de metanol de los diferentes lotes de *I. heterophylla* donde se observa en todos los casos la presencia del xantorrizol (R_f 0.5), sin embargo en el lote lh-9 la

presencia de la mancha correspondiente al xantorizol es casi imperceptible, lo que y sugeriría que se trata de otra especie vegetal pero los análisis por de RMN ^1H y por DSA-HR-APCI-MS fueron concluyentes al observarse en ambos las señales esperadas para el xantorizol. En el caso del extracto de *I. madrensis* no se observa la presencia del compuesto marcador, como era de esperarse.

5.4.1.2.2 Identificación del xantorizol por DSA-HR-APCI-MS

La espectrometría de masas tiene como principal desventaja la destrucción de la muestra, sin embargo, las ventajas que ofrece es la rapidez de análisis, el requerimiento de cantidades menores a los 5 mg de muestra, por esta razón ha sido reconocida como una herramienta para establecer la identidad de muestras herbolarias.

Los espectros de masas de alta resolución de los extractos de metanol de los lotes analizados (Tabla 6), se registraron en modo de ionización positiva. El marcador analítico, xantorizol (**1**), fue identificado considerando su masa exacta y la masa teórica reportada.

En el caso de la muestra de *I. madrensis* no se detectó el marcador analítico y en todas las demás muestras analizadas se detectó la presencia de xantorizol (Tabla 7), cuya fórmula molecular corresponde a $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$ y una masa molecular teórica (m/z) de 219.1748 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Todos los espectros de las muestras analizadas se encuentran en el **Anexo 1 (Figuras 27 a la 41)**

Tabla 7. Datos de m/z del xantorrizol en los espectros de masas.

Muestra	m/z de $C_{15}H_{22}O$, [M+H]⁺.
lh-1	219.1705
lh-2	219.1753
lh-3	219.1743
lh-4	219.1755
lh-5	219.1685
lh-6	219.1723
lh-7	219.1712
lh-8	219.1766
lh-9	219.1702
lh-10	219.1762
lh-11	219.1700
lh-12	219.1691
Cx	219.1700
lm	–
X	219.1748

5.4.1.2.3 Identificación del xantorrizol por resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN 1H)

La RMN es utilizada para la obtención de huellas digitales de matrices herbolarias, ya que esta técnica proporciona un bosquejo del perfil metabólico de cualquier producto natural (Kumar *et al.*, 2016) y tiene la ventaja de que no es una técnica destructiva por lo que permite la recuperación de la muestra.

Los datos de RMN 1H para el xantorrizol (Tabla 9) y el espectro de RMN 1H a 700 MHz se muestran en la Figura 25. Las señales diagnósticas para el xantorrizol (resaltadas en negro en la Tabla 8) corresponden a tres señales de hidrógenos

aromáticos **H-3**, **H-4** y **H-6**. Los cuales se observan en, δ_H : 7.6 (1H d, $J=7.6$ Hz, H-3), 6.71 (1H, dd, $J=7.7$, 1.7 Hz, H-4) y 6.64 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-6). Otra señal diagnóstica es el hidrógeno vinílico (**H-12**) de una doble ligadura trisustituida en δ_H 5.12 (1H, m). En los experimentos se adicionó TSP como reactivo de referencia (0 ppm).

Tabla 8. Datos espectroscópicos de RMN para el xantorizol en $CDCl_3$ con 0.01% de TSP (1H a 700 MHz).

RMN 1H Figura 25.	700 MHz, $CDCl_3$, δ_H : 7.6 (1H d, $J=7.6$ Hz, H-3), 6.71 (1H, dd, $J=7.7$, 1.7 Hz, H-4), 6.64 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-6), 5.12 (1H, m, H-12), 4.72 (1H, s, -OH), 2.64 (1H, m, H-8), 1.95-1.87 (2H, m, H-10), 1.65-1.57 (2H, m, H-11), 2.25 (3H, s, H-7), 1.71 (3H, s, H-15), 1.56 (3H, s, H-14), 1.23 (3H, d, $J=7.0.9$ Hz, H-9).
--	--

Se alinearon los espectros de RMN 1H obtenidos (Figura 24) de los lotes analizados (Tabla 6). El xantorizol se detectó en todos los extractos de metanol obtenido de los lotes de *I. heterophylla* (lh-1 a lh-12) así como en *Curcuma xanthorrhiza* (Cx) sin embargo, tal como se esperaba, en *I. madrensis* (Im) no se detectaron las señales características del compuesto marcador (Figura 24), esto coincide con los resultados obtenidos en la CCF e identificación del xantorizol por DSA-HR-APCI-MS.

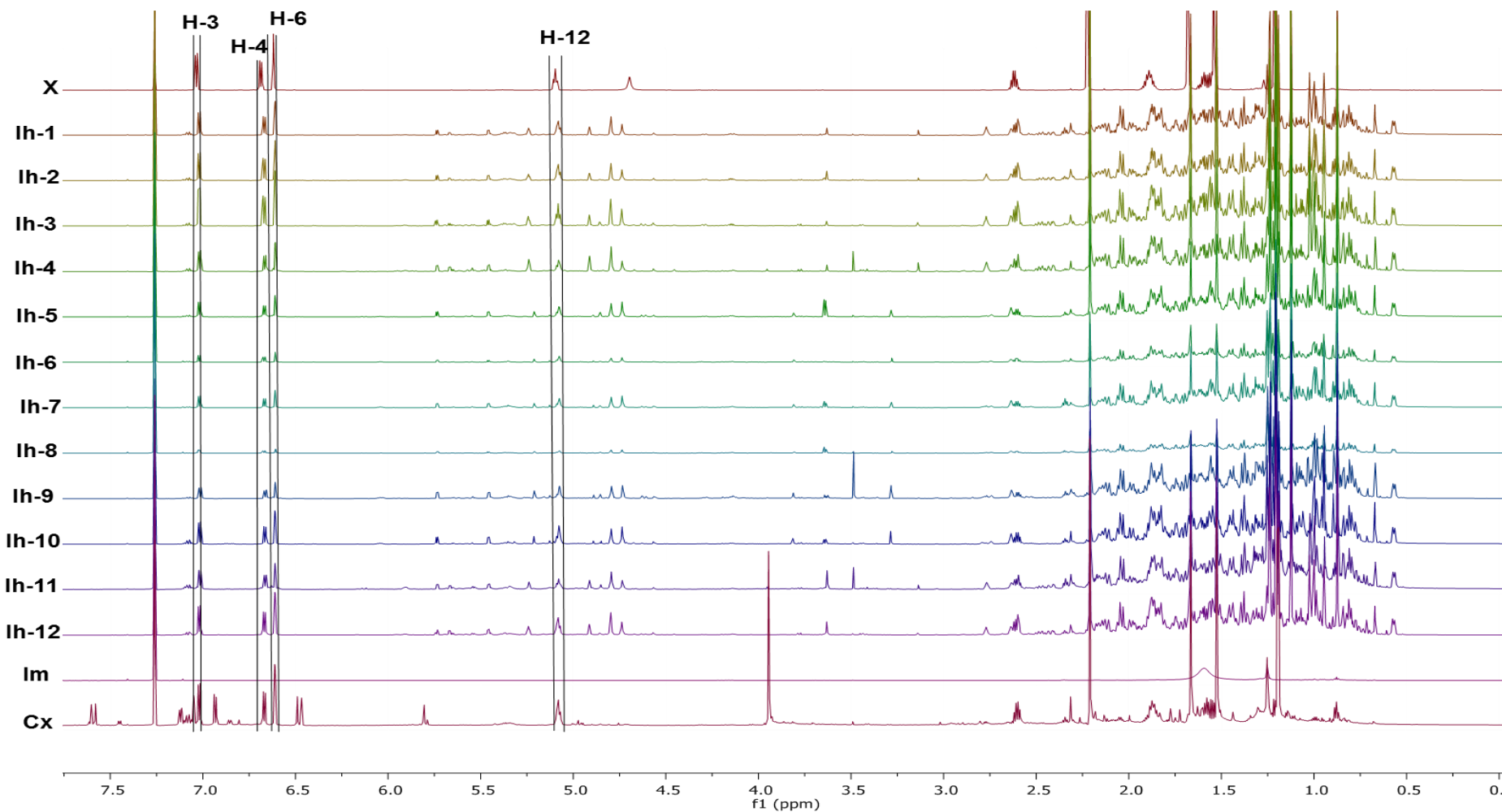


Figura 24. Comparación de los espectros de RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3 , 25°C) de todos los extractos de metanol de los lotes analizados. *I. heterophylla* (lh-1 a lh-12), *I. madrensis* (Im), *Curcuma xanthorrhiza* (Cx), Xantorrizol (X)

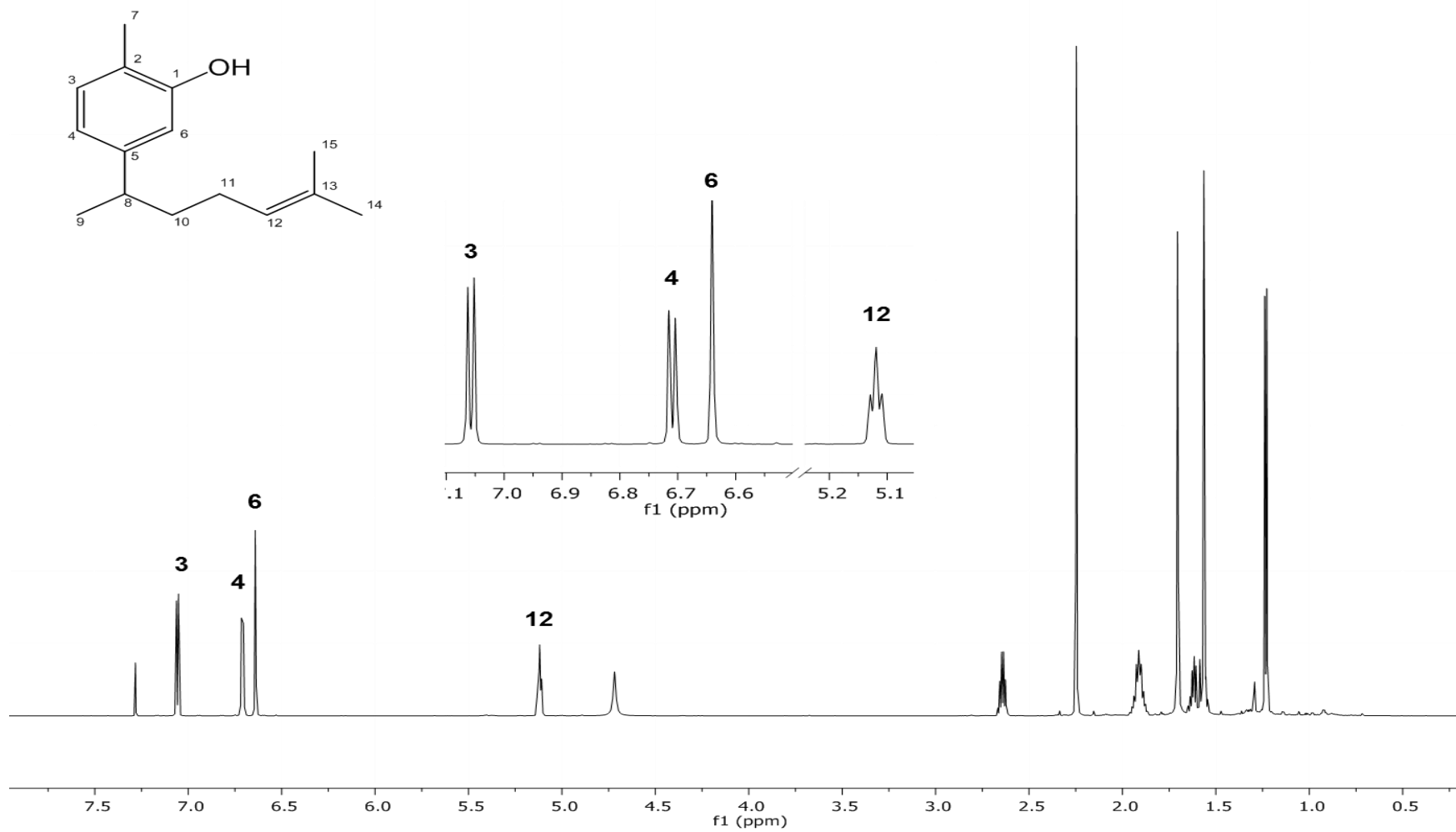


Figura 25. Espectro de RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃, 25°C) de la muestra de referencia, xantorrizol

5.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es definida como la mínima concentración del extracto de prueba que no permitió el desarrollo de las bacterias, que visualmente se interpreta como la ausencia de turbidez en el medio.

Staphylococcus aureus es una bacteria anaerobia facultativa, Gram positiva, es el principal causante de las infecciones nosocomiales, además de infecciones cutáneas y de las mucosas (Hurtado *et al.*, 2002).

Después de las 24 h de incubación, a cada pozo de la placa se le adicionó resazurina, el cual es un indicador de color azul que se reduce de forma irreversible a la resorufina de color rosa intenso. Se usa como indicador de oxidación-reducción en los ensayos de viabilidad celular para la respiración aerobia y anaerobia y éste nos permite observar con mayor claridad (Figura 26), si hubo crecimiento bacteriano, para la determinación de la CMI.

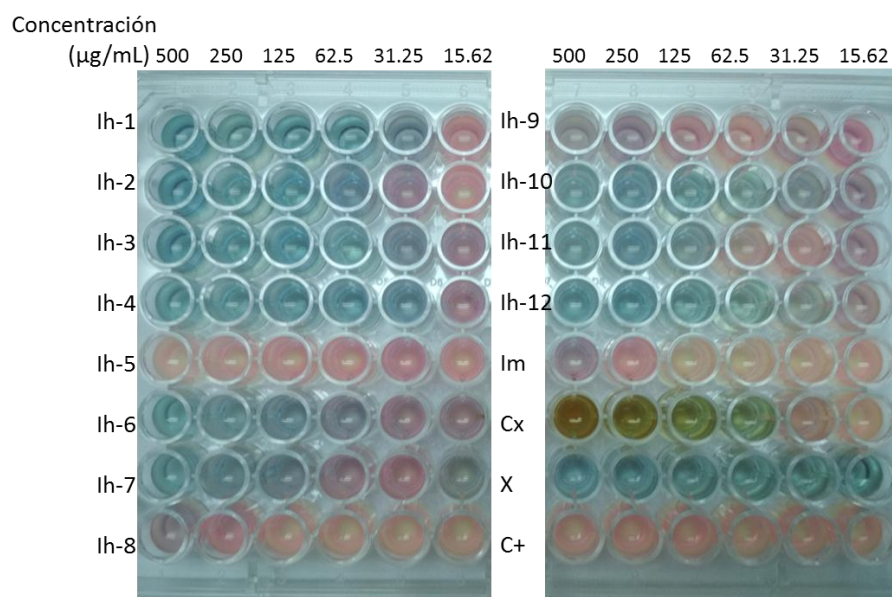


Figura 26. Multiplaca del ensayo para la determinación de la CMI. Tinción con resazurina. *Iostephane heterophylla* (lh1-lh12), *I. madrensis* (lm), *Curcuma xanthorrhiza* (Cx) y xantorrizol (X).

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se muestran en la Tabla 6, en donde se observa que las muestras lh-3 e lh-4, tienen valor de CMI 31.25 µg/mL, son originarias de Toluca, Edo. de México y a pesar de que su colecta es de años diferentes, sus resultados fueron semejantes, también muestran similitud en su concentración de fenoles totales.

En el caso de las muestras lh-5, lh-8 e lh-9 que tienen su origen en el Mercado Reforma, en Chihuahua, su CMI no fue determinada pero es mayor a los 500 µg/mL, este mismo resultado se tuvo para *I. madrensis*, cuyo origen es el mismo.

Para el xantorizol (1), la CMI es menor a 15.625 µg/mL; reportes previos en un extracto de CH₂Cl₂-MeOH (1:1) derivado de *I. heterophylla* mostraron una CMI de 16 µg/mL; este compuesto también fue probado *in vivo* y no proporcionó protección a los ratones infectados con cepas de *Staphylococcus aureus* (Mata *et al.*, 2001). A pesar de que algunos lotes de lh tienen el mismo origen, se encontraron diferencias muy evidentes en la respuesta en este bioensayo (Figura 26), esto también es multifactorial.

En pruebas de inhibición de crecimiento con *Streptococcus mutans*, para un extracto de cloroformo de *I. heterophylla*, se encontró una CMI de 77 µg/mL y para el xantorizol aislado de este extracto mostró una CMI de 4.1 µg/mL (Hernández, *et al.*, 2012).

Este tipo de ensayos son importantes ya que a medida que aumenta la prevalencia de una enfermedad, existe un gran interés por desarrollar preparados a base de productos naturales para nuevas terapias.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en las pruebas de cicatrización *in vitro* apoyan el uso tradicional de los preparados de *I. heterophylla*.

Se obtuvo nuevo conocimiento sobre los componentes volátiles de la raíz que no habían sido analizados con anterioridad.

Los ensayos de identidad y composición que se implementaron tuvieron buenos resultados y servirán como información adicional para asentarse dentro de las pruebas de control de calidad en la monografía existente de la droga.

7. PERSPECTIVAS

Continuar con el estudio químico de *Iostephane heterophylla* encaminado a la búsqueda de los metabolitos que promueven la cicatrización *in vitro*.

Evaluar los factores de crecimiento y producción de colágeno.

Realizar estudios de cicatrización en modelos *in vivo*.

Continuar con el estudio metabolómico de la droga cruda.

8. REFERENCIAS

- Adams, R., P. (2007) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry. 4th Edition. Biology Department. Baylor University.
- Adams, R., P. (2017) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry. 5th Edition. Biology Department. Baylor University.
- Aguilar, M., Delgado, G., Bye, R. and Linares, E. (1993) Bisabolene, polycyclic diterpenoids and other constituents from the roots of *Iostephane heterophylla*. *Phytochemistry*, 33, 1161-1163.
- Aguilar, M., Delgado, G. (1995) Novel bisabolene glycoside and others constituents from the medicinal plant *Iostephane heterophylla* (Asteraceae). *J. Natural Products*, 7. 155-162.
- Aguilar, M., Delgado, G., Hernández, M. L. and Villareal, M. L. (2001) Bioactive compounds from *Iostephane heterophylla* (Asteraceae). *Natural Products Letters*. 15, 93-101.
- Aguilar, M., Delgado, G. and Villarreal, M. L. (2001) New bioactive derivatives of xanthorrhizol. *Revista de la Sociedad Química de México*, 45, 56-59.
- Aguilar, M., Hersch, P., Bye, R., (2009) Monografía científica: Plantas Medicinales de México, Raíz de manso (*Iostephane heterophylla*). Sentido Giratorio Ediciones. México.
- Aguilar, M. I., Mejía, I. A., Menchaca, C., Vázquez I., Navarrete, A., Chávez, M. I., Reyes-García, A., Ríos-Gómez, R. (2013) Determination of Biflavonoids in Four Mexican Medicinal Species of *Selaginella* by HPLC". *Journal of AOAC International*. 96, 712-716.
- Ainsworth, E. A., Gillespie, K. (2007) Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc*. 2, 875-877.

- Amali Muhammad, A., Syarina-Pauzi, N. A., Arulselvan, P., Abas, F. and Fakurazi, S. (2013) *In Vitro* Wound Healing Potential and Identification of Bioactive Compounds from *Moringa oleifera* Lam. *BioMed Research International*. Article ID 974580, 10 pages.
- Annan, K. and Houghton, P. J. (2008) Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of aqueous extracts of *Ficus asperifolia* Miq. and *Gossypium arboreum* L., wound-healing plants of Ghana. *Journal of Ethnopharmacology*. 119, 141–144
- Anónimo. (2004). “Java tumeric extracts for microbial control”. *HerbalGram* 63:70.
- Arenas, R. Dermatología. (2015). 2ª Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. México.
- Argueta, A. (Coord). (1994) *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*. Tomo II: 772. México: Instituto Nacional Indigenista.
- Balekar, N., Katkam, N. G., Nakpheng, T., Jehtae, K., Srichana, T. (2012) Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. *Journal of Ethnopharmacology* .141, 817– 824
- Bandaranayake, W. M. (2006) Quality Control, Screening, Toxicity, and Regulation of Herbal Drugs. *Modern Phytomedine: Turning Medicinal Plants Into Drugs*. Ahmad, I. Aqil, F., Owais, M., (Editores). Wiley-VCH (Ed), Weinheim.
- Ballantyne, M. McCabe, P.H. y Murria, D. H. (1971) Claisen rearrangemensts-II. Synthesis of six natural coumarins. *Tetrahedron*, 27, 871.
- Barquero-Quirós, M., (2006). Principios y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases. 1ª. Edición. Editorial Universidad de Costa Rica, 28-30.
- Bentley, R. (1999) Secondary metabolite biosíntesis: the first century. *Crit. Rev. Biotechnol.* 19 (1): 1-40.
- Bernal, I. A., Osrio, N. (2007) Desarrollo y validación de un método por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para la cuantificación de xantorizol como compuesto marcador en la raíz medicinal de *Lontephane*

- heterophylla*. Aislamiento de un epoxi-sesquiterpenoide. Tesis de licenciatura. UNAM, México, D.F.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana.
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&i d=7577>. Fecha de consulta 15 de febrero 2018.
 - Bohlmann, F., Jakupovic, J., Ahmed, M., Schuster, A. (1993) Sesquiterpene lactones and other constituents from *Schistostephium* species. *Phytochemistry*. 22, 1623.
 - Booz, G., Baker, W. (1995) Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 30:527-543.
 - Boyko, T.V., Longaker, M. T., Yang, G. O. (2017). Laboratory models for the study of normal and pathologic wound healing. *Plastic and reconstructive Surgery*. 139 (3), 654-662.
 - Brusotti, G., Andreola, F., Sferrazza, G., Grisoli, P., Merelli, A., RobustellidellaCuna, F. S., Calleri, E., Nicotera, G., Pierimarchi, P., Serafino, A. (2015) In vitro evaluation of the wound healing activity of *Drypetes klainei* stem bark extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 175, 412–421.
 - Campos, M. G., Oropeza, M. V., Villanueva, T., Aguilar, M.I., Delgado, G., Ponce, H. A. (2000) Xanthorrhizol induces endothelium-independent relaxation of rat thoracic aorta. *Life Sciences*. 67,327-333.
 - Carson, C. F., Riley, T.V. (1994) Susceptibility of *Propionibacterium acnes* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Letters in applied Microbiology*. 19.
 - Castillo García, E., Martínez Solís I. Manual de fitoterapia. Editorial Elsevier. 2da. Edición.
 - Choi, S., Kim, M., Kim, C., Hwang, J. K., Kang, W. (2017) Quantitative determination of xanthorrhizol in rat plasma by HPLC–MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 132, 56–59
 - CLSI. (2006) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. *Supplement*. 100-S16.

- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., Maes, L. (2006) Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*. 106, 290–302.
- Dean, F. M. and Parton, B. (1969) The structure and synthesis of (+)-Obliquin. *J. Chem. Soc (C)*, 526.
- Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Ángeles-López, G. E., Navarrete, A., Mata, R. (2007) Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 110, 334-342.
- Delgado, G., Cano, A., Ruiz-Cancino, A., Bye, R., & Linares, E. (1994). Polycyclic diterpenes from the roots of *Iostephane madrensis*. *Planta Medica*, 60(05), 493–493.
- Dorland W. (2005). *Dorland's Diccionario enciclopédico ilustrado de Medicina*. 30ª ed. Elsevier. España.
- Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, 2ª edición, Secretaría de Salud, México, 2013.
- Fuganti, C. and Serra, S. (2000) Baker's yeast-mediated enantioselective synthesis of the bisabolane sesquiterpenes (+)-curcuphenol, (+)-xanthorrhizol, (-)-curcuquinone and (+)-curcuhydroquinone. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 3758–3764.
- Funk, V. A., Susanna, A., Stuessy, T. F., & Robinson, H. (2009). Classification of compositae. *Systematic, evolution and biogeography of Compositae*, 171-192.
- Gabbiani, G. (2003) The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*. 200:500-502.
- Garcia-Sánchez, C. A., Sánchez-González, A., & Villaseñor, J. L. (2014). La familia *Asteraceae* en el Parque Nacional Los Mármoles, Hidalgo, México. *Acta botánica mexicana*, (106), 97-116.
- Ghafourian, M., Tamri, P., Hemmati, A. (2015) Enhancement of Human Skin Fibroblasts Proliferation as a Result of Treating With Quince Seed Mucilage. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*. 10(1): e18820.

- Global Compositae Checklist.
<https://compositae.landcareresearch.co.nz/Default.aspx?Page=NameSearch&searchText=lostephane>. Fecha de consulta 17 de septiembre 2018.
- González-Bernardo E, Aguilar MI, Delgado G, King-Díaz B, Lotina-Hensen, B. (2003) Photosynthetic electron transport inyeraction of xanthorrhizol isolated from *lostephane heterophylla* and its derivaties. *Physiologia Plantarum*.119:598-604.
- Gothai, S., Arulselvan, P., Tan, W. S., Fakurazi, S. (2016) Wound healing properties of ethyl acetate fraction of *Moringa oleifera* in normal human dermal fibroblasts. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* .Vol 5.
- Greenhalgh, D. G. (1998) The role of apoptosis in wound healing. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30 (9):0119-1030.
- Henrick, C. K. y Jefferies, P.R. (1964) The Diterpenes of *Ricinocarpus stylosus* Diels. *Australian Journal of Chemistry*, 17, 915-933.
- Hernández, D. M., Díaz-Ruiz G., Rivero-Cruz, B. E., Bye, R. A., Aguilar, M. I., Rivero-Cruz, J. F. (2012) Ent-trachyloban-19-oic acid isolated from *lostephane heterophylla* as apromising antibacterial agent against *Streptococcus mutans* biofilms. *Fitoterapia* 83, 527–531.
- Hernández-Terrones, M. G., Aguilar, M. I., King-Díaz, B and Lotina-Hennsen, B. (2003) Inhibition of photosystem II in spinach chloroplasts by trachyloban-19-oic acid. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 77, 12-17.
- Hernández-Terrones, M. G., Aguilar, M. I., King-Díaz, B and Lotina-Hennsen, B. (2003) lterference of methyl trachyloban-19-oate ester with CF₀ of spinach chlosoplast H⁺-ATPase. *Archives of Biochemistry and Biopysics*. 418, 93-97-
- Hertz, W., Govindan, S. V. y Watanabe, K. (1982) Diterpenes of *Helianthus rigidus* y *H. salicifolius*. *Phytochemistry*, 22, 2021-2025.
- Hertz, W y Kulanthaivel, P. (1983) Ent-kauranes and trachylobanes from *Helianthus radula*. *Phytochemistry*, 22, 2543-2546.
- Huertado, M. P., Brito, A. (2002) *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *Rev Soc Ven Microbiol*. 22(2): 112-118.

- International Organization for Standardization (ISO 9235:1997) Aromatic natural materials.
- Itokawa, H., Hirrayama, F., Funakoshi, K., Takeya, K. (1985) Studies on the antitumor Bisabolane sesquiterpenoid isolated from *Curcuma zanthorriza*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 33, 3488.
- Jeffrey, C. (2007). *Compositae: Introduction with key to tribes*. Springer-Verlag. 61-87.
- Komarcević, A. (2000) The modern approach to wound treatment. *Med Pregl*. 53(7-8):363-368.
- Kumar, D. (2016) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy for Metabolic Profiling of Medicinal Plants and Their Products. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 46, 400-412.
- Kuwahara, R.T., and Rasberry, R. (2007) Chemical peels. Emedicine.com. September 15, 2018.
- Landi, B., Pace, B. and Conceição, A. O. (2018) Plants and their metabolites against *Streptococcus mutans*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 12, 278-288.
- Lansdown, A. B. G., Sampson, B., Rowe, A. (2001) Experimental observations in the rat on the influence of cadmium on skin wound repair. *International Journal of Experimental Pathology*, 82 (1):35-41.
- Li, S., Han, Q., Qiao, C., Song, J., Cheng, C., Xu, H. (2008) Chemical markers for the quality control of herbal medicines an overview. *Chinise Medicine*, 3, 1-6.
- Maga, G., Húbscher, U. (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partner. *J Cell Sci*. 2003 116(15):3051-3060.
- Marín-Loaiza, J. C., Céspedes, C. L. (2007) Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. *Rev. Fitotec. Mex*. 30 (4): 327-251.
- Martínez, M., (1996) *Las Plantas Medicinales de México*. 6ª. Ed. Editorial Botas, México, pp. 279-2805.

- Mata, R., Bye, R., Morales, G., et al. (2001) Biological and mechanistic activities of xanthorrhizol and 4-(1', 5'-Dimethylhex-4'-enyl)-2-methylphenol Isolated from *Iostephane heterophylla*. *J. natural Products*. 64, 911-914.
- Mohd-Salleh, N. A., Ismail, S., Ab-Halim, M. R. (2016) Effects of *Curcuma xanthorrhiza* extracts and their constituents on Phase II Drug-metabolizing Enzymes Activity. *Pharmacognosy Res.* 8 (4): 309-315.
- National Institute of Standards Technologues. <http://www.nist.gov> [on line]. Consulted on Julio, 27, 2018
- Oberti, J. C., Pomilio, B. Y Gros, E. (1980) Diterpene and sterols from *Wedelia glauca*. *Phytochemistry*, 19, 1051-1052.
- OMS (2011) Quality control methods for herbal materails. Updated edition of Quality control mmethods for medicinal plant materials, 1998. WHO Press, Geneva, p 187.
- Oon, S. F., Nallappan, M., Tee, T. T., Shohaimi, S., Kassim, N. K., Sa'ariwijaya, M. S. F. and Cheah, Y. H. (2015) Xanthorrhizol: a review of its pharmacological activities and anticancer properties. *Cancer Cell Int*, 15:100.
- Pes, I., Suntar, I., Kupeli-Akkola, E., Nuray-Yalc, F., Koca, U., Keles, H., Yesilada, E. (2010) Wound healing potential of *Sambucus ebulus* L. leaves and isolation of an active component, quercetin 3-O-glucoside. *Journal of Ethnopharmacology* .129, 106–114.
- Ponce-Monter, H., Campos, M. G., Aguilar, I. and Delgado, G. (1999) Effect of Xanthorrhizol, Xanthorrhizol Glycoside and Trachylobanoic Acid Isolated from Cachani Complex Plants upon the Contractile Activity of Uterine Smooth Muscle. *Phytotherapy research*. 13, 202–205.
- Pyrek, J. (1970) New pentacyclic diterpene acid. Trachyloban-19-oic from sunflower. *Tetrahedron*, 26, 5029-5032.
- Reinke, J. M., Sorg, H. (2012) Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*. 49 (1), 35-43.
- Rimpler, H., Hansel, R y Kochendoerfer, L. (1970) Xanthorrhizol, ein neues sesquiterpen aus *Curcuma xanthorrhiza*. *Z. Naturforsch.* 25B, 995.

- Romo, T. and Pearson, J. M. (2005) Wound healing, Skin. Emedicine.com. Accessed Julio 27, 2018.
- Sandoval, E., Bye, R., Ríos, G. and Aguilar, M. I. (2005) Microscopic analysis and histochemical observations of the medicinal root of *Iostephane heterophylla* (Cav.) Benth (Asteraceae). *Bol.Soc.Bot.Méx.* 77, 65-73.
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., Jacobo-Velázquez, D. (2013) The folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods*, 5, 5990.
- Shafizadeh, F. y Melnikoff, A. B. (1970) Coumarins of *Artemisia tridentate* ssp vaseyana. *Phytochemistry*, 9, 1311-1316.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Ravents, R. M. (1998) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.
- Sirat, H. M., Hong, N. M. and Jauri, M. H., (2007) Chemistry of xanthorrhizol: synthesis of several bisabolane sesquiterpenoids from xanthorrhizol. *Tetrahedron Letters.* 48, 457–460.
- Spyrou, G., E. and I. L. Naylor. (2002) The effect of basic fibroblast growth factor on scarring. *British Journal of Plastic Surgery.* 55, 275-282.
- Stadelmann, W. K., Digenis, A. G. and Tobin, G. R. (1998) Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *The American Journal of Surgery.* 176 (2):26S-38S.
- Steenkamp V., Mathivha, E., Gouws, M.C., Van Rensburg, C., E., J. (2004) Studies on antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of wound healing remedies from South Africa. *Journal of Ethnopharmacology.* 95, 353–357.
- US Patent 6696404 (2004) <https://patentimages.storage.googleapis.com/a1/10/10/e15af77fd51e9c/US6696404.pdf> United States Patent . Fecha de consulta: 14 de Septiembre de 2018

- Zippel, J., Deters, A., Hensel, A. (2009) Arabinogalactans from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret bark as active principles for wound-healing properties: Specific enhancement of dermal fibroblast activity and minor influence on HaCaT keratinocytes. *Jurnal of Ethnopharmacology* . 124, 391–396.

9. ANEXO

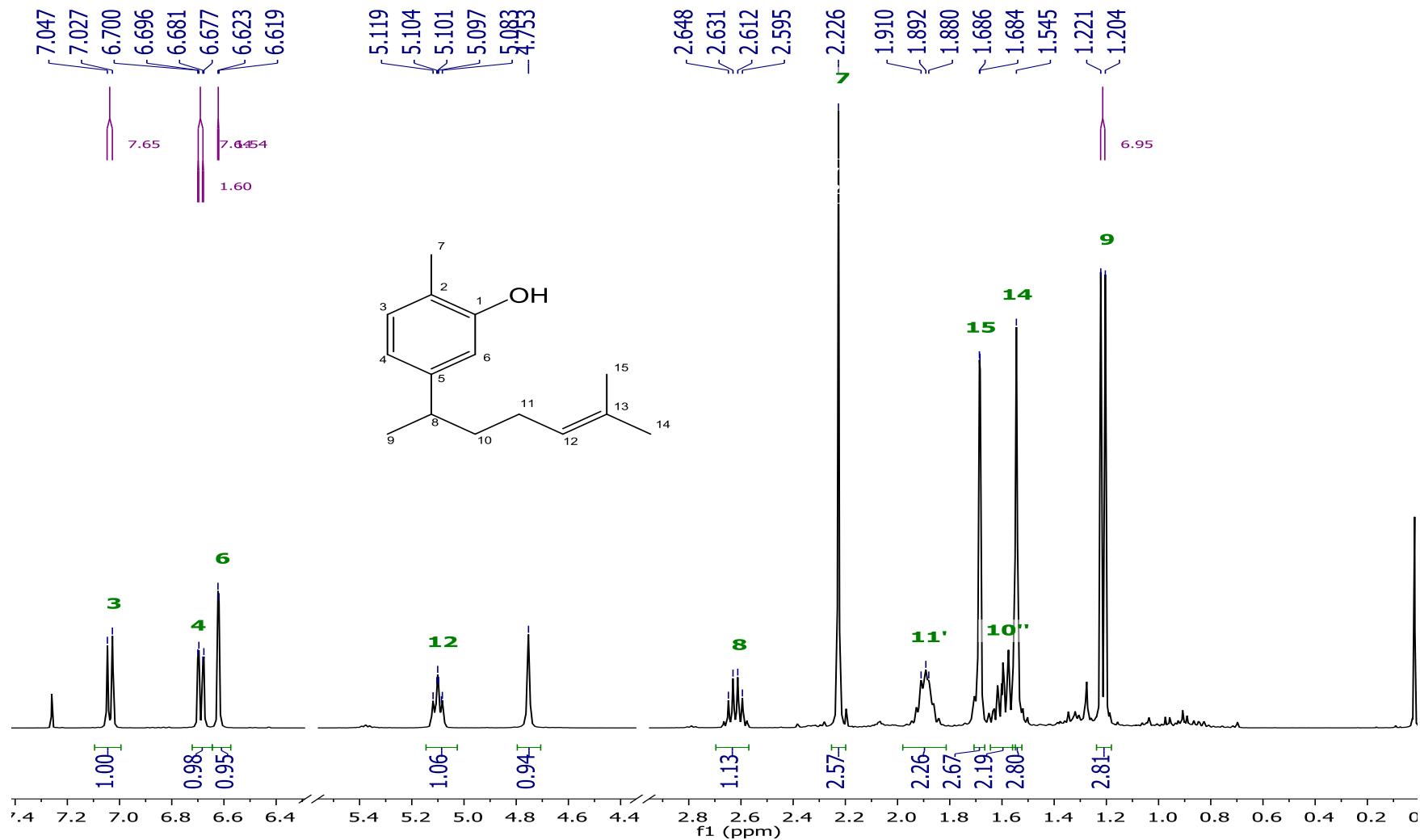


Figura 21. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del xantorrizol.

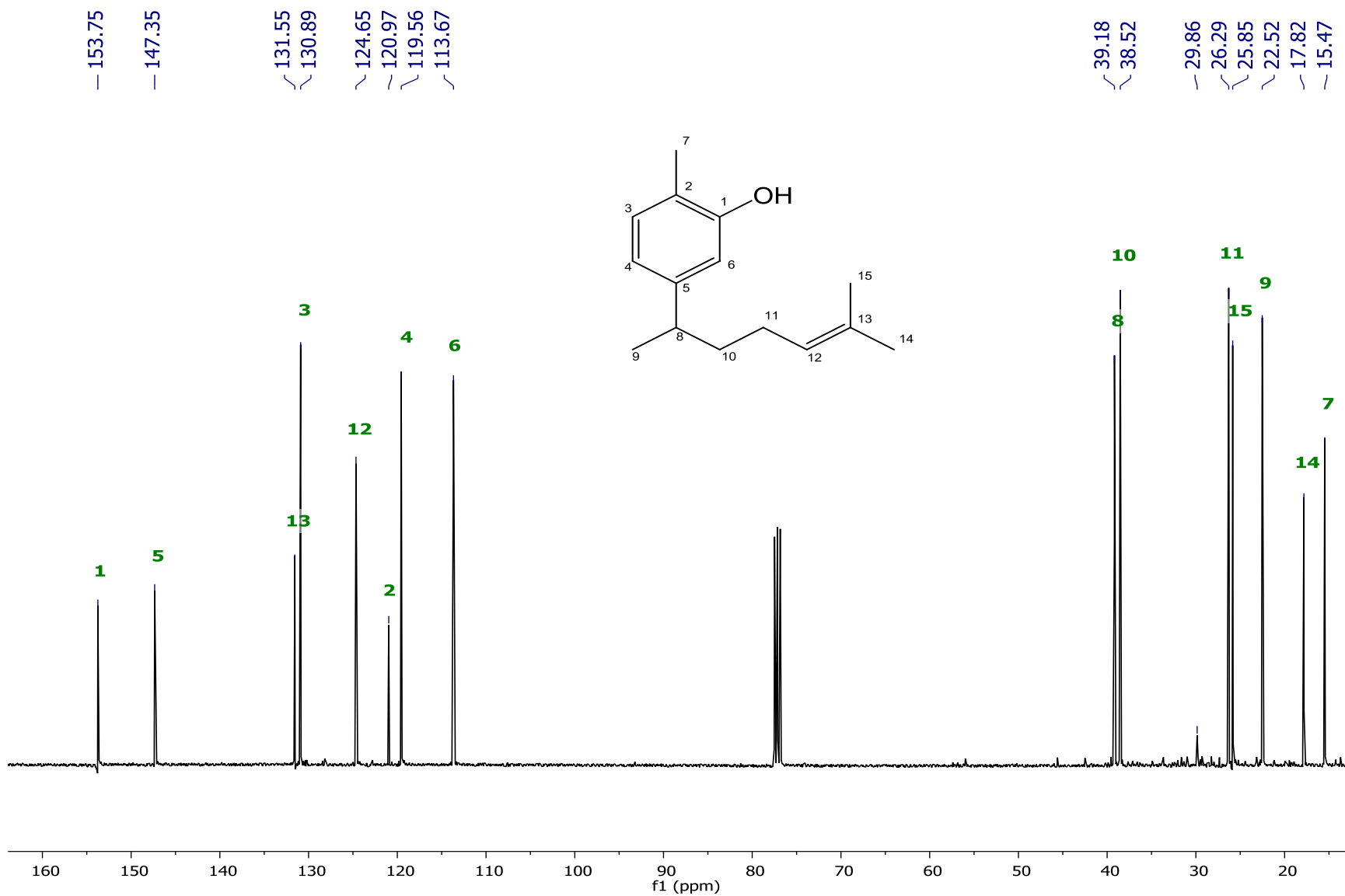


Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del xantorrizol.

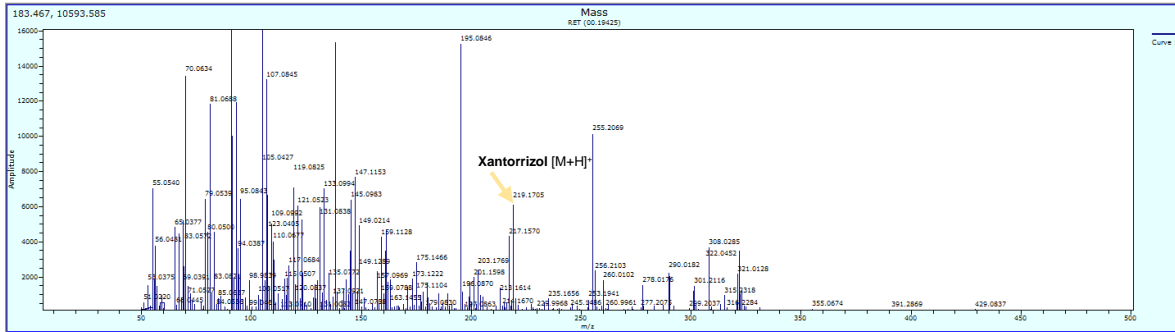


Figura 27. Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol Ih-1.

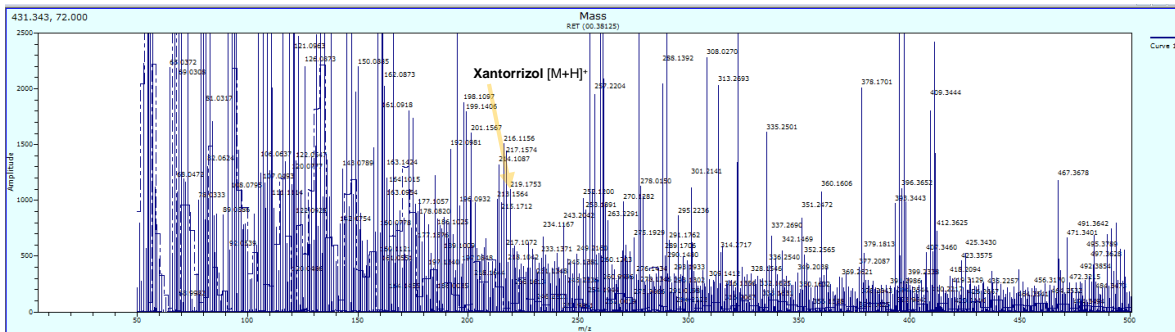


Figura 28. Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol Ih-2.

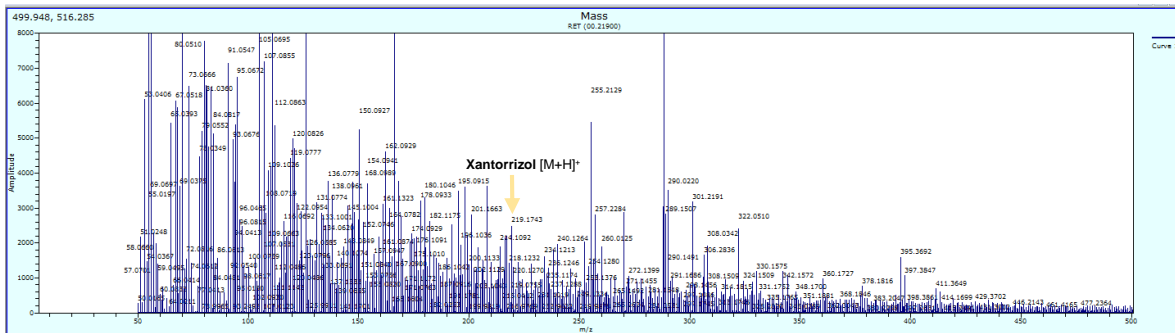


Figura 29. Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol Ih-3.

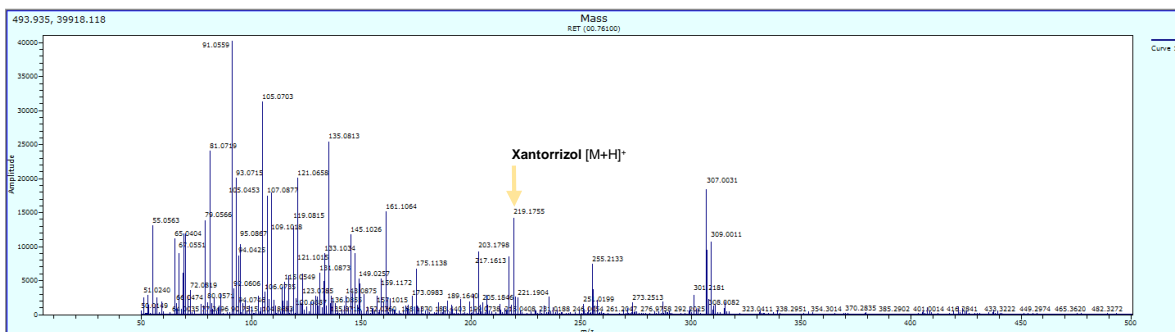


Figura 30. Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol Ih-4.

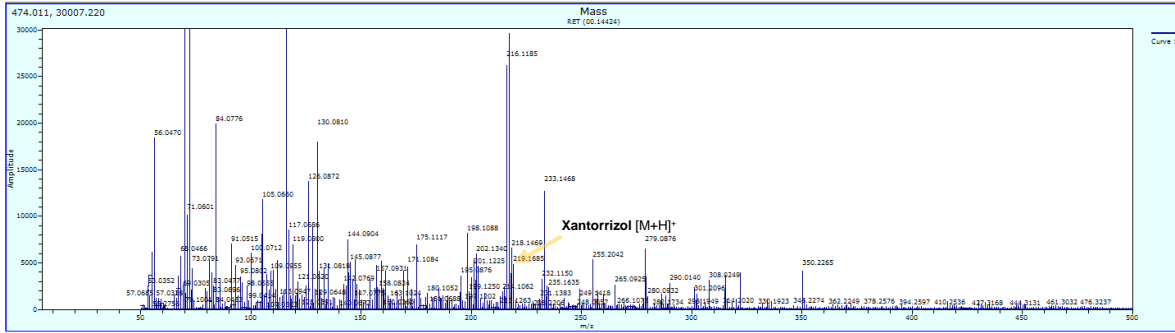


Figura 31. Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol lh-5.

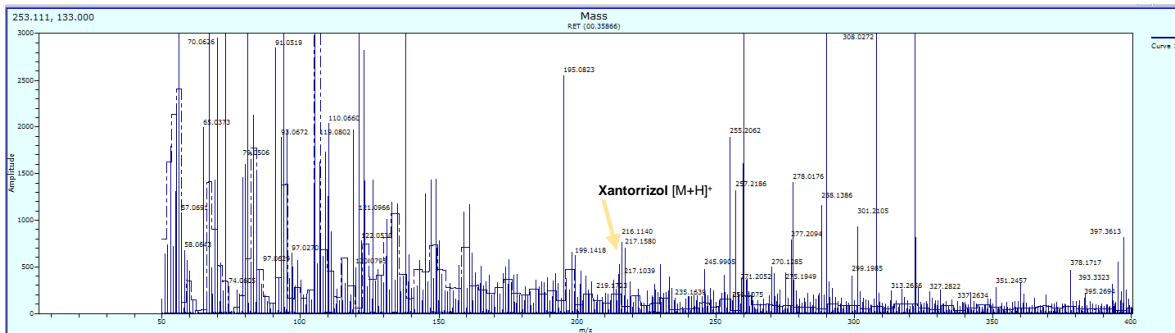


Figura 32. Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol lh-6.

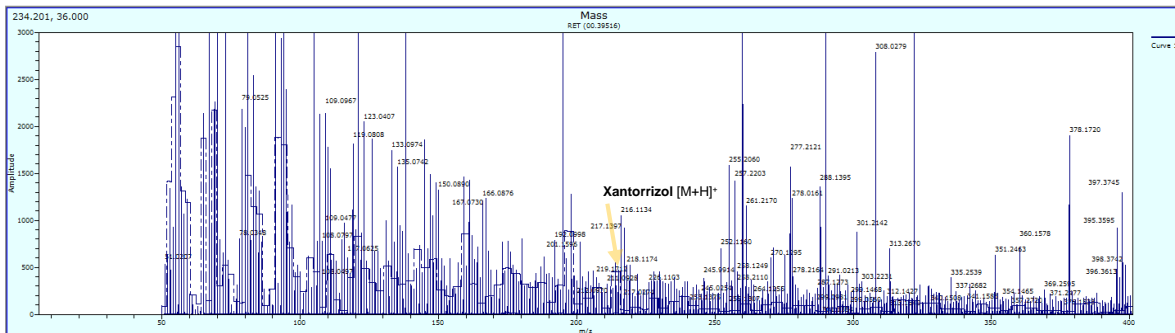


Figura 33. Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol lh-7.

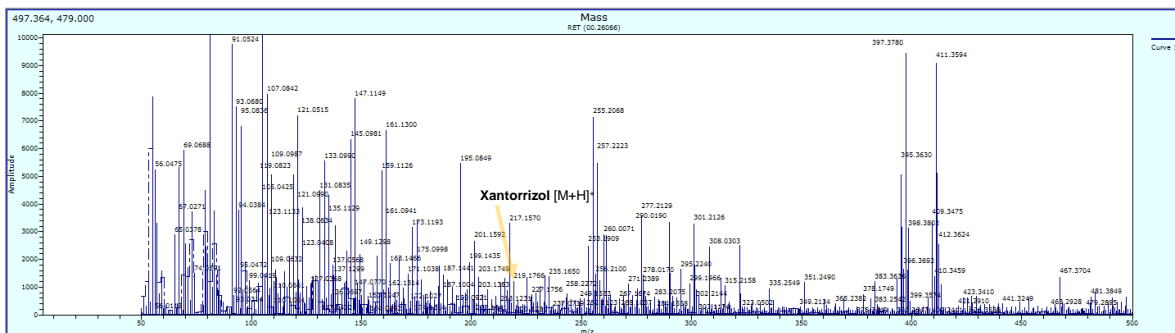


Figura 34. Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol lh-8.

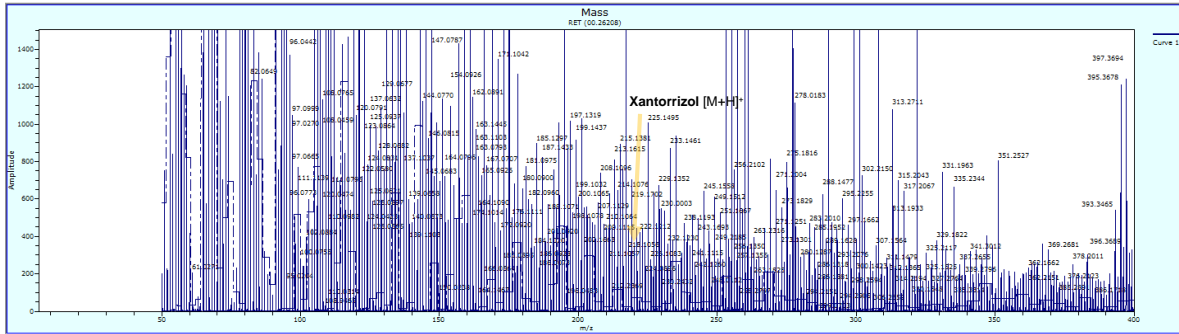


Figura 35. Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol Ih-9.

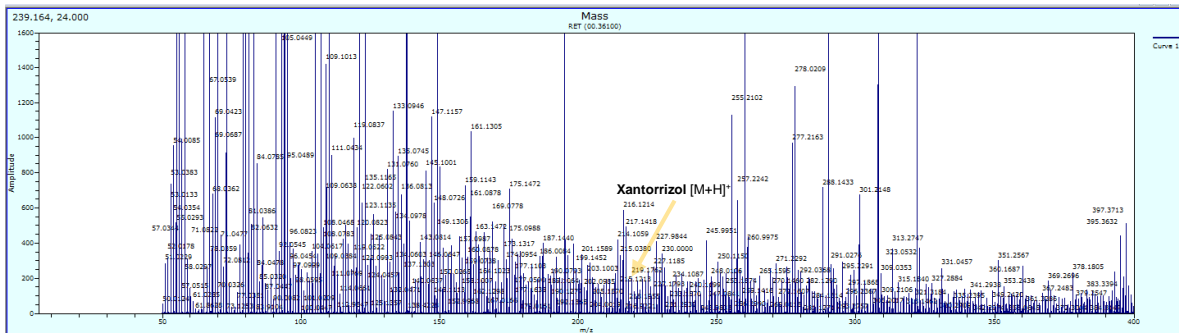


Figura 36. Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol Ih-10.

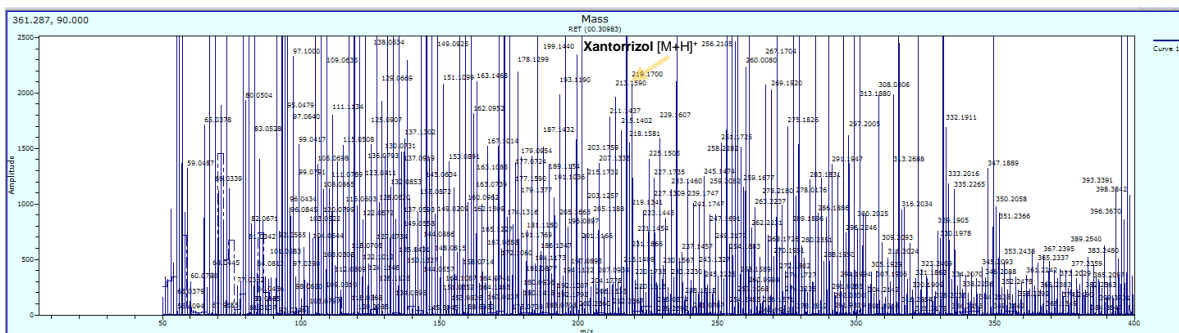


Figura 37. Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol Ih-11.

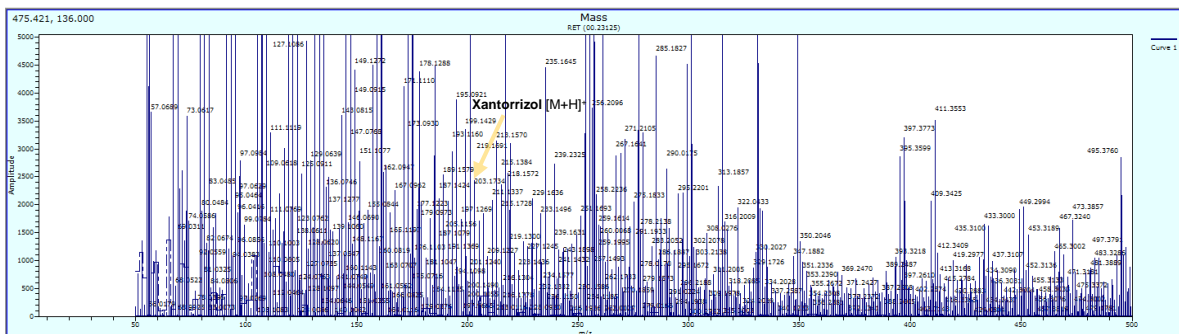


Figura 38. Espectro de masas en modo positivo del extracto de metanol Ih-12.

