



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTE Y CICATRIZANTE DE
ALGUNAS PLANTAS MEDICINALES UTILIZADAS EN EL VALLE DE
TEHUACÁN-CUICATLÁN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biól. NALLELY ÁLVAREZ SANTOS

TUTOR PRINCIPAL: DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

DR. CESAR M. FLORES ORTIZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

México, Ciudad de México, enero del 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

OFICIO CPCB/1158/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 29 de octubre de 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ALVAREZ SANTOS NALLELY**, con número de cuenta 99012643, con la tesis titulada "**Evaluación de las propiedades antioxidante y cicatrizante de algunas plantas medicinales utilizadas en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán.**", realizada bajo la dirección de la **DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES**:

Presidente: DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ
Secretario: DR. CÉSAR MATEO FLORES ORTÍZ
Suplente: DRA. SILVIA AGUILAR RODRÍGUEZ
Suplente: DRA. DIANA BARRERA OVIEDO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 29 de noviembre de 2018.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por su apoyo académico durante mis estudios de Posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme la beca económica que me permitió concluir esta etapa de mi desarrollo profesional (No. CVU: 775307).

Al proyecto UNAM DGAPA PAPIIT IN215017 por el financiamiento y apoyo para la realización de este trabajo.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por la beca económica de tesis de posgrado (Folio: 18BTM0028).

A los miembros del Comité Tutor: Dra. Patricia Guevara Fefer y Dr. Cesar Mateo Flores Ortiz y especialmente a mi Tutora: Dra. Ana María García Bores, ya que sin ellos habría sido imposible la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Primero quiero agradecerle a mi querida madre académica Ana María, quien no solo ha sido mi guía durante todo el tiempo del posgrado, también es mi ejemplo, consejera y un gran impulso para seguir adelante. Siempre con un abrazo y consejos mejoró los días más difíciles. Podría asegurar que incluso me ayudo a ser mejor persona. Si existen los ángeles, seguramente usted es uno de ellos. Gracias por estar a mi lado.

A mi querida amiga Mon gracias por hacerme reír tanto, por los consejos académicos y personales, por las locuras, por estar siempre ahí y por todo el apoyo que me has dado, te quiero mi Mon.

Aketzalli mi hermanita académica y gran amiga, gracias por todos los abrazos dados, las risas y por siempre tener tiempo para escucharme. Te quiero mucho.

A Yvonne, Sayra, Capullito, Erick, Ari, Estrella, Morgan, Omar, Kevin, Alma y Fer, gracias por hacer tan divertidos estos dos años y por hacer más llevaderos estos últimos meses. Con su compañía me ayudaron a sanar más rápido.

A mi familia gracias por todo el apoyo. Alicia gracias por ayudarme, estar siempre a mi lado y por todo lo que se me pueda estar olvidando, te amo hermanita. Ángel gracias por estar, por ser mi mayor orgullo, mi siempre e inmejorable regalo de cumpleaños, te amo hermanito. Lilit gracias por ser mi mayor impulso para ser mejor persona y tratar de mostrarte que las mujeres somos mucho más de lo que se espera de nosotras. Mami te amo gracias por todo el apoyo, los consejos, el apapacho, estar a mi lado, por todos los sacrificios que hiciste para que yo llegara aquí y por ser el principal ejemplo de lo que logra una mujer cuando se lo propone, esto no hubiera sido posible sin ti.

A toda mi familia que yo elegí, gracias por estar en las buenas y en las malas. Flor, Ximena, Bere, Diana y Liz mis indispensables, las que siempre acuden al llamado, las que no necesitan explicaciones solo con verme entienden que pasa, gracias por todo, no lo habría logrado sin ustedes. Marco, Karla, Jessica, Arturo, Flaca, Brenda y Quique, gracias por estar a mi lado y apoyarme en todo momento. A mis adorados Roberto y Wen gracias por darme los momentos de júbilo necesarios para sobrevivir al posgrado, por siempre sonsacarme y hacerme sentir viva.

A todos los que ya no están. Gracias, siempre estarán en mi corazón.

DEDICATORIA

A todas las personas que se dedicaron o dieron la vida por la ciencia. Pero, principalmente a aquellas mujeres que fueron el parteaguas en una época en la que las mujeres aún eran invisibles.

“Nunca he creído que por ser mujer deba merecer tratos especiales. De creerlo estaría reconociendo que soy inferior a los hombres y yo no soy inferior a ninguno de ellos”.

Marie Curie (1867-1934)

ÍNDICE

Índice de contenido	I
Lista de tablas	IV
Lista de figuras	VI
Índice de abreviaturas	VIII
Resumen	1
Abstract	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Descripción botánica	12
1.2. Planteamiento del problema	15
2. HIPÓTESIS	16
3. OBJETIVOS	17
4. ANTECEDENTES	18
4.1. <i>Viguiera dentata</i> (Cav.) Sprengel (Chimalacate)	18
4.1.1. Etnobotánica	18
4.1.2. Actividades biológicas	18
4.1.3. Composición química de <i>V. dentata</i>	19
4.2. <i>Acalypha monostachya</i> Cav. (Hierba del pastor)	19
4.2.1. Etnobotánica	19
4.2.2. Actividades biológicas	20
4.2.3. Compuestos químicos reportados del género <i>Acalypha</i>	20
4.3. <i>Verbesina crocata</i> (Cav.) Less (Arnica)	22
4.3.1. Etnobotánica	22
4.3.2. Actividades biológicas	22
4.3.3. Compuestos químicos reportados para el género <i>Verbesina</i>	23
5. METODOLOGÍA	25
5.1. Metodología en general	25
5.2. Material vegetal, extractos y sus fracciones	26
5.3. Caracterización fitoquímica de los extractos y las fracciones	26
5.3.1. Detección preliminar de los principales grupos de metabolitos por pruebas colorimétricas	26
5.3.2. Análisis químico de las FHex por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)	27
5.3.3. Análisis químico de los Cru y las FMeOH por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	27
5.3.3.1. Análisis químico de los Cru y las FMeOH por HPLC (DAD-UV)	27
5.3.3.2. Análisis químico de los Cru y las FMeOH por HPLC (TOF LC/EM)	28
5.4. Actividades evaluadas	28
5.4.1. Evaluación de la actividad antioxidante de los Cru y las FMeOH sobre el radical DPPH	28
5.4.2. Cuantificación de fenoles totales (Folin-Ciocalteu) de los Cru y las FMeOH	29
5.4.3. Actividad cicatrizante de los extractos crudos de <i>V. dentata</i> , <i>A. monostachya</i> y <i>V. crocata</i>	30

5.4.3.1. Método del tensiómetro y cierre total de la herida	30
5.4.3.2. Análisis histológico	31
5.5. Análisis estadístico	33
6. RESULTADOS	34
6.1. Material vegetal y extractos	34
6.2. Caracterización fitoquímica de los Cru, FMeOH y FHex	35
6.2.1. Detección preliminar de los principales grupos de metabolitos secundarios por pruebas colorimétricas	35
6.2.1.1. <i>V. dentata</i>	35
6.2.1.2. <i>A. monostachya</i>	36
6.2.1.3. <i>V. crocata</i>	36
6.2.2. Análisis químico de las FHex por CG/EM	37
6.2.2.1. Compuestos de la FHex de <i>V. dentata</i> detectados por CG/EM	37
6.2.2.2. Compuestos de la FHex de <i>A. monostachya</i> detectados por CG/EM	38
6.2.2.3. Compuestos de la FHex de <i>V. crocata</i> detectados por CG/EM	38
6.2.3. Análisis químico de los Cru y las FMeOH por HPLC	39
6.2.3.1. Análisis químico de los Cru y las FMeOH por HPLC-DAD-UV	39
6.2.3.1.1. Compuestos detectados en la FMeOH de <i>V. dentata</i> por HPLC-DAD-UV	39
6.2.3.1.2. Compuestos detectados en Cru de <i>V. dentata</i> por HPLC-DAD-UV	40
6.2.3.1.3. Compuestos detectados en FMeOH de <i>A. monostachya</i> por HPLC-DAD-UV	40
6.2.3.1.4. Compuestos detectados en el Cru de <i>A. monostachya</i> por HPLC-DAD-UV	41
6.2.3.1.5. Compuestos detectados en la FMeOH de <i>V. crocata</i> por HPLC-DAD-UV	42
6.2.3.1.6. Compuestos detectados en el Cru de <i>V. crocata</i> por HPLC-DAD-UV	43
6.2.3.2. Compuestos detectados en los Cru y las FMeOH por HPLC/EM	44
6.2.3.2.1. Compuestos detectados en la FMeOH de <i>V. dentata</i> por HPLC/EM	44
6.2.3.2.2. Compuestos detectados en el Cru de <i>V. dentata</i> por HPLC/EM	44
6.2.3.2.3. Compuestos detectados en la FMeOH de <i>A. monostachya</i> por HPLC/EM	45
6.2.3.2.4. Compuestos detectados en el Cru de <i>A. monostachya</i> por HPLC/MS	46
6.2.3.2.5. Compuestos detectados en la FMeOH de <i>V. crocata</i> por HPLC/EM	47
6.2.3.2.6. Compuestos detectados en el Cru de <i>V. crocata</i> por HPLC/EM	47
6.3. Actividad antioxidante de los Cru y de las FMeOH por el método DPPH	48
6.3.1. Actividad antioxidante del Cru y la FMeOH de <i>V. dentata</i>	48
6.3.2. Actividad antioxidante del Cru y la FMeOH de <i>A. monostachya</i>	49
6.3.3. Actividad antioxidante del Cru y la FMeOH de <i>V. crocata</i>	50
6.4. Cuantificación de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu de los Cru y las FMeOH de <i>V. dentata</i> , <i>A. monostachya</i> y <i>V. crocata</i>	50

6.5. Comparativo de la actividad antioxidante y cuantificación de fenoles totales entre especies	52
6.6. Actividad cicatrizante	53
6.6.1. Método tensiométrico	53
6.6.2. Velocidad y días para el cierre total de la herida	54
6.6.3. Resumen de los resultados de las pruebas físicas de cicatrización	55
6.6.4. Análisis histológico	58
6.6.4.1. Análisis histológico de las heridas en la piel de ratones tratadas de manera tópica con Vaselina (C-)	60
6.6.4.2. Análisis histológico de las heridas en la piel de ratones tratadas de manera tópica con Recoverón® (C+)	62
6.6.4.3. Análisis histológico de las heridas en la piel de ratones tratadas de manera tópica con <i>V. dentata</i>	64
6.6.4.4. Análisis histológico de las heridas en la piel de ratones tratadas de manera tópica con <i>A. monostachya</i>	66
6.6.4.5. Análisis histológico de las heridas en la piel de ratones tratadas de manera tópica con <i>V. crocata</i>	68
6.6.4.6. Comparación del análisis histológico de los diferentes tratamientos	70
7. DISCUSIÓN	73
7.1. <i>V. dentata</i>	73
7.2. <i>A. monostachya</i>	78
7.3. <i>V. crocata</i>	84
7.4. Comparativo de las tres plantas y los controles	87
8. CONCLUSIONES	90
9. LITERATURA CITADA	92

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Estudios etnobotánicos de <i>V. dentata</i>	18
2.	Investigaciones de las actividades biológicas de <i>V. dentata</i>	18
3.	Compuestos identificados hasta el momento en <i>V. dentata</i>	19
4.	Estudios etnobotánicos de <i>A. monostachya</i>	19
5.	Investigaciones de las actividades biológicas de <i>A. monostachya</i>	20
6.	Compuestos identificados hasta el momento en el género <i>Acalypha</i>	21
7.	Estudios etnobotánicos de <i>V. crocata</i>	22
8.	Investigaciones de las actividades biológicas de <i>V. crocata</i>	23
9.	Compuestos identificados hasta el momento en el género <i>Verbesina</i>	24
10.	Pruebas de detección de los principales grupos de metabolitos secundarios	27
11.	Características utilizadas para el diagnóstico histológico	33
12.	Datos de las plantas registradas en el Herbario IZTA de la FES-Iztacala	34
13.	Peso del extracto y rendimientos de los Cru, FMeOH y FHex. Se determinó el porcentaje con respecto al peso seco	34
14.	Reacciones colorimétricas del Cru, FHex y FMeOH de <i>V. dentata</i>	35
15.	Reacciones colorimétricas del Cru, FHex y FMeOH de <i>A. monostachya</i>	36
16.	Reacciones colorimétricas del Cru, FHex y FMeOH de <i>V. crocata</i>	37
17.	Compuestos detectados por CG/EM en la FHex de <i>V. dentata</i>	38
18.	Compuestos detectados por CG/EM en la FHex de <i>A. monostachya</i>	38
19.	Compuestos detectados por CG/EM en la FHex de <i>V. crocata</i>	38
20.	Compuestos detectados por HPLC-DAD-UV en la FMeOH de <i>V. dentata</i> por su λ_{max}	39
21.	Compuestos detectados por HPLC-DAD-UV en el Cru de <i>V. dentata</i> por su λ_{max}	40
22.	Compuestos detectados por HPLC-DAD-UV en la FMeOH de <i>A. monostachya</i> por su λ_{max}	41
23.	Compuestos detectados por HPLC-DAD-UV en el Cru de <i>A. monostachya</i> por su λ_{max}	42
24.	Compuestos detectados por HPLC-DAD-UV en la FMeOH <i>V. crocata</i> por su λ_{max}	42
25.	Compuestos detectados por HPLC-DAD-UV en el Cru <i>V. crocata</i> por su λ_{max}	43
26.	Compuestos detectados por HPLC-ESI ⁻ -TOF-MS en la FMeOH de <i>V. dentata</i> por la masa del ion molecular	44
27.	Compuestos detectados por HPLC-ESI ⁻ -TOF-MS en el Cru de <i>V. dentata</i> por la masa del ion molecular	45
28.	Compuestos detectados por HPLC-ESI ⁻ -TOF-MS en la FMeOH de <i>A. monostachya</i> por la masa del ion molecular	46
29.	Compuestos detectados por HPLC-ESI ⁻ -TOF-MS en el Cru de <i>A. monostachya</i> por la masa del ion molecular	46
30.	Compuestos detectados por HPLC-ESI ⁻ -TOF-MS en la FMeOH de <i>V. crocata</i> por la masa del ion molecular	47
31.	Compuestos detectados por HPLC-ESI ⁻ -TOF-MS en el Cru de <i>V. crocata</i> por la masa del ion molecular	48

32.	Relación de la capacidad antioxidante con la cuantificación de fenoles totales en los extractos y las fracciones de <i>V. crocata</i> , <i>A. monostachya</i> y <i>V. dentata</i>	53
33.	Resumen de los resultados de las evaluaciones físicas, con los tratamientos: Vaselina, Recoverón®, <i>V. dentata</i> , <i>A. monostachya</i> y <i>V. crocata</i> . En modelo de ratones CD-1. n=5	56
34.	Resumen del análisis histológico en las secciones analizadas de la piel de los ratones a los que se les aplicó de manera tópica los diferentes tratamientos y piel intacta. n=5	71

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Metodología en general	25
2. Montaje en parafina para obtener la parte distal y media de la herida. A=parte distal y B=parte media	32
3. Comparación de la actividad antioxidante de <i>V. dentata</i> del Cru, FMeOH y el control positivo Quercetina. CA ₅₀ =Capacidad antioxidante media, Crudo=extracto crudo, FMeOH=fracción metanólica y Quercetina=control positivo. Promedio de ocho repeticiones con tres experimentos independientes	49
4. Comparación de la actividad antioxidante de <i>A. monostachya</i> del Cru, de la FMeOH y el control positivo Quercetina. CA ₅₀ =Capacidad antioxidante media, Crudo=extracto crudo, FMeOH=fracción metanólica y Quercetina=control positivo. Promedio de ocho repeticiones con tres experimentos independientes	49
5. Comparación de la actividad antioxidante de <i>V. crocata</i> del Cru, de la FMeOH y el control positivo Quercetina. CA ₅₀ =Capacidad antioxidante media, Crudo=extracto crudo, FMeOH=fracción metanólica y Quercetina=control positivo. Promedio de ocho repeticiones con tres experimentos independientes	50
6. Curva patrón a diferentes concentraciones de ácido gálico, para la cuantificación de los fenoles totales en la muestra y obtener los mg de equivalentes de ácido gálico/g de extracto	51
7. Cuantificación de fenoles totales de los extractos crudos y las FMeOH de las plantas <i>V. dentata</i> , <i>A. monostachya</i> y <i>V. crocata</i> . Promedio de tres repeticiones ± Desviación estándar	52
8. Actividad cicatrizante evaluada mediante el método tensiométrico donde la fuerza de tensión se midió en gramos con los diferentes tratamientos: Vaselina, Recoverón®, <i>V. dentata</i> , <i>A. monostachya</i> y <i>V. crocata</i> . n=5	54
9. Actividad cicatrizante por velocidad del cierre de la herida (VCH) obtenida mediante la longitud de la herida (mm) por 15 días de tratamiento. Los diferentes grupos experimentales: Vaselina, Recoverón®, <i>V. dentata</i> , <i>A. monostachya</i> y <i>V. crocata</i> . Diferencias significativas * (p<0.05). n=10	55
10. Proceso de cierre de las heridas a diferentes días de los tratamientos	57
11. Micrografía de piel intacta de ratón CD-1. Epidermis (E), dermis papilar (DP), dermis reticular (DR), glándula sebácea (GS), pelo (P), hipodermis (HD) y músculo (M). Note la organización paralela de las fibras de colágena (C) y una población homogénea de fibroblastos (F). Tinción HE. Aumento real 100X	58
12. Micrografías de pieles de ratón tratados con la aplicación tópica de Vaselina. A) y B) Contracción en la ZCH; C) y D) Epidermis en la ZCH; E) y F) Tejido de granulación; G) Cambio del colágeno en la zona adyacente a la ZCH; H) Acercamiento que permite ver la diferenciación del tipo de colágeno en la zona adyacente de la ZCH. CH=chica, G=grande, ZCH=zona de cicatrización de la herida E=epidermis, TG= Tejido de granulación, VS=vaso sanguíneo, F=fibroblasto, N=neutrófilo, CTI=colágeno del tipo I y CTIII=colágeno	61

- del tipo III. A, B, C, D, E y F tinción HE. G y H tinción Masson
- 13.** Micrografías de pieles de ratón tratados con la aplicación tópica de Recoverón®. A) y B) Contracción en la ZCH; C) y D) Epidermis en la ZCH; E) y F) Tejido de granulación; G) Cambio del colágeno en la zona adyacente a la ZCH; H) Acercamiento que permite ver la diferenciación del tipo de colágeno en la zona adyacente de la ZCH. CH=chica, G=grande, ZCH=zona de cicatrización de la herida, E=epidermis, TG= Tejido de granulación, VS=vaso sanguíneo, F=fibroblasto, N=neutrófilo, CTI=colágeno del tipo I y CTIII=colágeno del tipo III. A, B, C, D, E y F tinción HE. G y H tinción Masson **63**
- 14.** Micrografías de pieles de ratón tratados con la aplicación tópica de *V. dentata*. A) y B) Contracción en la ZCH; C) y D) Epidermis en la ZCH; E) y F) Tejido de granulación; G) Cambio del colágeno en la zona adyacente a la ZCH; H) Acercamiento que permite ver la diferenciación del tipo de colágeno en la zona adyacente de la ZCH. CH=chica, G=grande, ZCH=zona de cicatrización de la herida, E=epidermis, TG= Tejido de granulación, VS=vaso sanguíneo, F=fibroblasto, N=neutrófilo, CTI=colágeno del tipo I y CTIII=colágeno del tipo III. A, B, C, D, E y F tinción HE. G y H tinción Masson **65**
- 15.** Micrografías de pieles de ratón tratados con la aplicación tópica de *A. monostachya*. A) y B) Contracción de la herida en la ZCH; C) Epidermis en la ZCH; D) Re-epitelización de epidermis debajo de la costra en la ZCH; E) Tejido de granulación; F) Costra y Hemorragia en la ZCH; G) Colágeno del tipo I en la ZCH; H) Acercamiento que permite ver el ordenamiento y homogeneidad del colágeno del tipo I en la ZCH. CH=chica, G=grande, ZCH=zona de cicatrización de la herida, E=epidermis, TG= Tejido de granulación, VS=vaso sanguíneo, F=fibroblasto, N=neutrófilo, C= costra, H= hemorragia y CTI=colágeno del tipo I. A, C, y E tinción HE. B, D, F, G y H tinción Masson **67**
- 16.** Micrografías de pieles de ratón tratados con la aplicación tópica de *V. crocata*. A) y B) Contracción en la ZCH; C) y D) Epidermis en la ZCH; E) y F) Tejido de granulación; G) Cambio del colágeno en la zona adyacente a la ZCH; H) Acercamiento que permite ver la diferenciación del tipo de colágeno en la zona adyacente de la ZCH. CH=chica, G=grande, ZCH=zona de cicatrización de la herida E=epidermis, TG= Tejido de granulación, VS=vaso sanguíneo, F=fibroblasto, N=neutrófilo, CTI=colágeno del tipo I y CTIII=colágeno del tipo III. A, B, C, D, E y F tinción HE. G y H tinción Masson **69**
- 17.** Etapas del proceso de cicatrización en las que probablemente estén las secciones de piel a las que se les aplico de manera tópica con los diferentes tratamientos **72**

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

4-HNE: 4-hidroxinonenal

8-OHdG: 8-hidroxi-2-desoxiguanosina

ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de varianza

C: Colágeno

C-: Control negativo

C+: Control positivo

CA₅₀: Capacidad antioxidante media

CH: Chica

CG/EM: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Cru: Extracto crudo

CTI: Colágeno tipo I

CTIII: Colágeno tipo III

DP: Dermis papilar

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

DR: Dermis reticular

E: Epidermis

EAG/g: Equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto

ERO: Especies reactivas de oxígeno

F: Fibroblastos

FHex: Fracción hexánica

FMeOH: Fracción metanólica

G: Grande

GS: Glándula sebácea

H-E: Hematoxilina eosina

HD: Hipodermis

HPLC-DAD UV: Cromatografía de líquidos de alta resolución detección UV por arreglo de diodos

HPLC-ESI-TOF-EM: Cromatografía de líquidos de alta resolución, método de ionización por electrospray y analizador de masas-tiempo de vuelo por su relación masa/carga.

IL: Interleucinas

LPO: Lipoperoxidación

M: Mediana

MMPs: Metaloproteinasas

m/z: Masa de ion molecular

N: Neutrófilo

NADPH: Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato

N.I.: No identificado

NO•: Óxido nítrico

O₂^{•-}: Anión superóxido

P: Pelo

R: Regenerada

TIMP: Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas

TG: Tejido de granulación

TGF-β: Factor de crecimiento transformante β

TR: Tiempo de retención

UV: Luz ultravioleta

VCH: Velocidad de cierre de la herida

VS: Vaso sanguíneo

ZCH: Zona de cicatrización de la herida

RESUMEN

Introducción: La piel es la primera barrera entre el cuerpo y el ambiente, cuando esta se interrumpe se crea una herida y para repararla comienza un proceso conocido como cicatrización. Este puede ser afectado por distintos factores como las especies reactivas de oxígeno, ya que participan en la patogenia de la cicatrización. Por lo tanto, la terapia antioxidante tiene beneficios significativos en la curación de heridas cutáneas. En el Valle de Tehuacán-Cuicatlán se utilizan para tratar heridas y quemaduras las plantas *Viguiera dentata* (Cav.) Sprengel (Chimalacate), *Acalypha monostachya* Cav. (Hierba del pastor) y *Verbesina crocata* (Cav.) Less (Arnica). Por lo cual, el objetivo de este trabajo es evaluar las propiedades antioxidante y cicatrizante de estas tres especies.

Materiales y métodos: Los extractos metanólicos se obtuvieron de las partes aéreas de *V. dentata*, *A. monostachya* y *V. crocata*. Posteriormente, se les realizó una partición, para obtener una fracción hexánica y otra metanólica. La caracterización fitoquímica de los mismos se realizó mediante pruebas colorimétricas, cromatografía de líquidos de alta resolución y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La actividad antioxidante se evaluó *in vitro* con el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo y la cuantificación de fenoles totales se realizó con el método de Follin-Cicoulteau. La capacidad cicatrizante fue estimada con la aplicación tópica de los extractos crudos en las heridas incisionales de ratones CD-1 por el método del tensiómetro. Además, se midió el tiempo y velocidad del cierre total de la herida, así como el análisis histológico de las zonas de cicatrización de la herida (ZCH) con un experimento paralelo.

Resultados: Los compuestos químicos detectados por CG/EM en las plantas indican la presencia de antioxidantes no polares y triterpenos con distintas actividades biológicas. El análisis por HPLC revela la existencia de compuestos fenólicos y flavonoides en la parte polar de las tres plantas. El estudio del potencial antioxidante mostró que *A. monostachya* es la que tiene la capacidad antioxidante más alta, seguida de *V. dentata* y finalmente *V. crocata*. La cuantificación de fenoles totales indica que *V. dentata* tiene la mayor concentración, seguida de *A. monostachya* y *V. crocata*. En la actividad cicatrizante evaluada por el método tensiométrico mostró que no hubo diferencias significativas debido a la aplicación tópica de los diferentes tratamientos; no obstante, el grupo de ratones al que se les aplicó *V. crocata* se comportó de manera similar al control positivo Recoveron®. Además, las heridas de los ratones a los que se la aplicó tópicamente *V. crocata* presentaron una tasa de cierre de la herida más alta (1.264 ± 0.90 mm/día) y por

consecuencia cerraron más rápido (doce días) en comparación con el resto de los tratamientos (quince días). En el análisis histológico se observó que el tratamiento que promovió un mejor el proceso de cicatrización fue *V. crocata* porque las ZCH estaban en la fase de remodelación, las ZCH tratadas con Recoverón® entre las fases proliferativa-remodelación, mientras que en el caso del tratamiento con *V. dentata* las ZCH se diagnosticaron en la fase proliferativa. Las heridas incisionales tratadas con Vaselina están entre las fases inflamatoria-proliferativa y las ZCH a las que se les aplicó de manera tópica *A. monostachya* se encuentran en la fase inflamatoria, sin embargo es importante destacar que en este tratamiento aunque el proceso de cicatrización se desarrolló de manera más lenta fue en el que se apreció de manera más ordenada.

Conclusión: Con base en los resultados podemos discernir que *V. crocata* fue el tratamiento que de acuerdo a las evaluaciones físicas e histológicas propicio la mejor actividad cicatrizante. Mientras, *V. dentata* y *A. monostachya* cuentan con un alto potencial antioxidante, pero con menor capacidad cicatrizante.

ABSTRACT

Introduction: The skin is the first barrier between the body and the environment, when it is interrupted a wound is created and to repair it begins a process known as healing. This can be affected by different factors such as reactive oxygen species as they participate in the pathogenesis of healing. Therefore, antioxidant therapy has significant benefits in the healing of skin wounds. In the Tehuacán-Cuicatlán Valley are used to treat wounds and burns the plants *Viguiera dentata* (Cav.) Sprengel (Chimalacate), *Acalypha monostachya* Cav. (Hierba del pastor) y *Verbesina crocata* (Cav.) Less (Arnica). Therefore, the objective of this work is to evaluate the antioxidant and wound healing properties of these three species.

Material and methods: The methanolic extracts were obtained from the aerial parts of *V. dentata*, *A. monostachya* and *V. crocata*. Subsequently, a partition was made to obtain a hexanic and a methanolic fraction. The phytochemical characterization of them was carried out by colorimetric tests, high performance liquid chromatography of and gas chromatography-mass spectrometry. The antioxidant activity was evaluated *in vitro* with the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, and the quantification of total phenols was carried out with Follin-Ciocalteu method. The healing capacity was estimated with the topical application of methanolic extracts in incisional wounds of mice CD-1 by the tensiometer method. In addition, the time and speed of the total closure of the wound was measured as well as the histological analysis of the wound healing zones (WHZ) with a parallel experiment.

Results: Chemical compounds detected by GC/MS in the plants indicate the presence of non-polar antioxidants and triterpenes with different biological activities. The analysis by HPLC reveals the existence of phenolic and flavonoids compounds in the polar part of the three plants. The study of antioxidant potential detected shows that *A. monostachya* has the highest antioxidant capacity, followed by *V. dentata* and finally *V. crocata*. In the quantification of total phenols *V. dentata* has the highest concentration, followed by *A. monostachya* and *V. crocata*. In the healing capacity evaluated by the tensiometer method showed that there were no significant differences due to topical application of the different treatments; however, the group of mice to which the treatment of *V. crocata* behaved similarly to the positive control Recoveron®. In addition, the wounds of the mice to which topically applied *V. crocata* had a higher wound closure rate (1.264 ± 0.90 mm/día) and consequently closed faster (twelve days) compared with the rest of the treatments (fifteen

days). In the histological analysis it was observed that the treatment that promoted a better healing process was *V. crocata* because the WHZ were in the remodeling phase, the WHZ treated with Recoverón® were between the proliferative-remodeling phases, while WHZ in the case of the treatment with *V. dentata* the WHZ were diagnosed in the proliferative phase. The incisional wounds treated with Vaseline were diagnosed between the inflammatory-proliferative phases and the WHZ to which they were applied topically *A. monostachya* are in the inflammatory phase, although it is important to note that in this treatment although the healing process was developed more slowly was that it was appreciated in a more orderly manner.

Conclusion: Based on the results, *V. crocata* favored the best wound healing activity, according to the physical and histological evaluations. Meanwhile, *V. dentata* and *A. monostachya* have a high antioxidant potential but with less wound healing capacity.

1. INTRODUCCIÓN

La piel es el primer escudo entre el cuerpo y el ambiente (Valdivia-Silva, 2014). Además de proporcionar un recubrimiento para los tejidos blandos, la piel desempeña muchas funciones adicionales que incluyen: 1) protección contra lesiones, invasión bacteriana y desecación; 2) regulación de la temperatura corporal; 3) recepción de sensaciones continuas del ambiente (tacto, temperatura y dolor); 4) excreción por las glándulas sudoríparas; y 5) absorción de la radiación ultravioleta del Sol para la síntesis de vitamina D (Gartner y Hiatt, 2002).

La piel consiste en varias capas: la epidermis externa y una capa profunda de tejido conectivo conocida como dermis. La epidermis es un epitelio escamoso estratificado queratinizado derivado del ectodermo. Justo abajo e interdigitada con la epidermis se encuentra la dermis, derivada del mesodermo y compuesta de tejido conectivo denso, irregular y colagenoso (Gartner y Hiatt, 2002). La dermis es la que recibe el mayor suministro de sangre para la piel y contiene los apéndices epidérmicos, incluidos las glándulas apocrinas, las glándulas ecrinas y los folículos pilosos. Este tejido se divide en dermis superficial o papilar y la dermis reticular más profunda. Como regla general, cualquier daño que se extienda a la capa reticular más profunda invariablemente causará cicatrices y puede requerir reparación con injertos para asegurar una cicatrización adecuada (Gantwerker y Hom, 2012). La hipodermis es un tejido conectivo laxo que contiene cantidades variables de grasa y sustenta la piel. La hipodermis no es parte de la piel sino que constituye la fascia superficial que recubre la totalidad del cuerpo y se encuentra en la parte más profunda a la piel (Gartner y Hiatt, 2002).

Cuando se interrumpe la continuidad de la piel se provoca una herida. Las heridas son el resultado visible de una lesión o muerte de las células en los tejidos y pueden ser ocasionadas por agentes físicos, químicos, biológicos y mecánicos e incluso por la respuesta inmune o inflamatoria exacerbada (Salem *et al.*, 2000). Las heridas se clasifican en agudas y crónicas. Una herida aguda es aquella que sigue un proceso de reparación ordenado, dentro de un tiempo adecuado, que restaura la integridad anatómica y funcional del órgano. Por otra parte, una herida crónica es aquella que no sigue un proceso ordenado o que no restaura la integridad de la piel (Andrades *et al.*, 2004).

La curación de heridas es un proceso complejo y dinámico que da como resultado la restauración de la continuidad y la función anatómica (Sathyanarayanan *et al.*, 2017). Una

herida se considera curada cuando se ha restablecido la continuidad del órgano y se ha alcanzado un grado de fuerza tisular que se aproxima al normal. La superficie se adquiere por epitelización y por contracción de la herida, mientras que la continuidad se restablece mediante la producción de nuevo tejido conectivo. La fuerza a la tensión, es decir la fuerza necesaria para volver a abrir la herida surge del depósito de cantidades suficientes de colágeno nuevo y adecuadamente organizado. Cada uno de estos procesos se miden de forma diferente y el progreso de cada uno varía con la localización, la profundidad, el tamaño y la configuración de la herida (Fitzpatrick *et al.*, 1987).

El proceso de curación de heridas es conocido como cicatrización, el cual está dividido en varias etapas: a) inicia con la hemostasia o formación de un coágulo, b) inflamación, c) proliferación y d) termina con la maduración o remodelación (Werner y Grose, 2003; Teller y White, 2009).

La hemostasia es un conjunto de mecanismos aptos para evitar la pérdida de sangre tras una ruptura vascular, donde la vasoconstricción y la formación del coágulo hacen que se detenga la hemorragia (Teller y White, 2009). Después de una lesión en la piel, el sub-endotelio expuesto, el colágeno y el factor tisular activarán la agregación plaquetaria, lo que produce desgranulación y liberación de factores quimiotácticos (quimiocinas) y factores de crecimiento para formar el coágulo (Gauglitz *et al.*, 2011). Con la hemostasia se inicia de inmediato la etapa de inflamación (Gantwerker y Hom, 2012).

La inflamación tiene como objeto el remover el tejido muerto o dañado y desbridar la herida para prevenir infecciones. La inflamación representa una dilatación de los vasos sanguíneos, con aumento de su permeabilidad y el reclutamiento de los leucocitos hacia el foco de lesión. Los episodios inflamatorios de cicatrización de la herida están dominados secuencialmente por dos poblaciones leucocitarias: los neutrófilos y los macrófagos que se dedican del desbridamiento de la herida (Teller y White, 2009; Ramírez, 2010). Los neutrófilos son las primeras células que aparecen en el sitio de la lesión, limpian los desechos y las bacterias para proporcionar un buen ambiente para la cicatrización de heridas. A continuación, los macrófagos se acumulan y facilitan la fagocitosis de las bacterias y el tejido dañado (Berman *et al.*, 2017). Estos grupos celulares logran esta función mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), cuando se activan estas células incrementan el consumo de oxígeno, que se debe

a la rápida reducción de oxígeno a superóxido ($O_2^{\cdot-}$) por una NADPH oxidasa unida a la membrana plasmática. El resultado neto es la liberación de grandes cantidades de ERO extracelularmente. Este proceso es crítico para el funcionamiento normal del sistema inmune. Los fagocitos también generan óxido nítrico (NO^{\cdot}) (Moncada y Higgs, 1993). Entonces, si no se concluye de manera normal la fase de inflamación puede retrasar la curación de la herida (Sathyanarayanan *et al.*, 2017).

Una vez que se desbrida la herida comienza la fase proliferativa. Esta se caracteriza por diversas etapas: angiogénesis, formación de tejido de granulación, depósito de colágeno, epitelización y contracción de la herida. La matriz extracelular, que incluye proteoglicanos, ácido hialurónico, colágeno y elastina, constituyen el tejido de granulación que reemplaza la formación original del coágulo (Su *et al.*, 2010). Muchos tipos de citoquinas y factores de crecimiento participan en esta fase, como la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β , que incluye TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3), la familia de interleucinas (IL) y los factores de angiogénesis, entre otros (Su *et al.*, 2010). La angiogénesis también llamada neovascularización, ocurre al tiempo que los fibroblastos proliferan y las células endoteliales migran a la herida (Devika y Koilpillai, 2014). En la epitelización, el objetivo es la restauración de la barrera funcional que ofrece la piel y aumenta la resistencia a la tracción de la cicatriz, a través de los fibroblastos, los cuales producen fibronectina, ácido hialurónico, proteoglicanos y colágeno (Freinkel y Woodley, 2001). Esta fase puede durar días y/o semanas (Su *et al.*, 2010).

La fase de remodelación comienza cuando la matriz extracelular provisional y el colágeno de tipo III se reemplazan con colágeno de tipo I y los tipos de células restantes (neutrófilos y fibroblastos) de las fases previas sufren apoptosis (Gantwerker y Hom, 2012). El último acontecimiento en la cicatrización de la herida, y el más largo, es la maduración del colágeno. Durante el proceso de cicatrización predominan dos tipos de colágeno, el tipo I que es una proteína fibrilar rígida que proporciona resistencia a la tensión y el tipo III que tiene propiedad contráctil (Barnes *et al.*, 1976). El colágeno del tipo III se presenta en la etapa inicial de la cicatrización de heridas y en la etapa de maduración es reemplazado gradualmente por colágeno del tipo I (Geever *et al.*, 1965; Wang *et al.*, 2018). El tejido de granulación comienza a involucionar y el exceso de vasos sanguíneos se retrae. Esta fase dura más tiempo y da como resultado la apariencia final de la herida después de la cicatrización. La fase de remodelación exitosa implica un delicado equilibrio entre la

producción y lisis de fibras de colágeno y grupos celulares. Esta síntesis depende en gran medida de la energía disponible, cualquier disminución de nutrientes empujará la balanza hacia la lisis y afectará el proceso de curación (Gantwerker y Hom, 2012). Cualquier alteración en esta fase puede provocar una cicatrización queloide o una herida crónica (Plikus *et al.*, 2017; Tsai *et al.*, 2018).

Las heridas se curan normalmente mediante la participación de estas fases superpuestas temporalmente: Hemostasia/inflamación, proliferación y remodelación (Komarcevic, 2000). Las funciones fisiológicas de las tres fases se producen en la secuencia adecuada en un momento y duración específicos a una intensidad óptima (Mathieu *et al.*, 2006) La cicatrización, al ser tan compleja, puede alterarse por diversos factores, tales como la presencia de radicales libres, inflamación crónica, infección microbiana, varias patologías e incluso la edad (Houghton *et al.*, 2005).

Algunas de las patologías que pueden afectar los procesos de cicatrización son la diabetes y la obesidad mórbida. Las heridas crónicas se presentan con mayor incidencia en pacientes diabéticos, esto es debido a que el exceso de glucosa promueve la formación de ERO produciendo estrés oxidante (Soneja *et al.*, 2005), también afecta la migración y función de los fibroblastos retrasando el proceso de cicatrización (Xuan *et al.*, 2014). Mientras, en la obesidad mórbida, la presencia de ácidos grasos libres promueve la estimulación de receptores β -adrenérgicos, éstos a su vez promueven el incremento de citocinas pro-inflamatorias y al mismo tiempo se da una reducción de enzimas antioxidantes (Mottillo *et al.*, 2010).

Otra situación que afecta el transcurso de la cicatrización es la exposición a contaminantes oxidantes como el ozono, además de la edad, los cuales al interactuar interrumpen el proceso normal. A mayor edad existe una mayor posibilidad de cicatrización queloide de la herida (Lim *et al.*, 2006). En cambio la cicatrización de heridas fetales se caracteriza por la regeneración de la arquitectura dérmica normal, que incluye la restauración de la neurovasculatura y los apéndices dérmicos (Leung *et al.*, 2012). La curación de heridas en la piel fetal implica un perfil de factores de crecimiento distinto, una respuesta inflamatoria inferior, poco estrés biomecánico, los fibroblastos producen a una tasa más alta una matriz extracelular rica en ácido hialurónico, colágeno tipo III, así como

un papel potencial de las células madre (Tsai *et al.*, 2017). En comparación con la piel fetal, el adulto tiene un mayor riesgo de formación de cicatrices (Leung *et al.*, 2012).

La inflamación crónica se caracteriza por una respuesta continua a lo largo del tiempo (Ptaschinski *et al.*, 2017) y la hiperproducción de los radicales libres, los cuales conducen a la inhibición de los mecanismos responsables de las etapas posteriores del proceso de la cicatrización de la herida (Sathyanarayanan *et al.*, 2017).

El estrés oxidativo es un desbalance entre los pro-oxidantes y los antioxidantes que resulta en daño macromolecular, alteración de la señalización y el funcionamiento celular (Jones, 2007). Las sustancias pro-oxidantes, dentro de las cuales se encuentran las ERO son resultado de la reducción del oxígeno molecular por diversas actividades como: el metabolismo, la radiación, la contaminación, etc. Entre las ERO se encuentran radicales libres, que son: átomos, moléculas o iones con electrones no apareados y sustancias no radicales (Carocho y Ferreira, 2013). En cuanto a los antioxidantes Halliwell y Gutteridge (2015) lo definen: "Antioxidante" como cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula". Los organismos tienen un sistema de defensa antioxidante capaz de prevenir o eliminar el daño oxidativo de las biomoléculas. Estos pueden ser clasificados como a) antioxidantes endógenos enzimáticos, b) endógenos no enzimáticos y c) antioxidantes exógenos (Carocho y Ferreira, 2013).

El estrés oxidativo está asociado a diversas patologías debido al daño ocasionado a las macromoléculas y por lo tanto el daño celular. Se da por tres formas básicas: la peroxidación lipídica (LPO) de las membranas, modificación oxidativa de las proteínas y el daño del ADN (Kudryavtseva *et al.*, 2016).

La LPO hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos. Es el proceso a través del cual los radicales libres capturan electrones de los lípidos. Los productos más comunes de la LPO son el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE) y ambos son muy reactivos ya que pueden reaccionar con otros componentes celulares como las proteínas o el DNA (Nam, 2011). El 4-HNE es también una molécula capaz de modular la expresión de varios genes y por lo tanto, puede alterar importantes funciones como el crecimiento celular, la diferenciación y la angiogénesis; procesos involucrado en la cicatrización de heridas (Leonarduzzi *et al.*, 2004).

El daño a proteínas se da principalmente mediante la oxidación de los aminoácidos, lo cual puede producir entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y por ende un cambio conformacional que deriva en la disminución o pérdida de función proteica (Berlett y Stadtman, 1997). En las heridas durante el proceso de cicatrización, se ha planteado que el daño oxidativo en los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de matriz TIMP-1 y TIMP-2, de naturaleza proteica, condicionaría su pérdida de actividad con el consecuente incremento de la actividad proteolítica de las metaloproteinasas (MMPs) y el entorpecimiento de los procesos de cicatrización (Ashcroft *et al.*, 1997).

El daño oxidativo al DNA se da tanto en las bases nitrogenadas y como en el azúcar, llegando a producir mutaciones y la ruptura de las cadenas nucleotídicas (Evans *et al.*, 2004). Una de las alteraciones más estudiadas es el 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) comúnmente se utiliza para medir el daño oxidativo y se encuentra relacionada con el envejecimiento y diversas patologías (Evans *et al.*, 2004; Starr y Starr, 2014). El incremento de 8-OHdG en plasma está relacionado con envejecimiento y fragmentación del colágeno (Starr y Starr, 2014). La mutación o expresión alterada de genes a menudo resultan en un envejecimiento prematuro y disminución de las defensas antioxidantes endógenas (Barja, 2004; Kregel y Zhang, 2007).

Hay que tener en cuenta que las ERO son fundamentales durante el proceso de cicatrización, porque los neutrófilos, los macrófagos y otros tipos celulares los producen en el lecho de la herida. Estas actúan contra microorganismos invasores y regulan diversas vías de señalización celular necesarias para que ocurra el cierre de la herida (Demianenko *et al.*, 2010). Sin embargo, también el estrés oxidativo inducido por otras patologías, provocan elevadas concentraciones de ERO que afectan de forma negativa el proceso de cicatrización normal (Auf dem Keller *et al.*, 2006; Bickers y Athar, 2006; Sen y Roy, 2008).

La aplicación de preparaciones antioxidantes en la superficie de la herida se utilizan para la normalización del proceso de cicatrización, tanto en la medicina clínica como en la experimental (Hallberg *et al.*, 1996). El desarrollo de cubiertas para heridas con actividad antioxidante es un tratamiento importante en la terapia de heridas, ya que esta provoca el cese de la inflamación en los eventos tempranos y estimula los procesos regenerativos en

la fase posterior de la cicatrización de la herida (Demianenko *et al.*, 2010). Los polifenoles actúan de manera protectora, ayudando a prevenir o atenuar la progresión de ciertos trastornos de la piel (acné, arrugas, cáncer, etc.), disminuir el envejecimiento, las enfermedades dermatológicas, las heridas y quemaduras (Dzialo *et al.*, 2016). Algunos otros estudios indican que los compuestos fenólicos desempeñan un papel importante en la curación de heridas por su actividad antioxidante y antimicrobiana (Song *et al.*, 2017).

Los tratamientos con base en hierbas han sido la plataforma para los métodos en la curación de heridas e inflamación (Chitra *et al.*, 2009). Se ha informado que las plantas medicinales son muy beneficiosas para el cuidado de las heridas, promoviendo la tasa de cicatrización y disminuyendo la formación de cicatriz para el paciente (Kumar *et al.*, 2007).

En trabajos realizados para evaluar la actividad cicatrizante de algunas especies vegetales se ha observado que los compuestos fenólicos (flavonoides y taninos), cuentan con actividad cicatrizante (Guillermo *et al.*, 2005). Recientemente se ha relacionado la capacidad antioxidante con la actividad cicatrizante en el estudio de diversas plantas. El extracto metanólico de *Pterolobium hexapetalum* -que es utilizada para el tratamiento y curación de heridas por grupos tribales en la India-, cuenta con una gran actividad antioxidante (DPPH, ABTS% y Superóxido), a su vez presentó un mayor porcentaje de contracción de la herida y el menor tiempo para la epitelización, en comparación con el grupo control (Sathyanarayanan *et al.*, 2017). Por otro lado, el extracto acuoso de *Cynodon dactylon* -conocida en México como Zacate bermuda- se evaluó de manera tópica en animales y humanos con heridas crónicas. Los resultados respaldaron su uso para la curación de heridas; y además relaciona la actividad antioxidante que presenta con su potencial cicatrizante por aumento de la colagenogénesis (Biswas *et al.*, 2017). Un estudio realizado con la aplicación de una pomada con el extracto fenólico de la orquídea *Bletilla striata* demostró capacidad antioxidante y una reparación tisular superior en heridas en comparación con el control (Song *et al.*, 2017)

En el Valle de Tehuacán-Cuicatlán se han registrado cerca de 3,000 especies de plantas, de éstas el 30% son endémicas de la región (Dávila *et al.*, 1993). Alrededor de 808 especies son aprovechadas por la población y 243 son utilizadas con fines medicinales (Casas *et al.*, 2001). Rosas en 2003 realizó un estudio etnobotánico en el pueblo de San Rafael, Coxcatlán, donde se identificaron un total de 374 especies, de las cuales 368

fueron registradas con uno o más usos y 39 de ellas utilizadas con fines medicinales. Las plantas medicinales reportadas para tratar afecciones dermatológicas son 14 especies. De estas las más usadas para el tratamiento de heridas y quemaduras son: *Verbesina crocata* (Cav.) Less (Árnica), *Acalypha monostachya* Cav. (Hierba del pastor) y *Viguiera dentata* (Cav.) Sprengel (Chimalacate).

1.1. Descripción Botánica

***Viguiera dentata* (Cav.) Sprengel (Chimalacate).**

(Rzedowski y Rzedowki, 2001)

Reino: Plantae;

Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares);

Superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas);

División: Magnoliophyta (plantas con flor);

Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas);

Subclase: Asteridae;

Orden: Asterales.

Familia: Asteraceae

Género: *Viguiera*

Epíteto específico: *dentata*

V. dentata es una planta que se distribuye desde el suroeste de Estados Unidos hasta a Honduras y Cuba. Es una planta herbácea perenne y erecta con un tamaño de hasta 2.5 m de alto, con tallo glabro a piloso o hispido y hojas opuestas o alternas en la parte superior, sobre pecíolos de 0.5 a 5.5 cm de largo, limbos generalmente ovados a romboideo-ovados, de 3.5 a 12 cm de largo, de 1 a 8 cm de ancho, acuminados en el ápice, enteros a aserrados en el margen, cuneados a truncados en la base, finamente estrigosos a pilosos en el haz, esparcidamente estrigosos a subcanescentes en el envés, trinervados. La inflorescencia está formada por cabezuelas numerosas agrupadas en panículas cimosas bracteadas, sobre pedúnculos hasta de 15 cm de largo; involucre anchamente campanulado a subhemisférico, de 5 a 10 mm de alto, sus brácteas dispuestas en 2 a 3 series, graduadas o de tamaño igual, endurecidas en la base y con la parte distal herbácea, linear o linear-oblonga; paleas dorsalmente pubescentes, de 6 a 7

mm de largo. Cabezuelas/ Flores liguladas 10 a 13, elípticas u oblongas, amarillas, de 7 a 15 mm de largo; flores del disco más de 50, sus corolas amarillas, de 3 a 4 mm de largo. Los frutos y semillas son aquenios obovado-oblongos, de 3.5 a 4 mm de largo, negruzcos o abigarrados, pubescentes, aristas del vilano de 2 a 3 mm de largo, escamas 4, de 0.5 a 0.8 mm de largo y de ancho.

***Acalypha monostachya* Cav. (Hierba del pastor)**

(eFloras, 2018)

Reino: Plantae;

Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares);

Superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas);

División: Magnoliophyta (plantas con flor);

Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas);

Subclase: Rosidae

Orden: Malpighiales

Familia: Euporbiaceae

Género: *Acalypha*

Epíteto específico: *monostachya*

A. monostachya es una planta herbácea monoica o dioica con un tamaño de 15 a 40 cm, con tallos postrados a ascendentes cortos pubescentes. Las hojas orbiculada o reniforme con tamaño de 0.7–2.5 por 0.8–2.5 cm, base cordada o redondeada, márgenes poco profundos, ápice redondeado y con pecíolo de 0.5–2.5 cm. Las inflorescencias son unisexuales o bisexuales, terminales (estaminadas, pistiladas y bisexuales) y axilares (pistiladas); con pedúnculo estaminado de 0.8 a 3 cm, porción fértil de 1 a 4 cm; pedúnculo pistilado 0.4–1.5 cm, porción fértil 1–2 por 0.8–1.2 cm; bisexual similar al estaminado, con 1–3 brácteas pistiladas cerca de la base. Las flores pistiladas alomorfas ausentes. Tiene brácteas pistiladas apiñadas (eje de inflorescencia no visible entre brácteas), 6–8.5 por 8–12 mm, superficie abaxial hirsuta, sécil y estipitante glandular; lóbulos (8–) 10–12 (–14), redondeados, 1/4 de longitud bráctea. Las flores pistiladas tiene pistilo 3-carpelo. Los frutos son cápsulas lisas y pubescentes, con semillas de 1.5–1.8 mm.

***Verbesina crocata* (Cav.) Less (Árnica)**

(Olsen, 1988)

Reino: Plantae;

Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares);

Superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas);

División: Magnoliophyta (plantas con flor);

Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas);

Subclase: Asteridae;

Orden: Asterales.

Familia: Asteraceae

Género: *Verbesina*

Epíteto específico: *crocata*

V. crocata es una planta endémica de México restringida al occidente del país. Es un arbusto extendido, con un tamaño de 1 a 8 m de alto, con tallo alado con cuatro alas foliáceas de 1 a 4 mm de ancho, ramas opuestas de 75 a 150° con respecto al eje principal en la inflorescencia con pelos suaves gruesos en la base. Tiene hojas principalmente opuestas de 8 a 16 cm de largo por 5 a 13 cm de ancho, ovadas a deltoides, usualmente pinnadas o hastadas. La inflorescencia está formada por panículas de 1-5 cabezuelas con un pedúnculo de hasta 20 cm de largo. Las cabezuelas son generalmente grandes, hemisféricas a subglobosas, discoides, 2-3.5 cm de ancho, 1.5-2.5 cm de alto; pedúnculos cuando jóvenes blanquecinos por la gran cantidad de pelos rígidos de 2 a 7.5 cm de largo por 1 a 2 mm de grueso, el color del involucro es grisáceo, con las brácteas desiguales y graduadas, las exteriores más cortas, linear-lanceoladas. Las flores del disco van de 100 a 200 o más, naranjas, más o menos hipidulas, tubulares de 9 a 10 mm de largo, tubo de 1 a 1.7 mm de largo, garganta cilíndrica a ligeramente expandida hacia arriba, de 1 mm de ancho, lóbulos agudos de 1 a 1.3 mm de largo, anteras sin pigmentación oscura, amarillas a naranjas, de 2.5 a 2.7 mm de largo, ramas del estilo de 2 a 2.7 mm de largo, disminuyendo el ápice. El fruto es un aquenio ovado de 5.5 a 8 mm de largo por 3.5 a 4.5 mm de ancho, gris, sin pelos o con pocos, alas blanquecinas, ciliadas, de 0.7 a 1.5 mm de ancho, prologada hacia las dos aristas cortas y adnada en la base.

1.2. Planteamiento del problema

Debido a la información recabada es importante realizar estudios que permitan analizar si *V. dentata*, *A. monostachya* y *V. crocata*, cuentan con actividad antioxidante y cicatrizante, así como reconocer los principales grupos de metabolitos secundarios que pueden estar involucrados en estas actividades biológicas. Lo cual permitirá avalar científicamente su uso medicinal para curar lesiones de la piel y distintos problemas dermatológicos. Así como conservar el conocimiento de los pueblos originarios. Por lo anterior la pregunta científica que se planteo fue:

¿Las plantas *V. dentata*, *A. monostachya* y *V. crocata* utilizadas en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán para tratar afecciones dermatológicas, tendrán actividad cicatrizante y/o antioxidante?

2. HIPÓTESIS

Las plantas *Viguiera dentata* (Cav.) Sprengel (Chimalacate), *Acalypha monostachya* Cav. (Hierba del pastor) y *Verbesina crocata* (Cav.) Less (Árnica), son las más utilizadas por los habitantes del Valle de Tehuacán-Cuicatlán para el tratamiento de heridas y quemaduras, así como para tratar otras afecciones de la piel como la aparición de granos y ronchas. Estas propiedades se deben a los metabolitos secundarios que poseen las especies mencionadas, los cuales promoverán la cicatrización de heridas incisionales en ratones CD-1. Por lo cual, al usarlas como tratamiento tópico ayudaran en el proceso de cicatrización de los ratones, mediante la reducción del tiempo para el cierre de la herida, el incremento en la resistencia de la piel a la fuerza de tensión y a nivel histológico habrá epitelización, así como un aumento en la síntesis y organización del colágeno cutáneo.

3. OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar el efecto antioxidante y cicatrizante de *Viguiera dentata*, *Acalypha monostachya* y *Verbesina crocata*.

Objetivos particulares:

- Identificar los principales componentes químicos presentes en los extractos de *V. dentata*, *A. monostachya* y *V. crocata*.
- Determinar el efecto antioxidante *in vitro* de los extractos de *V. dentata*, *A. monostachya* y *V. crocata*.
- Evaluar el efecto cicatrizante de los extractos de *V. dentata*, *A. monostachya* y *V. crocata* en un modelo de ratones CD-1, mediante el método del tensiómetro, medir el tiempo/velocidad de cierre total de la herida y el análisis histológico de las cicatrices.

4. ANTECEDENTES

4.1. *Viguiera dentata* (Cav.) Sprengel (Chimalacate)

4.1.1. Etnobotánica

V. dentata cuenta con antecedentes de uso medicinal. Los cuales se describen a continuación (Tabla 1).

Tabla 1. Estudios etnobotánicos de *V. dentata*.

AUTOR	ANTECEDENTE
Escalante, 1986.	Antiséptico en Sonora y como antitusivo en Quintana Roo.
Rosas, 2003.	Para tratar afecciones de la piel, para parturientas, chincual (enfermedad del pañal) y piquetes de hormiga en San Rafael Coxcatlán.

4.1.2. Actividades biológicas

V. dentata cuenta con pocos estudios sobre sus actividades biológicas y estos se han enfocado a la actividad antimicrobiana de sus diferentes extractos (Tabla 2).

Tabla 2. Investigaciones de las actividades biológicas de *V. dentata*.

AUTOR	ANTECEDENTE
Gijon, 2003.	Evaluó el extracto acuoso y los aceites esenciales los cuales mostraron actividad antibacteriana. El extracto acuoso presentó actividad sobre <i>Bacillus subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> y <i>Vibrio cholerae</i> . Los aceites esenciales <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella typhi</i> .
Canales et al., 2005.	Determinaron que el extracto hexánico tiene actividad sobre <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i> .

4.1.2. Composición química de *V. dentata*

V. dentata se ha estudiado para conocer algunos de sus compuestos químicos, dentro de los cuales se ha identificado principalmente el ácido kaurénico (Tabla 3).

Tabla 3. Compuestos químicos identificados hasta el momento en *V. dentata*.

AUTOR	COMPUESTO QUÍMICO
Bohlman <i>et al.</i> , 1981.	Ácido kaurénico y 9,11-dihidro- <i>ent</i> -ácido kaurénico.
Gao <i>et al.</i> , 1987.	Manool, ácido kaurénico, <i>ent</i> -kauranol, ácido grandiflorico, ácido angeloilgrandiflórico, ácido 15-oxo- <i>ent</i> -ácido kaurénico, ácido traquilobánico, spatulenol y diversifolina.
Gao <i>et al.</i> , 1989.	Compuestos derivados de cicloartanona.
Gijon, 2003.	Terpenos y ácido kaurenóico.

4.2. *Acalypha monostachya* Cav. (Hierba del pastor)

4.2.1. Etnobotánica

Acalypha monostachya cuenta con antecedentes etnobotánicos, dentro de la flora medicinal del Valle del Mezquital, Hidalgo y del Valle de Tehuacán-Cuicatlán que se encuentra entre Puebla y Oaxaca (Tabla 4).

Tabla 4. Estudios etnobotánicas de *A. monostachya*.

AUTOR	ANTECEDENTE
Rosas, 2003.	<i>A. monostachya</i> se utiliza en el baño para parturientas, granos, infección de heridas, quemaduras e inflamación en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán.
Dzib y Moo, 2009.	<i>A. monostachya</i> se utiliza para lavar heridas con sangre y granos con pus y para desinfectar la garganta en forma de té sin tomárselo, se hacen gárgaras por 20 min, en el Valle del Mezquital.

4.2.2. Actividades biológicas

En *A. monostachya* solo se ha evaluado la actividad antimicrobiana y antioxidante. Sin embargo, el género cuenta con una amplia investigación en cuanto a sus diversas actividades biológicas (Tabla 5).

Tabla 5. Investigaciones de las actividades biológicas de *A. monostachya*

AUTOR	ANTECEDENTE
Canales et al., 2011.	Reportó que el extracto hexánico y metanólico de las partes aéreas tienen actividad antibacteriana en <i>S. aureus</i> y cuenta con actividad antioxidante por la presencia de ácido benzoico. Además, se detectaron mediante HPLC-DAD UV compuestos flavonoides del tipo flavona, flavanona y flavonol.
Seebaluck et al., 2015. (Género <i>Acalypha</i>)	Realizaron un resumen de la etnofarmacológica y fitoquímica del género. Varias especies cuentan con diversas actividades biológicas como: antimicrobiana, antidiabética, antioxidante, antiinflamatoria, larvívica, anticancerosa, analgésica y cicatrizantes entre otras.

4.2.3. Compuestos químicos reportados del género *Acalypha*

En *A. monostachya* se han identificado la presencia de compuestos fenólicos. Sin embargo, hasta el momento no se han aislado o elucidado sus estructuras. No obstante, en el género se han aislado algunos metabolitos (Tabla 6).

Tabla 6. Compuestos químicos identificados hasta el momento en el género *Acalypha*.

AUTOR	COMPUESTO QUÍMICO	ESPECIES
Rascón-Valenzuela <i>et al.</i> , 2015.	β -sitosterol	<i>A. californica</i> y <i>A. australis</i>
Seebaluck <i>et al.</i> , 2014.	β -sitosterol	<i>A. alnifolia</i> , <i>A. brachystachya</i> y <i>A. pheoides</i>
Nahrstedt, 1982.		<i>A. fructicosa</i>
Nahrstedt, 2006.	Kaempferol y sus formas glicósiladas	<i>A. indica</i>
Noumedem <i>et al.</i> , 2013.		<i>A. hispidina</i>
Nahrstedt, 1982.	Quercetina se encuentra frecuentemente en sus formas glicósiladas	<i>A. californica</i>
Nahrstedt, 2006.		<i>A. australis</i> y <i>A. hispidina</i>
Reiersen <i>et al.</i> , 2013.		<i>A. fructicosa</i>
Hungeling <i>et al.</i> , 2009.	Acalifina	<i>A. indica</i>
Seebaluck <i>et al.</i> , 2014.		<i>A. siamensis</i>

4.3. *Verbesina crocata* (Cav.) Less (Arnica)

4.3.1. Etnobotánica

Verbesina crocata cuenta con reportes de estudios etnobotánicos de su uso para el tratamiento de afecciones de la piel y ginecológicas (Tabla 7).

Tabla 7. Estudios etnobotánicos de *V. crocata*.

AUTOR	ANTECEDENTE
Standley 1920-1926 (Biodiversitylibrary, 2018)	La planta es reportada para el tratamiento de heridas en la piel y varias afectaciones dermatológicas.
Avilés, 1985; Baytelman, 1980; Del Amo, 1979; Ochoa, 1989; Soto, 1987. (Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana, 2009)	El uso medicinal de esta planta al que más se hace referencia, es contra afecciones ginecológicas como la retención de la placenta en el postparto (Morelos). Para limpiar la matriz, se administra el cocimiento de la raíz por vía oral y en ayunas (Michoacán). Asimismo, “para curar por dentro a la parturienta” se le practican baños con la infusión y se le da de beber una tacita de ésta (Guerrero).
Rosas, 2003.	En el Valle de Tehuacán-Cuicatlán el uso que se le da principalmente es para el tratamiento de aftas mediante gárgaras, utilizada para tratar parturientas y restaurar la cadera, infección de heridas, garganta irritada, tratamiento para ronchas, quemaduras y curación de los granos provocados por la varicela.

4.3.2. Actividades biológicas

La planta *V. crocata* ha sido evaluada anteriormente en sus actividades antimicrobianas, cicatrizantes y antiinflamatoria (Tabla 8).

Tabla 8. Investigaciones de las actividades biológicas de *V. crocata*.

AUTOR	ANTECEDENTE
Canales <i>et al.</i> , 2005.	Reportaron que el extracto hexánico de las partes aéreas tienen actividad antibacteriana sobre <i>S. aureus</i> .
Rodríguez, 2014.	Evaluó el extracto acuoso y su actividad antiinflamatoria en fase aguda, utilizando el modelo de inducción de edema en cojinete plantar por carragenina en ratón CD-1. El tratamiento se administró vía sonda gástrico y se observó el mayor efecto a concentración de 50 mg/K.
Guerrero, 2016.	Estimaron la toxicidad del extracto acuoso de <i>V. crocata</i> en modelo de ratón CD-1 bajo un ensayo agudo y sub-crónico con una administración de 100mg/K/día vía oral. Los resultados indican que no produce efectos evidentes de toxicidad.
García, 2016.	Reporta que el extracto acuoso no tiene actividad cicatrizante en ratón CD-1 y tampoco es antimicrobiano. Sin embargo, no se indica la procedencia de la planta y de qué órgano se obtuvo el extracto.

4.3.3. Compuestos químicos reportados para el género *Verbesina*

V. crocata hasta el momento de la revisión y a pesar de contar con diversos antecedentes de la evaluación de sus actividades biológicas, no hay estudios sobre la química de la planta. Sin embargo, el género si ha sido investigado (Tabla 9).

Tabla 9. Compuestos químicos identificados en el género *Verbesina*.

AUTOR	COMPUESTO QUÍMICO	ESPECIES
Herz y Kumar, 1981.	Verbensindiol (sesquiterpeno)	<i>V. virginica</i>
Ortega <i>et al.</i> , 1985.	Lactonas sesquiterpénicas	<i>V. astricta</i> y <i>V. coahuilensis</i>
Wagner <i>et al.</i> , 1974; Glennie y Jain, 1980.	Ramnocitrina (Flavonoide)	<i>V. myriocephala</i>
Glennie y Jain, 1980	Quercetina (Flavonoide)	<i>V. encelioides</i>
Mora <i>et al.</i> , 2013	Sesquiterpenos (eudesmanos, germacranos y lactonas sesquiterpénicas) Alcaloides (Derivados de guanidina) Flavonoides (Glucósidos de quercetina y glucósido ramnocitrina- 3-glucurónido)	Revisión del género: se han caracterizado alrededor de 200 componentes. Siendo los más abundantes los terpenos (75.4%), seguidos de los aromáticos (12.8%), flavonoides (3.5%), alcaloides (2.9%), acetilenos (2.5%) y otros (2.9%).

5. METODOLOGÍA

5.1. Metodología en general

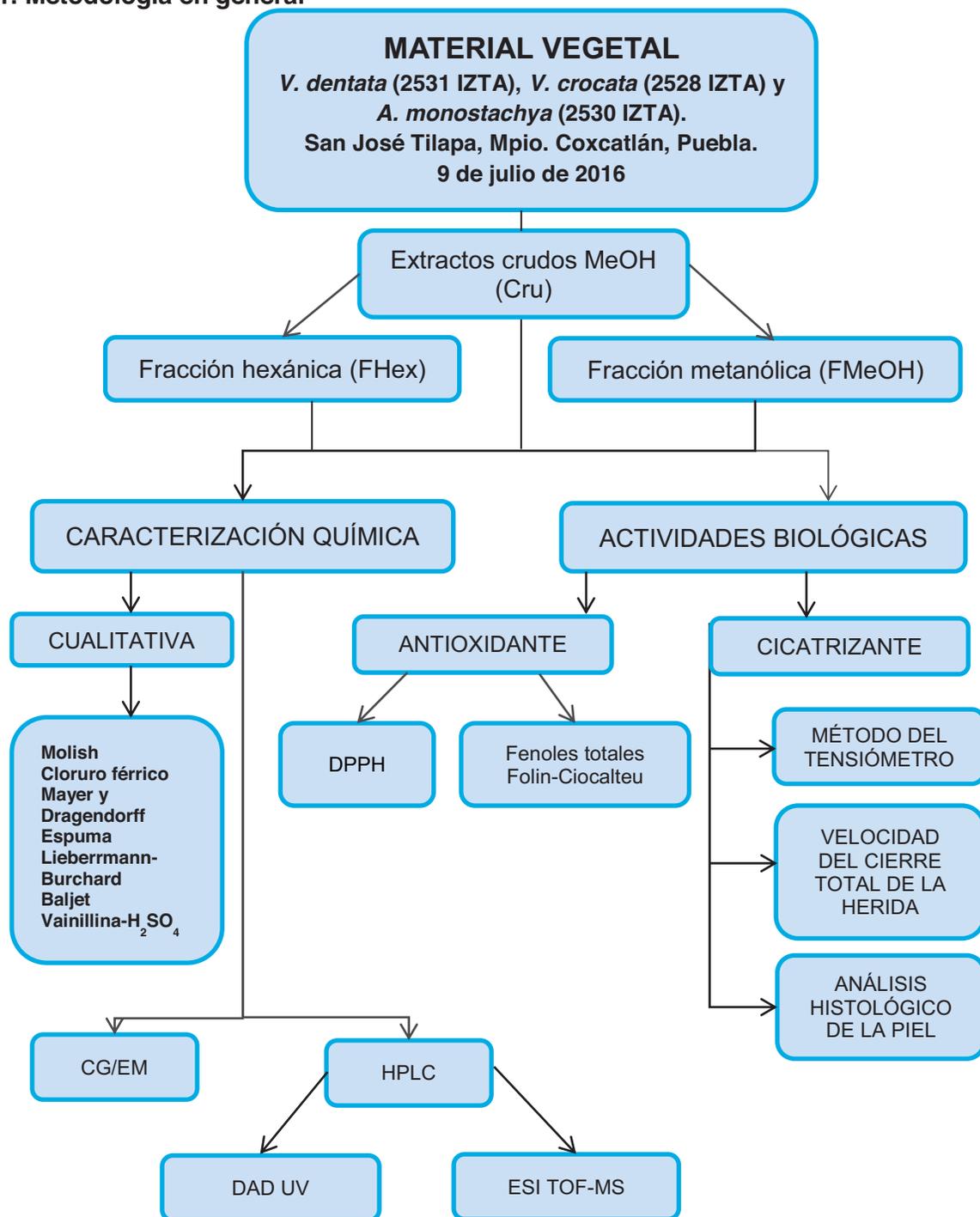


Fig. 1. Metodología en general.

5.2. Material vegetal, extractos y sus fracciones.

Las partes aéreas de las plantas *V. crocata* (tallos y hojas), *V. dentata* (tallos y hojas) y *A. monostachya* (tallos, hojas y flores) se recolectaron en la comunidad de San José Tilapa, Coxcatlán, Puebla, que se encuentra dentro del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. La recolecta se llevó a cabo el 9 de julio del 2016. Un kilogramo de material fresco aproximadamente se secó a temperatura ambiente. El material seco y molido se puso a macerar en frío con metanol. Después, se concentró el extracto a presión reducida con un equipo Heidolph Mod. Laborota 4000. De este extracto metanólico concentrado se separó una parte para hacer las pruebas que se llamará de aquí en adelante extracto crudo (Cru). Después el extracto restante fue sometido a un fraccionamiento con hexano y metanol, de aquí se obtuvieron las fracciones hexánica (FHex) y la metanólica (FMeOH).

También, se prepararon ejemplares para herborizarlos para su identificación y registro en el herbario IZTA de la FES-Iztacala de la UNAM.

5.3. Caracterización fitoquímica de los extractos y las fracciones

5.3.1. Detección preliminar de los principales grupos de metabolitos por pruebas colorimétricas

La detección de los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos y fracciones se llevó a cabo mediante reacciones colorimétricas y el revelado de cromatografía de capa fina. Para la detección de terpenos se realizó una cromatografía en capa fina que posteriormente fue revelada con vainillina-ácido sulfúrico. Los alcaloides fueron identificados con los reactivos de Dragendorff y Mayer. Los glicósidos fueron detectados con el reactivo de Molish. Para fenoles se utilizó una solución de cloruro férrico. El reactivo de Baljet se utilizó para detectar lactonas sesquiterpénicas. Mientras que para los esteroides se usó el reactivo de Liebermann-Buchard. Para la detección de saponinas se agitó una solución de cada muestra en agua y se observó la persistencia de la espuma por un minuto (Nolasco, 2014).

Para realizar las pruebas se usaron soluciones del extracto o las fracciones a una concentración de 1mg/mL (Tabla 10).

Tabla 10. Pruebas de detección de los principales grupos de metabolitos secundarios.

GRUPO DE METABOLITOS	REVELADOR/AGENTE CROMÓGENO	MÉTODO
Terpenos	Vainillina-ácido sulfúrico	Revelado de cromatografía en capa fina
Alcaloides	Reactivo de Dragendorff Reactivo de Mayer	Precipitado o color naranja Precipitado color blanco
Glucósidos	Molish	Halo color morado
Fenoles	Cloruro férrico	Coloración de verde-azul
Saponinas	Espuma	Persistencia de espuma
Lactonas sesquiterpénicas	Reactivo de Baljet	Coloración naranja o roja oscura
Esteroides	Liebermann-Burchard	Color verde intenso

5.3.2. Análisis químico de las FHex por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)

Las FHex de *V. dentata*, *A. monostachya* y *V. crocata* fueron sometidas a un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/EM). El equipo utilizado fue un cromatógrafo (Agilent Technologies) modelo 6850, cuya columna HP-5MS (Aligent Technologies) presenta medidas de 30 m de largo, 0.25 mm de diámetro y película de 0.25 μm que a su vez esta acoplada a un espectrómetro de masas (Aligent Technologies modelo HP-5MS). El gas utilizado como fase móvil fue helio (He). El tipo de inyección fue Split. Se inyectaron 2 μL de muestra (1.2 mg/200 μL). El tiempo de análisis fue de 25 minutos para cada una de las muestras y la identificación de compuestos se llevó a cabo por medio de la base de espectros de la biblioteca NIST, versión 8.0.

5.3.3. Análisis químico de los Cru y las FMeOH por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

5.3.3.1. Análisis químico de los Cru y las FMeOH por HPLC (DAD-UV)

Las FMeOH y los Cru se sometieron a un análisis de HPLC DAD UV. Se empleó un equipo Hewlett-Packard modelo 1100 donde se utilizó una columna C18 (4.6 mm x 2 x 50 mm). La fase móvil isocrática fue de metanol (25%), acetonitrilo (25%), agua (50%), con ácido ortofosfórico al 0.1%. Cada corrida duro 30 min y el flujo fue de 1mL/min. Se obtuvo,

el espectro de absorción DAD-UV de los compuestos encontrados y se compararon con lo reportado para compuestos de por Mabry y colaboradores (1970) y Harborne (1973).

5.3.3.2. Análisis químico de los Cru y sus FMeOH por HPLC (TOF LC/EM)

Se inyectaron 10 μ L de las FMeOH y los Cru que se sometieron al análisis de HPLC (TOF LC/EM). Se empleó un equipo HPLC 1260 Infinity y TOF LC/MS modelo 6230. Columna Kinetex 2.6 μ C18100 Å, largo 150 x 2.1 mm de diámetro. La fase móvil que se utilizó es: A) agua 89%, acetonitrilo 10% y ácido fórmico 1%. (150 mL); B) metanol 89%, acetonitrilo 10% y ácido fórmico 1% (100 mL). Con un gradiente de I) Fase A 100% del 0 a 3 minutos; II) Fase A 65% y Fase B 35% del minuto 3 al 11; III) Fase A 55% y Fase B 45% del minuto 11 al 20; IV) Fase B 100% del minuto 20 al 60. Flujo constante de 0.2 mL/min. Cada corrida duro 60 min.

El método de análisis fue el establecido por el Laboratorio Nacional en Salud: Diagnóstico Molecular y Efecto Ambiental en Enfermedades Crónico-degenerativas de la FES-Iztacala de acuerdo al procedimiento de PEM04 análisis de compuestos fenólicos. Se obtuvo la masa molecular (m/z) de los compuestos y se comparó con patrones de referencia que se encuentran en la biblioteca del equipo.

5.4. Actividades evaluadas

5.4.1. Evaluación de la actividad antioxidante de los Cru y las FMeOH sobre el radical DPPH

La actividad antioxidante se evaluó mediante la capacidad de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) (Guija-Poma *et al.*, 2015). Este método está basado en la reducción del radical DPPH por los extractos a evaluar. El DPPH es un radical que presenta una coloración púrpura con un máximo de absorción a 515 nm, cuando este es reducido por el compuesto antioxidante la coloración se torna amarilla. Para llevar a cabo dicho método, se realizaron diluciones de cada uno de los extractos crudos, así como las FMeOH (10-500 μ g/mL). En una placa de 96 pozos se agregaron 50 μ L de cada dilución de las muestras a evaluar a 150 μ L de una solución de DPPH (250 μ M) en metanol. La

mezcla se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad. Finalmente, se midió la absorción a 515 nm. Como control positivo se utilizó quercetina (1-10 µg/mL).

Los datos se expresaron como porcentaje de decoloración, obtenido mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de decoloración} = \text{Absorbancia}_{\text{muestra}} / \text{Absorbancia}_{\text{DPPH}} \times 100$$

Con el porcentaje de decoloración, a partir de un análisis de regresión, se obtuvo la concentración eficaz media (CA₅₀), es decir, la cantidad necesaria de una antioxidante para reducir en un 50% los radicales libres, por lo tanto, un valor bajo de (CA₅₀) representa una alta capacidad antioxidante. Se realizaron ocho repeticiones de cada medición en tres experimentos independientes.

5.4.2. Cuantificación de fenoles totales (Folin-Ciocalteu) de los Cru y las FMeOH.

El reactivo de Folin-Ciocalteu tiene una coloración amarilla que en presencia de un fenol, se reduce tomando una coloración azul, lo cual permite medir a 760 nm (Muñoz-Bernal *et al.*, 2017). Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico que es utilizado como estándar de referencia. Para lo cual, se realiza una curva patrón con diferentes concentraciones de ácido gálico (2-10 µg en un volumen final de 3 mL).

Para el análisis de los extractos crudos y las FMeOH, se prepararon soluciones estándar (1000 µg/mL) en agua. Las fracciones primero se suspendieron en 100 µL de metanol, para posteriormente aforar los 5 mL de agua. Para realizar la determinación se colocó una alícuota de 100 µL (100µg de extracto) de dichas suspensiones a 1150 µL de agua destilada, posteriormente se agregan 250 µL del reactivo de Follin a cada tubo. Después de cinco minutos se adicionan 1500 µL de solución de Na₂CO₃ (200 g/L). Los tubos se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Transcurrido ese tiempo se determinó la absorbancia a 750 nm. Cada concentración se determinó por triplicado.

Con la curva patrón de ácido gálico, se realizó un análisis de regresión lineal y se interpolaron las absorbancias obtenidas de las muestras. Dichos resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco.

5.4.3. Actividad cicatrizante de los extractos crudos de *V. dentata*, *A. monostachya* y *V. crocata*.

5.4.3.1. Método del tensiómetro y cierre total de la herida

Un parámetro empleado para evaluar la actividad cicatrizante es la resistencia de la piel a la fuerza de tensión necesaria para abrir la herida expresada en (g), es una medida importante, ya que refleja la organización subdérmica de las fibras de colágeno recién sintetizadas y por lo tanto el avance en el proceso de cicatrización (Razaini *et al.*, 2004).

Ratones machos procedentes del Bioterio de la FES Iztacala-UNAM de la especie *Mus musculus* cepa CD-1 de 6 a 8 semanas de edad, se utilizaron para evaluar la actividad cicatrizante de los extractos crudos de las tres especies vegetales. Los ratones fueron separados en grupos de cinco animales cada uno con los siguientes tratamientos experimentales: 1) control negativo (vehículo-Vaselina), la Vaselina es el vehículo del medicamento de referencia y por ende de los tratamientos; 2) control positivo Recoverón® (Acexamato de sodio) en ungüento, este es un medicamento indicado para el tratamiento de heridas sin infección, donde se desea acelerar el proceso de cicatrización tales como las generadas por traumatismos, procesos quirúrgicos, úlceras varicosas, así como quemaduras de primero y segundo grado; 3) Extracto crudo de *V. dentata*; 4) Extracto crudo de *A. monostachya*; 5) Extracto crudo de *V. crocata*; Para preparar los extractos se mezclaron al 5% en Vaselina; 6) testigo, a estos ratones no se les realizó ninguna herida y no se aplicó ningún tratamiento.

Durante el período de experimentación los animales se mantuvieron en condiciones estándar de temperatura, humedad e iluminación ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, alternando ciclos de 12 horas luz-obscuridad), con alimento y agua *ad libitum*.

A los ratones se les depiló el dorso con crema *Nair*® piel sensible. 24 horas después fueron anestesiados con isoflurano aproximadamente 100 μL (99.9%) por individuo y se les realizó una herida incisional de 1.5 cm. La herida se mantuvo sin ninguna clase de cubierta. Posteriormente, se aplicaron los diferentes tratamientos cada 24 horas, durante 14 días consecutivos.

La longitud de la herida se midió durante los 14 días de tratamiento e incluyendo el día del sacrificio, con ayuda de un vernier digital (SURTEK®) (Gupta y Jain, 2011). Este parámetro permitió determinar la velocidad y el tiempo del cierre de total de la herida a lo largo del proceso de cicatrización. Los resultados se expresaron en mm.

Al concluir el experimento los ratones se sacrificaron en una cámara de CO₂. Después, se midió la fuerza de tensión (g) necesaria para abrir las heridas. Para ello se utilizaron dinamómetros calibrados en 100, 500 y 1000 gramos. Los resultados se reportaron en fuerza de tensión representada en gramos.

Todos los procedimientos experimentales con los animales se efectuaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, referente al uso y manejo de animales de laboratorios usados en investigación científica y se encuentra aprobado por el Comité de Bioética de la FES-Iztacala.

5.4.3.2. Análisis histológico

Con la finalidad de estudiar la evolución de la cicatrización en los grupos experimentales a nivel histológico se realizó un protocolo paralelo al del tensiómetro con las mismas características: grupos experimentales, tamaño de la herida, aplicación de tratamientos (extractos crudos), medidas de la longitud de la herida y sacrificio con CO₂. Para el análisis histológico se tomó la muestra de piel de la herida y piel adyacente como se muestra en la figura 2 y se procesaron de acuerdo a la técnica histológica estándar.

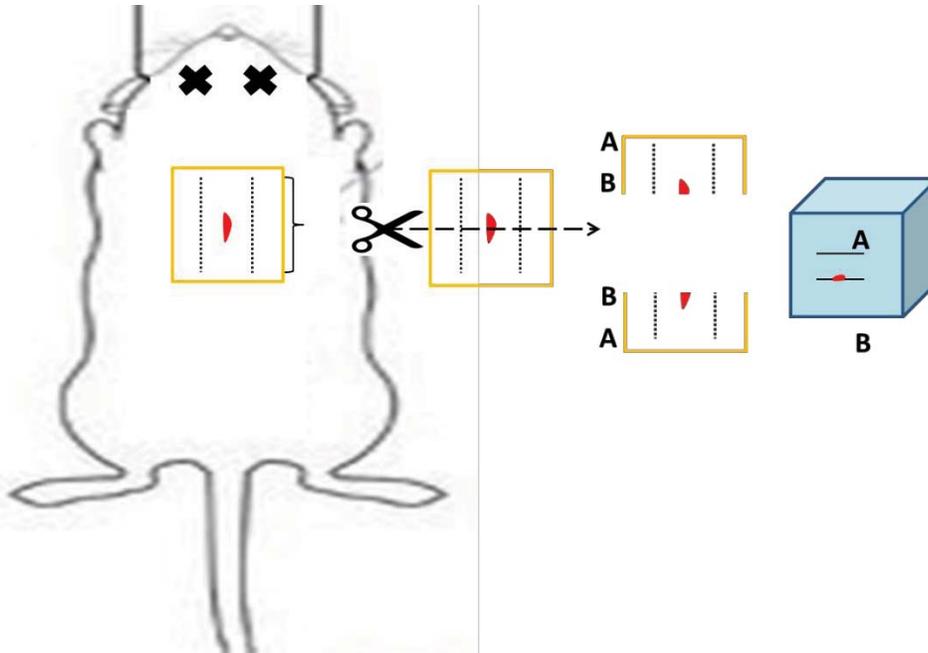


Fig. 2. Montaje en parafina para obtener la parte distal y media de la herida. A=la parte distal y B=la parte media.

Las muestras de piel se fijaron con para-formaldehído al (10%) en buffer de fosfatos (0.1 M) pH 7.2. 24 horas después se lavaron con agua corriente y se deshidrataron mediante un tren de alcoholes al 70, 80, 90, 96 y 100%. Después se aclararon con dos baños de xileno y se incluyeron en parafina. Durante la inclusión, la muestra de piel que se fijó se cortó a la mitad para obtener la parte distal de la herida la cual se consideraría con la parte más cicatrizada y la parte media como la región menos cicatrizada (Fig. 2). Posteriormente, se cortaron secciones de 3 μ m en un micrótomó (Leica) y se montaron en un baño de flotación con gelatina. Las laminillas se desparafinaron con xilol y se realizaron las tinciones con Hematoxilina-Eosina y tricrómica de Masson para la observación de colágeno. Finalmente, se aplicó entellan, para obtener preparaciones permanentes.

Los tejidos se examinaron en un microscopio óptico (Leica modelo DM 5000) con cámara digital, se observaron a distintos aumentos reales (40X, 100X y 400X). Para el diagnóstico histológico se determinó el tamaño de la herida como regenerada, chica, mediana y grande en la zona de cicatrización de la herida (ZCH). También, la neoformación de epidermis y en la zona de la dermis se evaluó el tejido de granulación, en el que se consideró la cantidad de vasos de neoformación, fibras de colágeno (grosor y disposición)

e identificación de tipos celulares como neutrófilos y fibroblastos (Gantwerker y Hom, 2012).

Tabla 11. Características analizadas para el diagnóstico histológico (Gantwerker y Hom, 2012).

	PROCESO	PARÁMETRO
Epidermis	Re-epitelización	<ul style="list-style-type: none"> • Normal • Hiperplasia • Costra
	Tejido de granulación	<ul style="list-style-type: none"> • Contracción de la herida • Vasos de neoformación • Congestión de vasos sanguíneos • Neutrófilos • Fibroblastos • Colágeno Tipo I y Tipo III
Dermis	Matriz extracelular	<ul style="list-style-type: none"> • Colágeno Tipo III • Disminución de vasos sanguíneos • Ausencia de neutrófilos y fibroblastos.

Los cortes y el análisis histológico se hicieron en el Laboratorio de Histología de la Unidad de Morfofisiología y Función de la FES Iztacala, con la colaboración del Biól. José del Carmen Benítez Flores y la M. en C. María del Rosario González Valle.

5.5. Análisis estadístico

El análisis de los resultados de la actividad antioxidante y cicatrizante con el método tensiométrico; primero se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para evaluar si los datos son normales o no con un 95% de confianza. Posteriormente, para determinar si había diferencias significativas entre los tratamientos se aplicó un análisis de varianza de un factor (ANOVA >0.05). Para el cierre de la herida se efectuó un análisis de varianza de un factor de medidas repetidas (ANOVA >0.05) y además se aplicó una prueba de Tukey's del 95% de confianza.

6. RESULTADOS

6.1. Material vegetal y extractos

La determinación de las especies fue realizada por la Dra. Ma. Edith López Villafranco, responsable del Herbario IZTA de la FES-Iztacala. Los datos con los que fueron integradas a la Colección Etnobotánica del Herbario IZTA, son los siguientes (Tabla 12):

Tabla 12. Datos registrados en el Herbario IZTA de la FES-Iztacala

Nombre científico	Familia Botánica	Nombre popular	No. de registro
<i>Verbesina crocata</i> (Cav.) Less. Ex DC.	ASTERACEAE	“Árnica”	2528 IZTA
<i>Acalypha monostachya</i> Torr.	EUPHORBIACEAE	“Hierba del pastor”	2530 IZTA
<i>Viguiera dentata</i> (Cav.) Spreng.	ASTERACEAE	“Chimalacate”	2531 IZTA

Los rendimientos de los extractos se obtuvieron por diferencia de peso tomando en cuenta el material vegetal utilizado. Posteriormente, se realizó una fracción hexánica y metanólica a partir del extracto crudo. El peso (g) y los rendimientos (%) del Cru, la FMeOH y la FHex se muestran a continuación (Tabla 13):

Tabla 13. El peso del extracto y el rendimiento de los Cru, FMeOH y FHex. Se determinó el porcentaje con respecto al peso seco.

Planta	Peso seco (g)	Peso del extracto (g) y rendimiento (%)		
		Crudo	FMeOH	FHex
<i>V. crocata</i>	424.5	73.75g (17%)	30.5g (7.2%)	20.5g (4.8%)
<i>V. dentata</i>	497.7	50.4g (10.1%)	35g (7%)	4g (0.8%)
<i>A. monostachya</i>	432.5	77.1g (17.82%)	40.5g (9.6%)	20g (4.6%)

A partir de 1 Kg de planta seca.

Dentro de los resultados de los rendimientos, el que obtuvo mayor contenido de sólidos totales, fue *A. monostachya* con un 17.82%, seguida de *V. crocata* con el 17% y con el menor rendimiento *V. dentata* con un 10.1%.

6.2. Caracterización fitoquímica de los Cru, FMeOH y FHex

6.2.1. Detección preliminar de los principales grupos de metabolitos secundarios por pruebas colorimétricas

En los Cru, la FHex y la FMeOH de las plantas *V. dentata*, *A. monostachya* y *V. crocata* se identificaron la presencia de fenoles, alcaloides, glicósidos, saponinas, terpenos, lactonas sesquiterpénicas y esteroides, como se observa en las tablas 14,15 y 16.

6.2.1.1. *V. dentata*

La especie *V. dentata* dio reacción positiva en el Cru y la FMeOH a la prueba de cloruro férrico, la cual indica la presencia de fenoles. En la prueba de alcaloides sólo dio positivo a la prueba de Dragendorff en la FHex. En cuanto a la reacción de Molish dio positivo a la presencia de compuestos glicósilados en mayor cantidad en el Cru, seguido de la FMeOH y finalmente con poca reacción en la FHex. Para saponinas sólo hubo una ligera formación de espuma en el Cru. La reacción de vainillina-ácido sulfúrico indicó que tanto la FHex y el Cru tiene terpenos. Además con la reacción de Baljet la reacción indicó que cuenta con lactonas sesquiterpénicas con mayor presencia en el Cru, con poca reacción en las dos fracciones. Finalmente, la reacción de Liebermann-Buchard reveló la presencia de esteroides con mayor reacción en FHex, poca reacción en el Cru y su FMeOH (Tabla 14).

Tabla 14. Reacciones colorimétricas del Cru, la FHex y la FMeOH de *V. dentata*.

METABOLITO	REACTIVO	<i>V. dentata</i>		
		FMeOH	FHex	Cru
Fenoles	FeCl ₃	++	-	++
Alcaloides	Mayer	-	-	-
	Dragendorff	-	+	-
Glicósidos	Molish	+++	+	++
Saponinas	Espuma	-	-	+
Terpenos	Vainillina	-	+	+
Lactonas Sesquiterpénicas	Baljet	+	+	+++
Esteroides	Liebermann-Buchard	+	+++	+

* El signo (+) significa que el resultado es positivo, (+++) mayor reacción positiva (++) media, (*) poca y (-) es negativo.

6.2.1.2. *A. monostachya*

A. monostachya en su extracto crudo y la FMeOH dio reacción positiva en la prueba con cloruro férrico, la cual indica la presencia de fenoles. En la prueba de alcaloides dio una ligera reacción positiva con la prueba de Dragendorff en el Cru y la FMeOH. En cuanto a la prueba de Molish dio positivo a la presencia de compuestos glicósilados en mayor reacción en el extracto FMeOH, después en el Cru y finalmente con poca reacción en la FHex. Para la prueba de saponinas no hubo formación de espuma por lo cual la prueba se considera negativa. La reacción de vainillina-ácido sulfúrico indicó que tanto la FHex y el extracto crudo tienen terpenos. Además con la reacción de Baljet la reacción indicó que cuenta con lactonas sesquiterpénicas con mayor presencia en el Cru y con poca reacción en la FHex. Finalmente, la reacción de Liebermann-Buchard reveló la presencia de esteroides en el Cru y su FHex (Tabla 15).

Tabla 15. Reacciones colorimétricas del Cru, la FHex y la FMeOH de *A. monostachya*.

METABOLITO	REACTIVO	<i>A. monostachya</i>		
		FMeOH	FHex	Cru
Fenoles	FeCl ₃	+++	-	+++
Alcaloides	Mayer	-	-	-
	Dragendorff	-	+	+
Glicósidos	Molish	+++	+	++
Saponinas	Espuma	-	-	-
Terpenos	Vainillina	-	+	+
Lactonas Sesquiterpénicas	Baljet	-	+	+++
Esteroides	Liebermann-Buchard	+	-	+++

* El signo (+) significa que el resultado es positivo, (+++) mayor reacción positiva (++) media y (-) es negativo.

6.2.1.3. *V. crocata*

En *V. crocata* la prueba con cloruro férrico para determinar la presencia de fenoles tuvo una reacción positiva en mayor medida en la FMeOH y en menor cantidad en el Cru. La prueba de alcaloides en *V. crocata* dio positivo con el reactivo de Mayer y Dragendorff en el Cru y la FHex. La identificación de compuestos glicósilados con la prueba de Molish fue positiva en la FMeOH, el Cru y la FHex. La prueba de persistencia de la espuma nos indica que no hay presencia de saponinas. En cuanto a la identificación de compuestos

terpénicos, la prueba de vainillina tuvo resultados positivos en el Cru y la FHex. La prueba de Baljet indica que *V. crocata* no cuenta con lactonas sesquiterpénicas. Mientras que la prueba para esteroides por la reacción de Liebermann-Buchard indica que estos compuestos están presentes de manera abundante en la FHex (Tabla 16).

Tabla 16. Reacciones colorimétricas del Cru, la FHex y la FMeOH de *V. crocata*.

METABOLITO	REACTIVO	<i>V. crocata</i>		
		FMeOH	FHex	Cru
Fenoles	FeCl ₃	++	-	+
Alcaloides	Mayer	-	+	+
	Dragendorff	-	+	+
Glicósidos	Molish	+++	+	++
Saponinas	Espuma	-	-	-
Terpenos	Vainillina	-	+	+
Lactonas Sesquiterpénicas	Baljet	-	-	-
Esteroides	Liebermann-Buchard	-	+++	-

* El signo (+) significa que el resultado es positivo: (+++) mayor reacción positiva, (++) media, (+) baja y (-) es negativo.

6.2.2. Análisis químico de las FHex por CG/EM.

Para identificar y cuantificar los principales componentes volátiles y semivolátiles presentes en las FHex de *V. dentata*, *V. crocata* y *A. Monostachya*, se llevó a cabo la técnica de CG/EM. A continuación se describen los compuestos identificados en las siguientes secciones.

6.2.2.1. Compuestos de la FHex de *V. dentata* detectados por CG/EM

En *V. dentata* se tomaron en cuenta los compuestos con mayor abundancia del porcentaje total de la fracción hexánica y sus patrones de fragmentación. El lupeol es el compuesto más abundante con un 28.09% del total con un tiempo de retención (TR) de 16.360, seguido de escualeno con un 10.67% con un TR de 22.230, ácido palmítico 2.37% con un TR de 14.731 y vitamina E 2.29% con un TR de 17.322 (Tabla 17).

Tabla 17. Compuestos químicos detectados por CG/EM en la FHex de *V. dentata*.

TR	Compuesto químico	Porcentaje del total (%)
14.731	Ácido hexadecanóico o Ácido palmítico	2.37%
16.360	Lupeol	40.42%
17.322	Vitamina E	2.29%
22.230	Escualeno	10.67%

TR=tiempo de retención.

6.2.2.2. Compuestos de la FHex de *A. monostachya* detectados por CG/EM

En cuanto a la fracción hexánica de *A. monostachya* el compuesto detectado con mayor abundancia fue α -amirina 30.89% con un TR de 26.11, seguida de escualeno con un 14.21% un TR de 22.14 y ácido palmítico 3.85% con un TR 14.75 (Tabla 18).

Tabla 18. Compuestos químicos detectados por CG/EM en la FHex de *A. monostachya*.

TR	Compuesto químico	Porcentaje del total (%)
14.75	Ácido palmítico	3.85
22.24	Escualeno	14.21
26.11	α -Amirina	30.89

TR= tiempo de retención.

6.2.2.3. Compuestos de la FHex de *V. crocata* detectados por CG/EM

En la fracción hexánica de *V. crocata* se identificaron pocos compuestos, siendo el más abundante la vitamina E con un 31.16% del total y un TR 17.261 y 3,7,11,15-tetrametil-2-hexdecan-1-ol con un 15.43% un TR de 14.108 (Tabla 19).

Tabla 19. Compuestos químicos detectados por CG/EM en la FHex de *V. crocata*.

TR	Compuesto químico	Porcentaje del total (%)
14.108	3,7,11,15-Tetrametil-2-hexdecan-1-ol	15.43
17.261	Vitamina E	31.16

TR= tiempo de retención.

6.2.3. Análisis químico de los Cru y las FMeOH por HPLC

Para determinar la presencia de compuestos fenólicos en los extractos crudos y las FMeOH de *V. dentata*, *A. monostachya* y *V. crocata*, se llevó a cabo la técnica de HPLC DAD UV y HPLC ESI TOF/MS.

6.2.3.1. Análisis químico de los Cru y las FMeOH por HPLC-DAD-UV

6.2.3.1.1. Compuestos detectados en la FMeOH de *V. dentata* por HPLC-DAD-UV.

En la FMeOH de *V. dentata* se detectaron nueve compuesto con características tipo fenólico/flavonoide por HPLC-DAD-UV. Seis de ellos no fueron identificados debido a su baja concentración lo cual hizo que la interpretación del espectro no fuera posible. El tiempo de retención (TR), el posible tipo de compuesto, los λ_{\max} (nm) y el porcentaje del área se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Compuestos detectados por HPLC-DAD-UV en la FMeOH de *V. dentata* por su λ_{\max} .

TR	Posible tipo de compuesto	λ_{\max} (nm)	% Área
2.39	Fenólico	276	51.440
3.093	Flavonol	270, 354	25.541
4.025	Flavonol	254,360	15.915

TR=Tiempo de retención.

El primer compuesto con un λ_{\max} 276 nm (TR= 2.39 min), probablemente sea un compuesto fenólico simple, ya que estos cuentan generalmente con un λ_{\max} de entre 269 a 290 nm (Harborne 1973). Siendo los más cercanos el catecol que cuenta con un λ_{\max} 279 nm y el ácido gálico con λ_{\max} 272 (Harborne 1973).

El compuesto con TR= 3.093 probablemente se trate de un flavonol debido a que cuenta con dos λ_{\max} y además cuenta con un λ_{\max} entre 350-390 nm que caracteriza a este grupo (Harborne 1973). El λ_{\max} 354 nm es igual al compuesto quercetagina 3',4',5',6, 7-pentametil éter (Mabry *et al.*, 1970). El compuesto con λ_{\max} de 254 nm y 360nm (TR=4.025), puede tratarse de un flavonol glicosilado el arabinósido de quercetina (260, 360 nm) o la isoquercitina (258, 360 nm) (Mabry *et al.*, 1970).

6.2.3.1.2. Compuestos detectados en Cru de *V. dentata* por HPLC-DAD-UV

En el extracto crudo de *V. dentata* se detectaron doce compuestos con características del tipo fenólico/flavonoide por HPLC-DAD-UV. Siete de ellos no fueron identificados. El tiempo de retención, el posible tipo de compuesto, λ_{\max} (nm) y el porcentaje del área se muestran en la tabla 21.

Tabla 21. Compuestos detectados por HPLC-DAD-UV en el Cru de *V. dentata* por su λ_{\max}

TR	Posible tipo de compuesto	λ_{\max} (nm)	%Área
2.404	Fenólico	276	48.326
3.129	Flavonol	268, 350	22.196
3.904	Flavonol	254, 360	17.697
5.737	Flavonol	268, 350	(365nm)
6.452	Flavona	272, 302	3.385

TR=Tiempo de retención.

El primer compuesto con un λ_{\max} 276 nm (TR=2.404), probablemente sea un fenol simple que se encuentra en la FmeOH ya que tiene la misma λ_{\max} y tiempo de retención similar (Tabla 20).

Los metabolitos con TR= 3.129 y 5.737y tienen las mismas λ_{\max} 268 y 350 nm por lo cual posiblemente sea el mismo flavonol, ya que este grupo cuenta con el λ_{\max} entre 350-390 nm (Harborne 1973).

El pico con λ_{\max} 302 nm (TR=6.452) está cerca del rango característico de flavonas que van de los 304 a los 350 nm (Mabry *et al.*, 1970).

6.2.3.1.3. Compuestos detectados en FMeOH de *A. monostachya* por HPLC-DAD-UV

En la FMeOH de *A. monostachya* se detectaron cinco compuestos con características tipo fenólico/flavonoide por HPLC-DAD-UV. El tiempo de retención, el posible tipo de compuesto, λ_{\max} (nm) y el porcentaje del área se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Compuestos detectados por HPLC-DAD-UV en la FMeOH de *A. monostachya* por su λ_{\max} .

TR	Posible tipo de compuesto	λ_{\max} (nm)	%Área
2.408	Flavona	248, 296, 330	50.839
3.146	Flavona	246, 298, 328	34.739
4.359	Flavona	282, 326	9.917
6.082	Fenólico	274	4.331
12.645	Flavanona	238, 286	0.174

TR=Tiempo de retención.

Las sustancias que se detectaron probablemente sean flavonas. El primer compuesto tiene una λ_{\max} de 330 (TR=2.408) y es similar a 7-hidroxi-3',4'-dimetoxiflavona que tiene λ_{\max} 330. Mientras, en el caso del segundo TR=3.146 tiene el mismo al λ_{\max} 328 de la 4'7-dihydroxiflavona. El metabolito con TR=4.359 tiene una λ_{\max} 326 similar a la flavona sciadopitisina (Mabry et al., 1970).

En cuanto al λ_{\max} 274 (TR=6.082) probablemente sean del tipo fenólico, ya que tienen un λ_{\max} de entre 230-276 nm (Harborne 1973).

Por último, la posible flavanona (TR=12.645) tienen un λ_{\max} de 286 que coincide con el rango de 275-290 nm propuesto por Harborne (1973) para identificar flavanonas.

6.2.3.1.4. Compuestos detectados en el Cru de *A. monostachya* por HPLC-DAD-UV

En el extracto crudo de *A. monostachya* se detectaron diez compuesto de características tipo fenólico/flavonoide por HPLC-DAD-UV. El tiempo de retención, el posible tipo de compuesto, λ_{\max} (nm) y el porcentaje del área se muestran en la tabla 23.

Tabla 23. Compuestos detectados por HPLC-DAD-UV en el Cru de *A. monostachya* por su λ_{\max}

TR	Posible tipo de compuesto	λ_{\max} (nm)	%Área
2.370	Fenólico	276	32.869
2.942	Fenólico	276	7.814
3.174	Flavona	268,352	8.690
3.515	Flavona	254,354	7.495
3.941	Flavona	254,354	25.340
4.475	Flavona	254,354	11.609
7.087	Fenólico	272	5.056

TR=Tiempo de retención.

Las sustancias con λ_{\max} 276 (TR=2.370 y TR=2.942) y λ_{\max} 276 (TR=7.087) probablemente sean del tipo fenólico, ya que tienen un λ_{\max} de entre 230-276 nm (Harborne 1973).

Los compuestos con λ_{\max} 352 nm (TR=3.174) y con λ_{\max} 354 nm este rango es cercano al característico de flavonas que van de los 304 a los 350 nm (Mabry *et al.*, 1970).

6.2.3.1.5. Compuestos detectados en la FMeOH de *V. crocata* por HPLC-DAD-UV

En la FMeOH de *V. crocata* se detectaron diez compuesto con características tipo fenólico/flavonoide por HPLC-DAD-UV. Cuatro de ellos no fueron identificados debido a su baja concentración lo cual hizo que la interpretación del espectro no fuera posible. El tiempo de retención, el posible tipo de compuesto, λ_{\max} (nm) y el porcentaje del área se muestran en la tabla 24.

Tabla 24. Compuestos detectados por HPLC-DAD-UV en la FMeOH de *V. crocata* por su λ_{\max}

TR	Posible tipo de compuesto	λ_{\max} (nm)	%Área
2.423	Flavona	298, 328	35.664
3.143	Flavona	246, 296, 328	28.247
3.764	Flavona	286, 326	5.681
5.497	Fenólico	264	3.491
6.094	Fenólico	266	7.804
8.226	Flavona	240, 274, 306	4.337

TR=Tiempo de retención.

Las sustancias con TR= 2.423 y 3.143, y los mismos λ_{\max} 328 nm probablemente sean flavonas, ya que este grupo cuenta con el λ_{\max} entre 304 a 350 y son iguales al λ_{\max} 328 de la 4'-7-dihydroxiflavona. También, el compuesto con λ_{\max} 326 (TR=3.764) es el mismo que la de la flavona sciadopitina y el pico que tiene λ_{\max} 306 (TR=8.226) es similar al de 7-hydroxiflavona λ_{\max} 307 (Mabry et al., 1970).

El constituyente con λ_{\max} 264 (TR=5.497) y λ_{\max} 266 (TR=6.094) probablemente sean del tipo fenólico (Bholmann *et al.*, 1980) ya que tienen un λ_{\max} de entre 230-276 nm (Harborne, 1973).

6.2.3.1.6. Compuestos detectados en el Cru de *V. crocata* por HPLC-DAD-UV

En el extracto Cru de *V. crocata* se detectaron once compuestos con características tipo fenólico/flavonoide por HPLC-DAD-UV. Cuatro de ellos no fueron identificados, debido a su baja concentración lo cual hizo que la interpretación del espectro no fuera posible. El tiempo de retención, el posible tipo de compuesto, λ_{\max} (nm) y área se muestran en la tabla 25.

Tabla 25. Compuestos detectados por HPLC-DAD-UV en el Cru de *V. crocata* por su λ_{\max}

TR	Posible tipo de compuesto	λ_{\max} (nm)	%Área
2.422	Flavona	296, 326	34.898
3.144	Flavona	236, 300, 328	27.364
3.756	Flavona	284, 326	5.326
5.53	Fenólico	264	3.784
6.148	Fenólico	266	5.323
6.96	Flavona	330	2.598
8.099	Flavona	240, 272, 302	5.275

TR=Tiempo de retención.

Los compuestos detectados en el extracto crudo de *V. crocata* (Tabla 24) son los mismos que se encuentran en su FMeOH ya que cuentan con λ_{\max} y TR sumamente similares y en algunos casos iguales. Sin embargo, se muestra un compuesto diferente con una λ_{\max} de 330 (TR=6.96) el cual probablemente sea un flavona que ya que es similar a 7-hydroxi-3',4'-dimetoxiflavona que tiene λ_{\max} 330 (Mabry *et al.*, 1970).

6.2.3.2. Análisis químicos de los Cru y las FMeOH por HPLC/EM

6.2.3.2.1. Compuestos detectados en la FMeOH de *V. dentata* por HPLC/EM

En la FMeOH de *V. dentata*, se detectaron nueve sustancias del tipo fenólico/flavonoide por HPLC-ESI⁻-TOF-MS. Siete de ellos no fueron identificado (N.I), puesto que no coinciden con la base datos que tienen el equipo utilizado. El tiempo de retención, el posible compuesto y masa del ion molecular (m/z) en la tabla 26.

Tabla 26. Compuestos detectados por HPLC-ESI⁻-TOF-MS en la FMeOH de *V. dentata* por la masa del ion molecular.

TR	Posible compuesto	Ion Molecular (m/z)
2.045	Ác. gálico	169.0101
27.99	Baicaleina o apigenina*	269.0381
5.39	N.I.	183.0246
9.2	N.I.	633.063
17.69	N.I.	609.1362
29.268	N.I.	389.0781
30.33	N.I.	329.2242
30.87	N.I.	343.0735
31.37	N.I.	470.9775

N.I. No identificado, TR=Tiempo de retención. *Compuestos con masa similar presentes en especies del género.

Se encontraron dos posibles compuestos los cuales fueron: ácido gálico (170.12 g/mol) y baicaleina (270.24 g/mol) cuyas masas de sus iones moleculares son iguales a las registradas en la base de datos del equipo.

6.2.3.2.2. Compuestos detectados en el Cru de *V. dentata* por HPLC/EM

V. dentata en su extracto crudo se detectaron nueve constituyentes del tipo fenólico/flavonoide por HPLC-ESI⁻-TOF-MS. Pero, no fueron identificados (N.I) con la base de datos del equipo (Tabla 27).

Tabla 27. Compuestos detectados por HPLC-ESI-TOF-MS en el Cru de *V. dentata* por la masa del ion molecular.

TR	Posible compuesto	Ion Molecular (m/z)
16.21	N.I.	609.131
39.86	N.I.	299.2475
	N.I.	
	*Hispidulina ¹	
40.03	*Sorbifolina ¹	299.2478
	(flavona	
	ión molecular: 299.266)	
	*Luteolina7,4'-metileter ²	
40.48	(flavona	313.2631
	ión molecular: 313.293)	
41.155	N.I.	327.2786
41.65	N.I.	341.2941
42.85	N.I.	981.56
43.85	N.I.	758.5243
44.69	N.I.	815.4783

N.I. No identificado, TR=Tiempo de retención. *Compuestos con masa similar presentes en especies del género. 1) Schilling y Panero, 1988 y 2) Schilling, 1989.

Dentro de los compuestos detectados en el extracto Crudo de *V. dentata*, se encuentran metabolitos con masa similar a flavonas identificadas previamente en otras especies del género. Por ejemplo, en *V. greggii* se han identificado dos flavonas con la misma masa del ión molecular 299.266: hispidulina y sorbifolina, es una masa muy similar a la que se detectó con un TR=40.03 y 299.2478 (Schilling y Panero, 1988). También, se encontró un compuesto con masa de 313.2631 (TR=40.48) similar a la flavona luteolina 7,4'-metil éter con masa de del ión molecular 313.293 presente en *V. laciniata* (Schilling, 1989)

6.2.3.2.3. Compuestos detectados en la FMeOH de *A. monostachya* por HPLC/EM

A. monostachya en su FMeOH se detectaron cinco metabolitos del tipo fenólico/flavonoide por HPLC-ESI-TOF-MS. Pero, no fueron identificados (N.I) (Tabla 28).

Tabla 28. Compuestos químicos detectados por HPLC-ESI-TOF-MS en la FMeOH de *A. monostachya* por la masa del ion molecular.

TR	Posible compuesto	Ion Molecular (m/z)
15.33	N.I.	289.0991
15.87	N.I.	353.0734
17.35	N.I.	537.0841
18.36	N.I.	515.1024
30.1	N.I.	329.2195

N.I. No identificado, TR=Tiempo de retención.

6.2.3.2.4. Compuestos detectados en el Cru de *A. monostachya* por HPLC/MS

A. monostachya en su extracto Cru se detectaron nueve constituyentes del tipo fenólico/flavonoide por HPLC-ESI-TOF-MS. Pero, nueve no fueron identificados (N.I) con la base de datos del equipo. El único que mostró similitud con masa de 609.1269 (TR=16.34) similar al flavonol glicosilado rutina (quercetin-3-rutinósido) encontrado en *A. australis* (Dong *et al.*, 1994) y *A. hispida* (Noumedem *et al.*, 2013). El tiempo de retención, posible compuesto y masa del ion molecular (m/z) se muestran en la tabla 29.

Tabla 29. Compuestos detectados por HPLC-ESI-TOF-MS en el Cru de *A. monostachya* por la masa del ion molecular.

TR (min)	Posible compuesto	Ion Molecular (m/z)
	N.I.	
16.34	*Rutina ^{1,2} (609.521)	609.1269
39.88	N.I.	409.2468
40.06	N.I.	299.245
40.49	N.I.	313.26
40.91	N.I.	381.2438
41.11	N.I.	327.2753
41.29	N.I.	395.275
41.7	N.I.	409.275
46.6	N.I.	487.3615

N.I. No identificado. TR=Tiempo de retención. *Compuestos con masa similar presentes en especies del género. 1) Dong *et al.*, 1994 y 2) Noumedem *et al.*, 2013.

6.2.3.2.5. Compuestos detectados en la FMeOH de *V. crocata* por HPLC/EM

V. crocata en su FMeOH se detectaron catorce sustancias con características del tipo fenólico/flavonoide por HPLC-ESI-TOF-MS. Pero, no pudieron ser identificados (N.I). Solo se logró establecer que el compuesto con masa 195.9911 podría corresponder a un metabolito similar al ácido siríngico (masa del ión molecular: 197.174) el cual fue identificado en *V. sublobata* y *V. myriocephala* (Herz y Kumar 1980). El tiempo de retención, posible compuesto y masa del ion molecular (m/z) se muestran en la tabla 30.

Tabla 30. Compuestos detectados por HPLC-ESI-TOF-MS en la FMeOH de *V. crocata* por la masa del ion molecular.

TR	Posible compuesto	Ion Molecular (m/z)
17.304	N.I	537.0852
23.54	N.I	447.2356
28.49	N.I	327.2049
30.068	N.I	329.2201
31.81	N.I	1249.5632
32.24	N.I	1087.5137
33.039	N.I	955.4717
33.388	N.I	1291.5744
33.53	N.I	925.4619
33.73	N.I	1129.5232
34.18	*Ác. Siríngico ¹ (197.174)	195.9911
34.4	N.I	997.4816
42.89	N.I	981.5576
44.908	N.I	815.4775

N.I. No identificado, TR=Tiempo de retención, *Compuestos con masa similar presentes en especies del género. 1) Herz y Kumar 1980.

6.2.3.2.6. Compuestos detectados en el Cru de *V. crocata* por HPLC/EM

V. crocata en su extracto Cru se detectaron diez sustancias del tipo fenólico/flavonoide por HPLC-ESI-TOF-MS. Pero, ninguno pudo ser identificados (N.I) (Tabla 31).

Tabla 31. Compuestos detectados por HPLC-ESI-TOF-MS en el Cru de *V. crocata* por la masa del ion molecular.

TR	Posible compuesto	Ion Molecular (m/z)
17.304	N.I.	537.085
23.614	N.I.	447.2359
28.47	N.I.	327.2049
30.06	N.I.	397.2041
31.81	N.I.	1249.5626
32.25	N.I.	1087.5119
33.056	N.I.	655.4700
33.38	N.I.	1291.5683
33.55	N.I.	925.4586
33.75	N.I.	1129.5058

N.I. No identificado, TR=Tiempo de retención.

6.3. Actividad antioxidante de los Cru y de las FMeOH por el método DPPH

La actividad antioxidante de los extractos crudos y las FMeOH de cada una de las plantas fue evaluada por el método de reducción del DPPH. Dentro de los resultados siguientes se omiten los CA₅₀ de las fracciones hexánicas ya que fueron mayores a 640 ppm, este resultado indica que no cuentan con actividad antioxidante frente al radical DPPH.

6.3.1. Actividad antioxidante del Cru y la FMeOH *V. dentata*

La actividad antioxidante del Cru y de la FMeOH de *V. dentata* fue evaluada frente al radical DPPH (Fig. 3). El extracto crudo tuvo una capacidad antioxidante media (CA₅₀) de 45.89 ± 1.63 µg/mL y la fracción metanólica fue de CA₅₀ de 53.01 ± 2.25 µg/mL. Como control positivo se utilizó quercetina con una CA₅₀ de 5.01 ± 0.1 µg/mL. Este es un antioxidante conocido. El análisis estadístico indico que no tuvieron diferencias significativas el Cru y FMeOH en la actividad antioxidante.

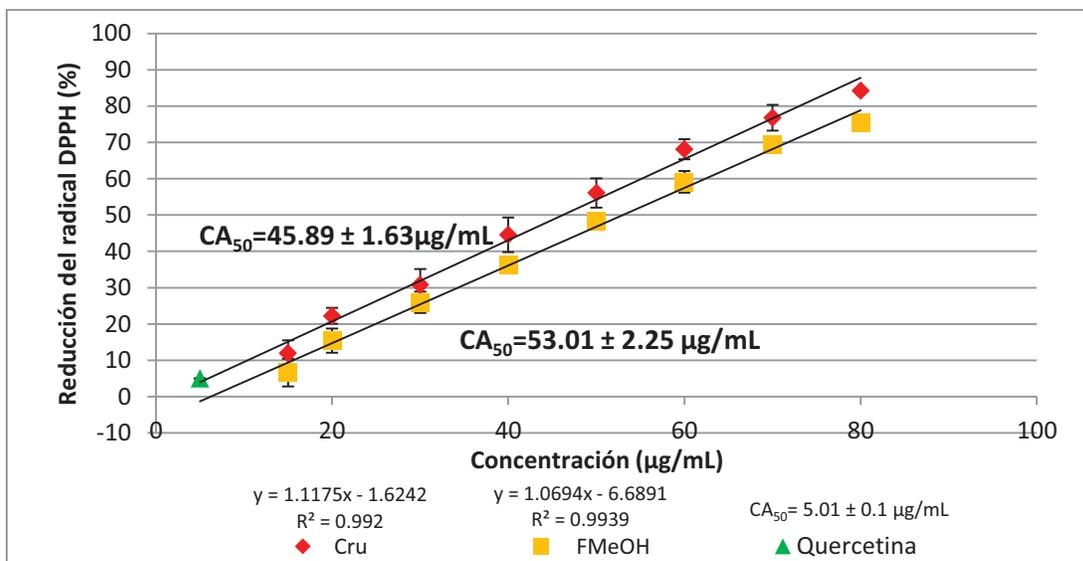


Figura 3. Comparación de la actividad antioxidante de *V. dentata* del Cru, FMeOH y el control positivo Quercetina. CA_{50} =Capacidad antioxidante media, Cru=extracto crudo, FMeOH=fracción metanólica y Quercetina=control positivo. Promedio de ocho repeticiones con tres experimentos independientes.

6.3.2. Actividad antioxidante del Cru y la FMeOH *A. monostachya*

El análisis de su capacidad para reducir el radical DPPH de *A. monostachya* mostró que el extracto crudo tuvo una CA_{50} de $33.55 \pm 1.32 \mu\text{g/mL}$ y la FMeOH presentó una CA_{50} de $150.66 \pm 15.57 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 4). Existen diferencias significativas ya que se encontró una mayor actividad antioxidante en el extracto crudo, comparado con la FMeOH ($p < 0.05$).

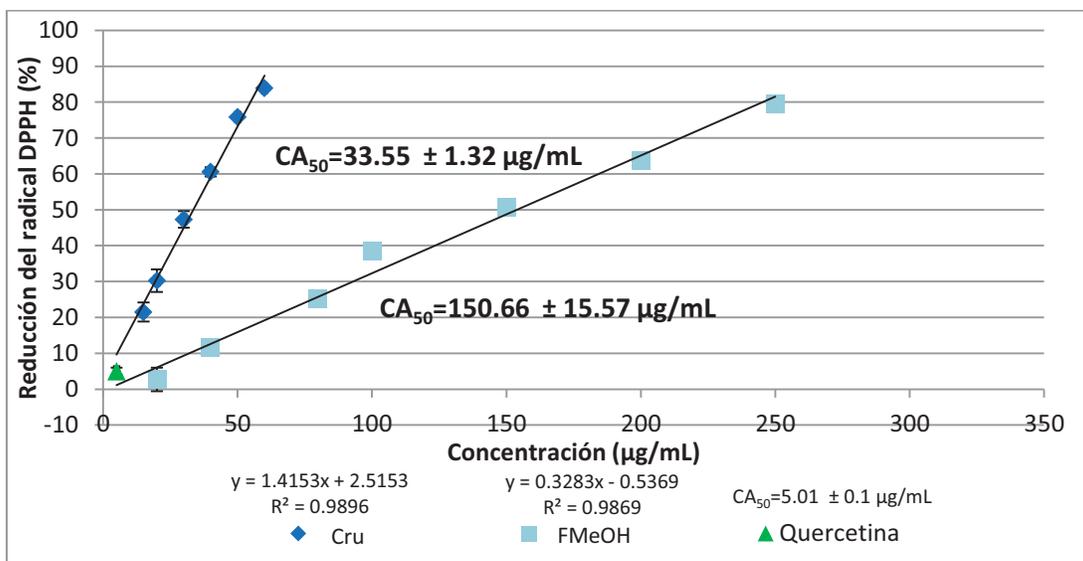


Figura 4. Comparación de la actividad antioxidante de *A. monostachya* del Cru, de la FMeOH y el control positivo Quercetina. CA_{50} =Capacidad antioxidante media, Cru=extracto crudo, FMeOH=fracción metanólica y Quercetina=control positivo. Promedio de ocho repeticiones con tres experimentos independientes.

6.3.3. Actividad antioxidante del Cru y la FMeOH *V. crocata*

Para *V. crocata* el análisis de su capacidad para reducir el radical DPPH mostró que el Cru tuvo una CA_{50} de 464.66 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la FMeOH tuvo una CA_{50} de $417.6 \pm 28.65 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 5). El análisis estadístico indica que no hay diferencias significativas en la reducción del radical DPPH entre el extracto crudo y la fracción metanólica.

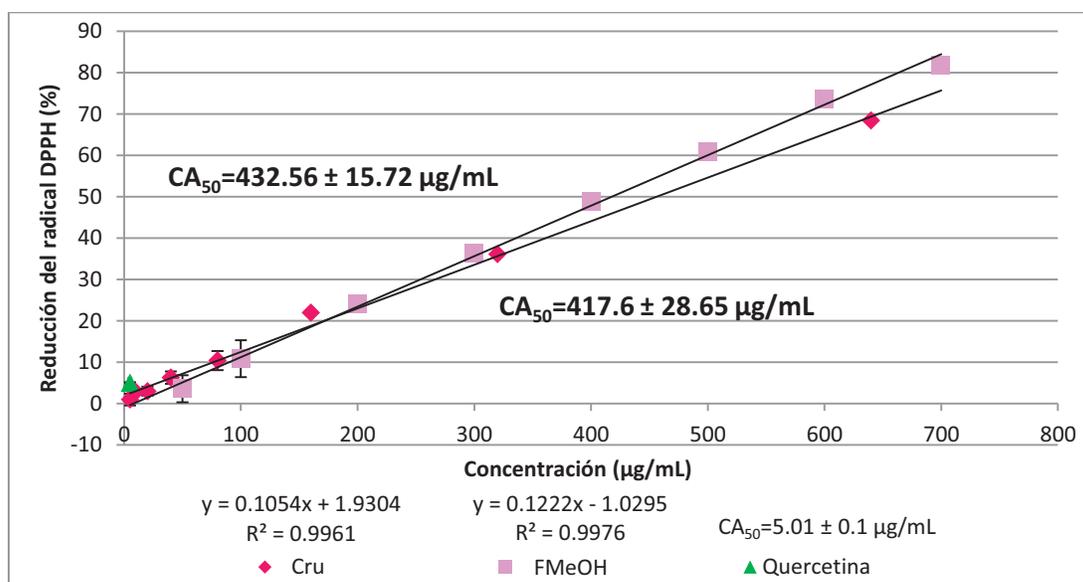


Figura 5. Comparación de la actividad antioxidante de *V. crocata* del Cru, de la FMeOH y el control positivo Quercetina. CA_{50} =Capacidad antioxidante media, Cru=extracto crudo, FMeOH=fracción metanólica y Quercetina=control positivo. Promedio de ocho repeticiones con tres experimentos independientes.

6.4. Cuantificación de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu de los Cru y las FMeOH de *V. dentata*, *A. monostachya* y *V. crocata*.

Como se mencionó anteriormente, la capacidad antioxidante se le atribuye principalmente a los compuestos fenólicos como: los flavonoides, fenilpropanoides o derivados del ácido hidroxicinámico (Rice-Evans *et al.*, 1995). Dados los resultados del HPLC, las tres plantas en su extracto crudo o FMeOH cuentan con compuestos fenólicos. Por lo cual, se decidió cuantificar el contenido de dichos compuestos.

Una curva patrón a distintas concentraciones de ácido gálico (Fig. 6) se elaboró para interpolar absorbancias de concentraciones conocidas de los extractos crudos y las FMeOH de *V. dentata*, *V. crocata* y *A. monostachya*, estos nos permitió cuantificar los mg EAG/ g de extracto.

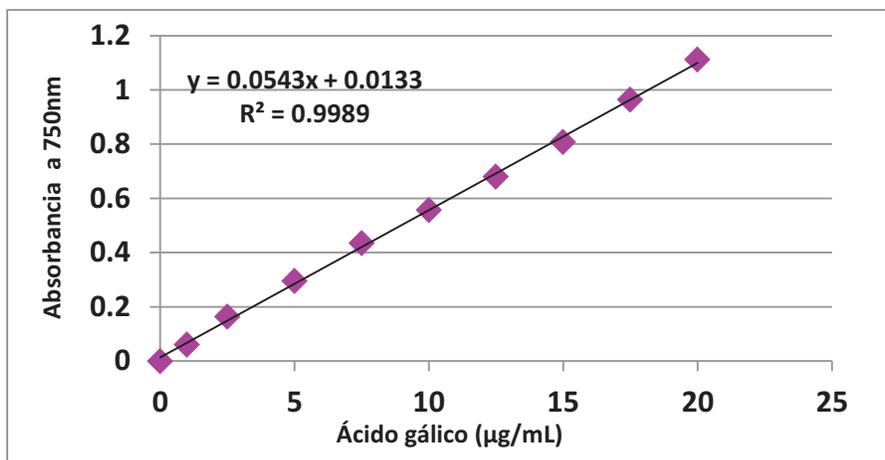


Fig. 6. Curva patrón a diferentes concentraciones de ácido gálico, para la cuantificación de los fenoles totales en la muestra y obtener los mg de equivalentes de ácido gálico/g de extracto.

En esta sección se mostrarán en conjunto los resultados de la cuantificación de fenoles totales representados en mg EAG/g de extracto de los extractos crudos y las FMeOH de cada una de las plantas: *V. dentata*, *A. monostachya* y *V. crocata* (Fig. 7).

En *V. dentata*, el extracto crudo tuvo 126.2 ± 9.36 mg EAG/g y la FMeOH fue de 131.75 ± 6.25 mg EAG/g. No existen diferencias significativas entre el extracto crudo y su fracción metanólica. Este es el primer reporte sobre el contenido de fenólicos totales en *V. dentata*.

El extracto crudo *A. monostachya* se determinó una concentración de fenólicos totales de 107.56 ± 4.68 mg EAG/g de extracto y en la FMeOH fue de 32.26 ± 1.5 mg EAG/g (Figura 7). Existen diferencias significativas entre el extracto crudo y la FMeOH ($p < 0.05$).

Con respecto a *V. crocata* el contenido de fenólicos totales del extracto crudo fue de 19.82 ± 0.77 mg EAG/g y su FMeOH fue de $18.12 \text{ mg} \pm 0.49$ EAG/g (Figura 7). No existen diferencias significativas entre el extracto crudo y la FMeOH. Este es el primer reporte sobre el contenido de fenólicos totales en *V. crocata*

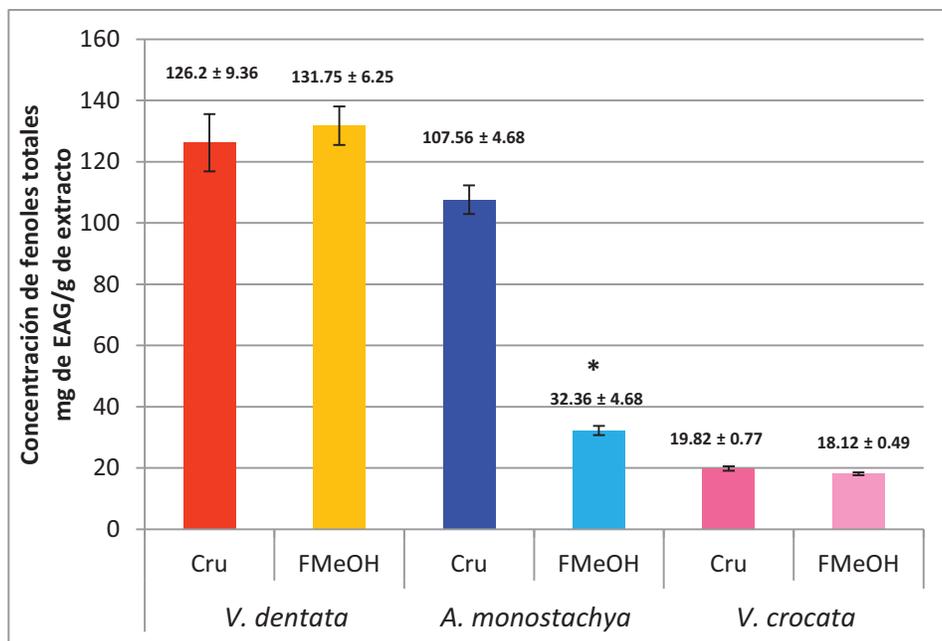


Fig. 7. Cuantificación de fenoles totales de los Cru y las FMeOH de las plantas *V. dentata*, *A. monostachya* y *V. crocata*. Promedio de tres repeticiones \pm Desviación estándar. Diferencias significativas*.

6.5. Comparativo de la actividad antioxidante y cuantificación de fenoles totales entre especies.

En las tres plantas tanto en su extracto crudo y sus respectivas fracciones la actividad antioxidante se puede relacionar con la cuantificación de fenoles, ya que a mayor concentración de fenoles presentaran más actividad antioxidante (Tabla 32). En el análisis de las tres plantas indica que *V. dentata* es la que cuenta con una mayor concentración de compuestos fenólicos 126.2 mg EAG/g, seguida de *A. monostachya* con su extracto crudo 107.56 mg EAG/g y finalmente *V. crocata* con su extracto crudo 19.8 mg EAG/g. Mientras que en las FMeOH la que tuvo un mayor contenido de fenoles fue *V. dentata* 131.75 mg EAG/g, seguida de *A. monostachya* 32.36 mg EAG/g y finalmente *V. crocata* 18.2 mg EAG/g.

Existen diferencias significativas en la actividad antioxidante de las tres plantas donde la más antioxidante fue *A. monostachya*, seguida *V. dentata* y finalmente *V. crocata*. *V. dentata* a pesar de que en este extracto se cuantificó un mayor número de fenoles, no se encontró correlación entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante de las especies estudiadas, ya que *V. dentata* es menos antioxidante que el Cru de *A. monostachya*, el cual tiene un menor número de compuestos fenólicos ($p < 0.05$). Mientras,

V. crocata presentó menor cantidad de fenoles y también fue la menos antioxidante frente al radical DPPH.

Tabla 32. Relación de la capacidad antioxidante con la cuantificación de fenoles totales en los extractos y las fracciones de *V. crocata*, *A. monostachya* y *V. dentata*.

	<i>V. dentata</i>		<i>A. monostachya</i>		<i>V. crocata</i>	
	Cru	FMeOH	Cru	FMeOH	Cru	FmeOH
Antioxidante						
CA₅₀ (µg/mL)	53.01	45.89	33.55	150.66	432.56	417.6
Fenoles						
totales mg						
de EAG/g de						
extracto	126.2	131.75	107.56	32.36	19.82	18.12

Por todo lo anterior, para la siguiente fase se propuso evaluar sólo los extractos crudos ya que presentan mayor actividad antioxidante o no hay diferencias significativas entre ellos y las FMeOH. También, considerando que los Cru cuentan con los compuestos polares y no polares de las dos fracciones detectados por CG/EM y HPLC, y esto podría mejorar la capacidad cicatrizante.

6.6. Actividad cicatrizante

Con la finalidad de presentar de forma más clara los resultados se mostrarán los datos de las tres plantas (*V. dentata*, *A. monostachya* y *V. crocata*) y los controles (Vaselina y Recoverón®) de la actividad cicatrizante evaluada por métodos físicos como: el método tensiométrico, días y velocidad (mm/día) para el cierre total de la herida.

6.6.1. Método tensiométrico

La evaluación de la actividad cicatrizante considerando la fuerza necesaria para abrir la herida (g) dio los siguientes resultados: en los ratones tratados con el vehículo/Vaselina necesitaron 526 ± 140.3 g de fuerza para abrir la herida. Mientras, que los animales a los que se les aplicó el Recoverón® fue de 640 ± 259.9 g. Los individuos a los que se les aplicó el tratamiento de *V. dentata* fue de 490 ± 80.9 g. Para los ratones tratados con *A. monostachya* la fuerza necesaria fue de 386 ± 103.0 g. Finalmente, los animales tratados con *V. crocata* necesitaron 700 ± 148.3 g para abrir la herida. No existen diferencias

significativas entre los tratamientos (Figura 8). No obstante, si se observa la tendencia la aplicación tópica de *V. crocata* incrementa la fuerza de tensión necesaria para abrir la herida, la cual es ligeramente mayor que la registrada con Recoverón®.

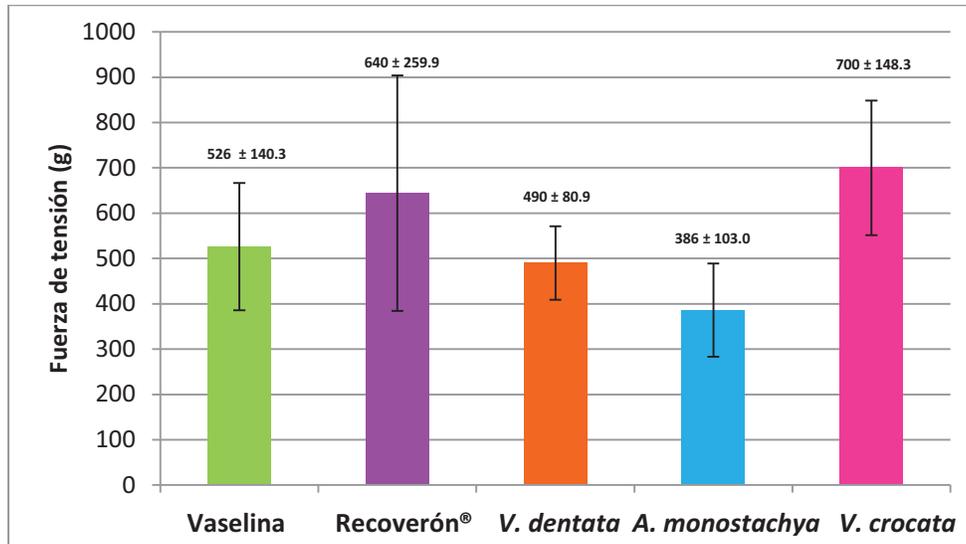


Fig. 8. Actividad cicatrizante evaluada mediante el método tensiométrico donde la fuerza de tensión se midió en gramos con los diferentes tratamientos: Vaseline, Recoverón®, *V. dentata*, *A. monostachya* y *V. crocata*. Promedio de cinco repeticiones \pm Desviación estándar.

6.6.2. Velocidad y días para el cierre total de la herida

En la parte dorsal de los ratones CD-1 el tamaño inicial de la herida fue de 15.83 ± 0.54 mm. A partir del día uno y hasta los quince días en que se aplicaron los tratamientos se midió la longitud de la herida con la finalidad de evaluar la velocidad a la que se cierra (mm/día) y los días necesarios para el cierre total de la misma. En esta sección también se describirán juntos los resultados de las tres plantas y los controles.

La velocidad del cierre de la herida (mm/día) en los ratones a los que se les aplicó el vehículo/Vaseline fue de 1.15 ± 0.47 mm/día. Mientras, que los individuos a los que se les aplicó Recoverón® fue de 1.168 ± 0.74 mm/día. Los animales tratados con *V. dentata* la velocidad de cierre fue de 1.169 ± 0.75 mm/día. Para los organismos tratados con *A. monostachya* fue de 1.24 ± 0.50 mm/día. Finalmente, los ratones tratados con *V. crocata* la velocidad de cierre fue de 1.264 ± 0.90 mm/día. Existen diferencias significativas entre los tratamientos ya que *V. crocata* fue el tratamiento que tuvo la velocidad de cierre más alta con respecto al resto de los tratamientos ($p < 0.05$) (Figura 9).

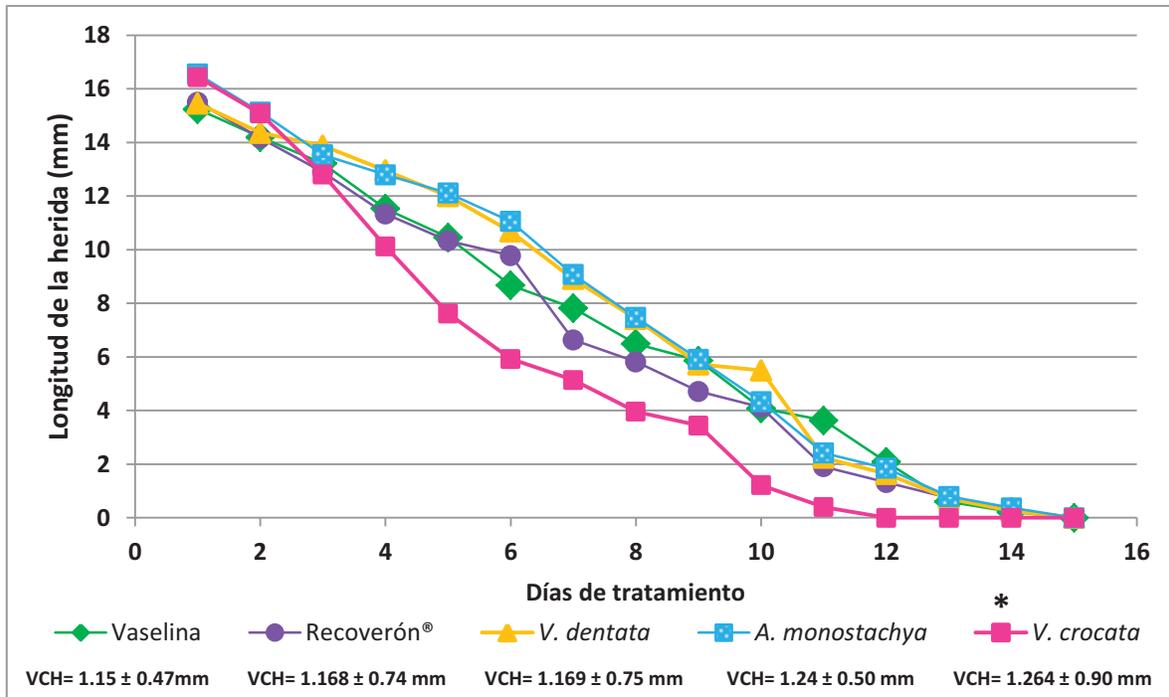


Fig. 9. Actividad cicatrizante por velocidad del cierre de la herida (VCH) obtenida mediante la longitud de la herida (mm) por 15 días de tratamiento. Los diferentes grupos experimentales: Vaselina, Recoverón®, *V. dentata*, *A. monostachya* y *V. crocata*. Diferencias significativas * ($p < 0.05$). $n = 10$

A los quince días las heridas se cerraron para la mayoría de los tratamientos, con excepción de *V. crocata* que fue a los doce días. Además, existen diferencias significativas entre los tratamientos, ya que *V. crocata* tiene una mayor VCH y un menor periodo de cierre total de la herida mayor en comparación con el resto de los tratamientos ($p < 0.05$).

6.6.3. Resumen de los resultados de las pruebas físicas de cicatrización.

El resumen de los resultados con los tratamientos tópicos al 5% de *V. crocata*, *V. dentata*, *A. monostachya*, los controles Vaselina y Recoverón® para la actividad cicatrizante por el método del tensiómetro, velocidad y periodo de cierre total de la herida se indican a continuación (Tabla 33).

Tabla 33. Resumen de los resultados de las evaluaciones físicas con los diferentes tratamientos: Vaselina, Recoverón®, *V. dentata*, *A. monostachya* y *V. crocata*. Modelo de ratones CD-1.

Tx's	Vaselina	Recoverón®	<i>V. dentata</i>	<i>A. monostachya</i>	<i>V. crocata</i>
Fuerza de tensión (g)	526±140.37	644±259.9	490±80.99	386±103.7	700±148.32
Cierre total de la herida (días)	15	15	15	15	12*
Velocidad del cierre de la herida (mm/día)	1.15±0.47	1.168±0.74	1.169±0.75	1.24±0.50	1.264±0.90*

* Diferencias significativas ($p < 0.05$)

El tratamiento tópico con Vaselina fue el que presentó la menor velocidad de cierre de la herida (1.15 ± 0.47 mm/día) en comparación con los otros tratamientos. Además, durante la medida de la longitud de la herida se pudo observar que 60% de los individuos tratados con Vaselina presentaron inflamación/supuración a partir del tercer día, fueron disminuyendo hasta el día doce y no hubo costra evidente. A pesar de que no hay diferencias significativas los resultados indican que los animales que recibieron el tratamiento con Vaselina no fueron los que presentaron la menor fuerza de tensión para abrir la herida (526 ± 140.37 g).

La aplicación tópica de Recoverón® en los ratones provocó un proceso de cicatrización que necesito mayores fuerzas de tensión (644 ± 259.9 g) para abrir la herida, aunque no hay diferencias significativas. No obstante, la velocidad del cierre de la herida (1.168 ± 0.74 mm/día) y el periodo de cierre fue a los quince días.

El tratamiento de los individuos con *V. dentata* tuvo una velocidad de cierre de la herida (1.169 ± 0.75 mm/día) similar al Recoverón® (1.168 ± 0.74 mm/día). Pero, la fuerza de tensión (490 ± 80.99 g) es menor que la de Recoverón® y es más cercana a la obtenida con Vaselina (526 ± 140.37 g).

En el caso de los ratones a los que se les aplicó *A. monostachya* como tratamiento de la herida se observó mayor velocidad de cierre (1.24 ± 0.50 mm/día) que el Recoverón® (1.168 ± 0.74 mm/día). Sin embargo, es el tratamiento que presentó la menor fuerza de tensión necesaria para abrir la herida (386 ± 103.7 g). También, en este caso el cierre de la herida en el 100% de los animales fue al día quince.

Finalmente, de acuerdo a los resultados la aplicación tópica de *V. crocata* sugiere que promueve la cicatrización, ya que tuvo la mayor velocidad de cierre (1.264 ± 0.90 mm/día), el menor número de días (doce) necesarios para el cierre total de las heridas en todos los individuos y la mayor fuerza de tensión necesaria para abrir la herida (700 ± 148.32 g).

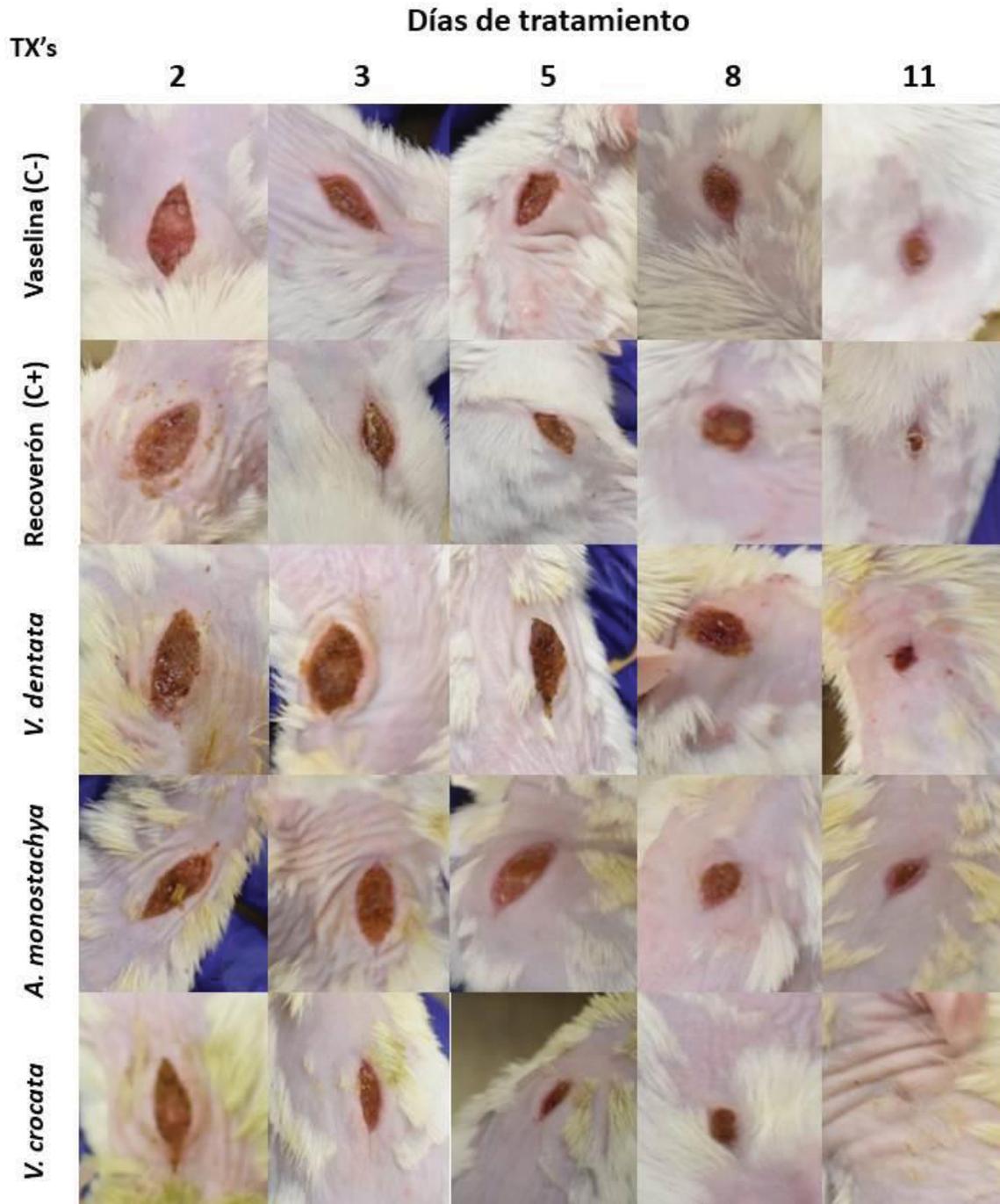


Fig. 10. Proceso de cierre de las heridas a diferentes días de los tratamientos. Tx's=tratamientos.

6.6.4. Análisis histológico

Para el examen histológico de la piel de ratones a los que se les aplicaron los tratamientos tópicos se obtuvieron tres secciones histológicas de la piel de cada individuo por cada tratamiento Vaselina, Recoverón®, *V. dentata*, *A. monostachya*, *V. crocata* y piel intacta. Para el diagnóstico de epidermis y dermis, las preparaciones se tiñeron con HE y una para observar el colágeno se tiñó con Masson.

Para poder distinguir los cambios en la piel durante el proceso de cicatrización, se tomaron muestras de piel intacta que permitieron observar los diferentes estratos de la piel: epidermis, dermis, hipodermis, tejido muscular y sus diferentes anexos, pelos, glándulas sebáceas y nervios, así como la organización y tipo de colágeno (Figura 11).

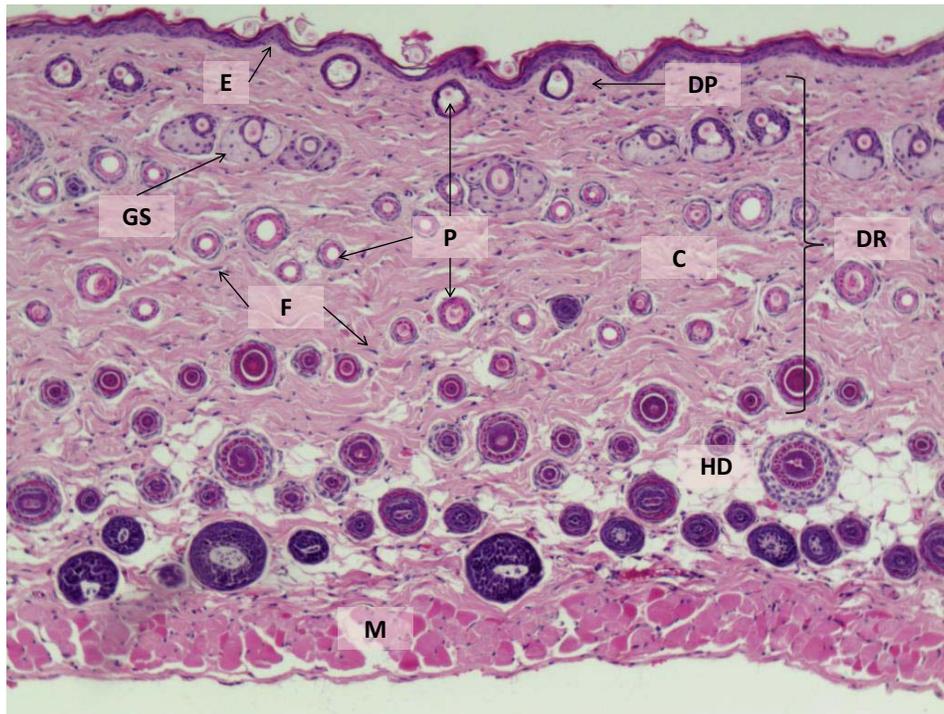


Fig. 11. Micrografía de piel intacta de ratón CD-1. Epidermis (E), dermis papilar (DP), dermis reticular (DR), glándula sebácea (GS), pelo (P), hipodermis (HD) y músculo (M). Note la organización paralela de las fibras de colágeno (C) y una población homogénea de fibroblastos (F). Tinción H-E. Aumento real 100X.

En los cortes histológicos de las muestras de piel de ratón a los que se les aplicó de manera tópica los diferentes tratamientos se obtuvieron dos regiones de la zona de cicatrización de la herida (ZCH): media y distal (Fig. 2). Se hizo una revisión en la parte

media de la ZCH, la cual es considerada como la parte con el menor porcentaje de cicatrización, ya que como se mencionó anteriormente este proceso comienzan de los extremos hacia el centro.

En el análisis histológico de las ZCH's se realizó tomando en cuenta los siguientes parámetros: A) epidermis: epitelización presencia de costra e hiperplasia; B) dermis: tejido de granulación, contracción de la herida, vasos sanguíneos (neoformación y congestión), infiltrados inflamatorios (neutrófilos), abundancia de fibroblastos y colágeno tipo I y III (Tabla 11). Estos datos permitieron determinar la fase del proceso de cicatrización de cada individuo.

Para evaluar la contracción de la herida de las muestras se les asignó a las ZCH's una escala de manera cualitativa considerando la longitud de ésta con respecto a las demás, dando los valores de chica, mediana, grande y regenerada (cuando ya se observa una dermis con sus estratos característicos). La contracción de la herida es un proceso en el cual el tejido dérmico sobreviviente en el borde de la herida se desplaza para disminuir el tamaño del defecto. También, se da de esta manera el proceso de epitelización (epidermis), pero hay que considerar que ambos eventos son independientes; uno puede producirse sin el otro. Pero la regeneración epidérmica y la reparación de la dermis con mayor frecuencia se producen simultáneamente, ya que si se altera la reparación dérmica, la epidermis no migrara fácilmente (Fitzpatrick *et al.*, 1987) Por lo cual, aunque las ZCH's pueden tener tamaños similares no necesariamente se necesita la misma fuerza de tensión para abrir la herida.

En esta sección se evaluarán por separado cada uno de los tratamientos Vaselina, Recoverón®, *V. dentata*, *A. monostachya* y *V. crocata*. Posteriormente se realiza la comparación del análisis histológico de los diferentes tratamientos.

6.6.4.1. Análisis histológico de las heridas en la piel de ratones tratadas de manera tópica con Vaselina (C-)

De primera instancia se observó y se clasificaron las preparaciones de acuerdo al tamaño la contracción de la ZCH. En la piel de los ratones tratados de manera tópica con Vaselina tuvieron heridas que van de medianas (40%) a grandes (40%) y solo una chica (20%) (Figura 12 A y B).

En cuanto al proceso de epitelización en los ratones cuyas heridas fueron tratadas con Vaselina todas tenían epidermis (Figura 12 C y D), pero generalmente se presentó un engrosamiento debido al aumento del número de células que podría ser hiperplasia 80% y solamente en un caso, se presentó la ZCH chica, donde la epidermis fue similar a la normal.

En la zona de la dermis se observó tejido de granulación con abundantes vasos sanguíneos algunos congestionados y aun se puede ver la migración activa de neutrófilos. y pocos fibroblastos sin ordenamiento evidente (Figura 12 E y F).

El colágeno maduro del Tipo I se puede observar en las partes adyacentes de la ZCH's, se encuentra en mayor proporción en el tejido intacto y en la parte media se puede observar un colágeno de apariencia laxa que probablemente sea del Tipo III ya que se encuentra en mayor medida en la ZCH (Figura 12 G y H).

Es importante mencionar que durante el tiempo en el que se midió la longitud de la herida a lo largo de los días de tratamiento, se observaron individuos con inflamación evidente (60%) a partir del tercer día y estos fueron disminuyendó hasta el día doce (10%). Esto concuerda con el infiltrado inflamatorio que se puede observar en la mayoría de los individuos.

VASELINA (C-)

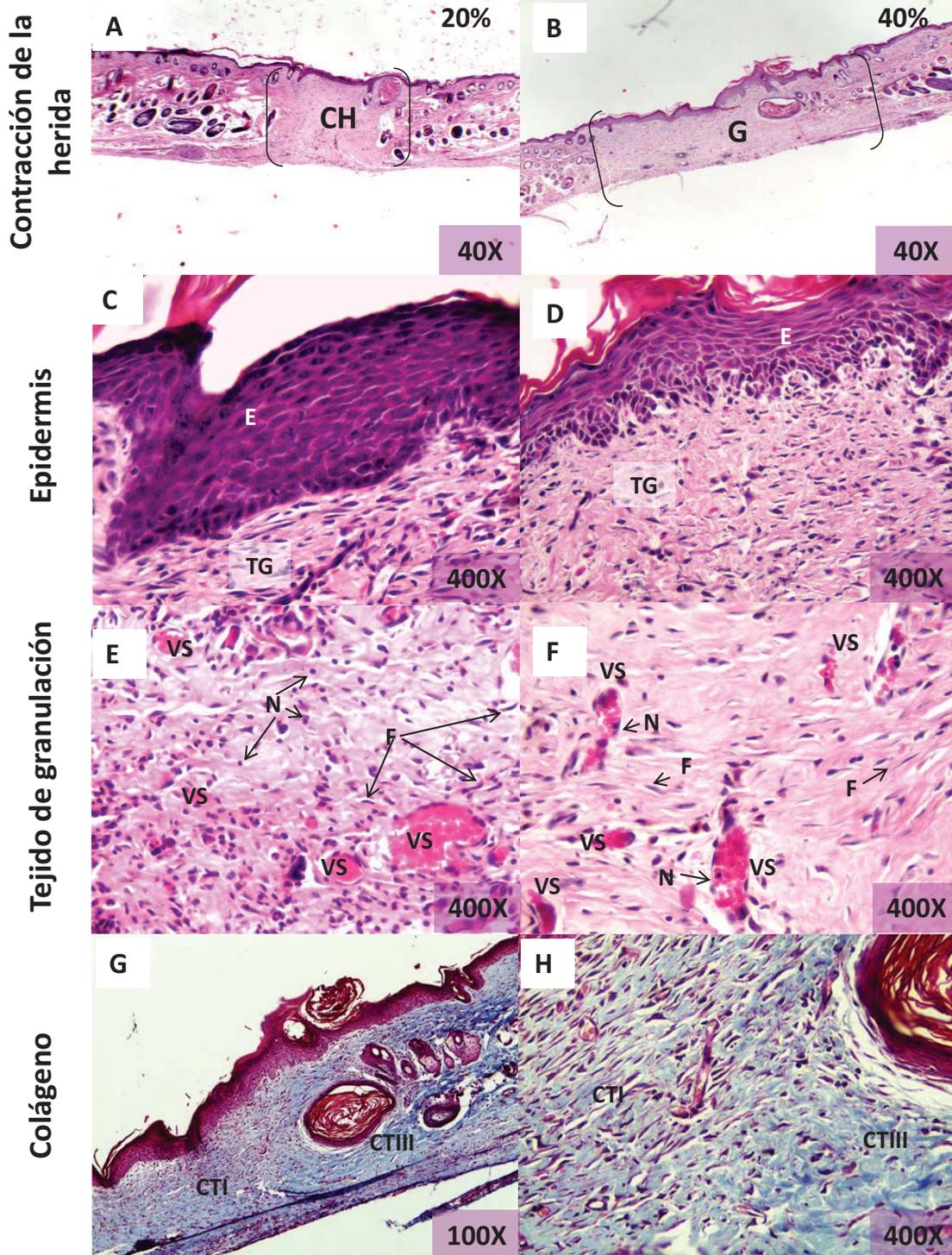


Fig. 12. Micrografías de pieles de ratón tratados con la aplicación tópica de Vaselina. A) y B) Contracción en la ZCH, C) y D) Epidermis en la ZCH, E) y F) Tejido de granulación; G) Cambio del colágeno en la zona adyacente a la ZCH, H) Acercamiento que permite ver la diferenciación del tipo de colágeno en la zona adyacente de la ZCH. CH=chica, G=grande, E=epidermis, TG= Tejido de granulación, VS=vaso sanguíneo, F=fibroblasto, N=neutrófilo, ZCH=zona de cicatrización de la herida, CTI=colágeno del tipo I y CTIII=colágeno del tipo III. A, B, C, D, E y F tinción HE. G y H tinción Masson.

6.6.4.2. Análisis histológico de las heridas en la piel de ratones tratadas de manera tópica con Recoverón® (C+)

Las secciones de la piel de los ratones tratados con Recoverón® que se observaron a nivel histológico tuvieron ZCH generalmente grandes (60%) (Figura 13 A), ZCH mediana (20%) y un individuo presentó regeneración de la piel (20%) (Figura 13 B).

La epitelización de las secciones revisadas es normal en la mayoría de los casos (80%), es decir la epidermis tiene un grosor similar a la piel sana (Figura 13 D). Sólo en un individuo (20%) se observó un ligero engrosamiento de la epidermis (Figura 13 E).

En cuanto al tejido de granulación se observaron pocos vasos sanguíneos. En la mayoría de los individuos había pocos neutrófilos (Figura 13 C, E y F), sólo en un caso se observó un proceso inflamatorio (Figura 13 D). Los fibroblastos están en cantidad intermedia y con un alineamiento evidente (Figura 13 E y F). Además, de que un individuo presentó neodermis con la estratificación característica de la dermis normal, la presencia de glándulas y folículos pilosos (Figura 13 A)

De acuerdo a la tinción de Masson de las pieles de ratón tratadas de manera tópica con Recoverón® se pudo observar la maduración del colágeno en las partes distales de la ZCH donde se ve la diferencia entre el colágeno Tipo I y Tipo III. También, es importante mencionar que hay una disminución de la presencia de neutrófilos, fibroblastos y vasos sanguíneos en estas zonas con colágeno del Tipo III (Figura 13 G y H).

RECOVERÓN (C+)

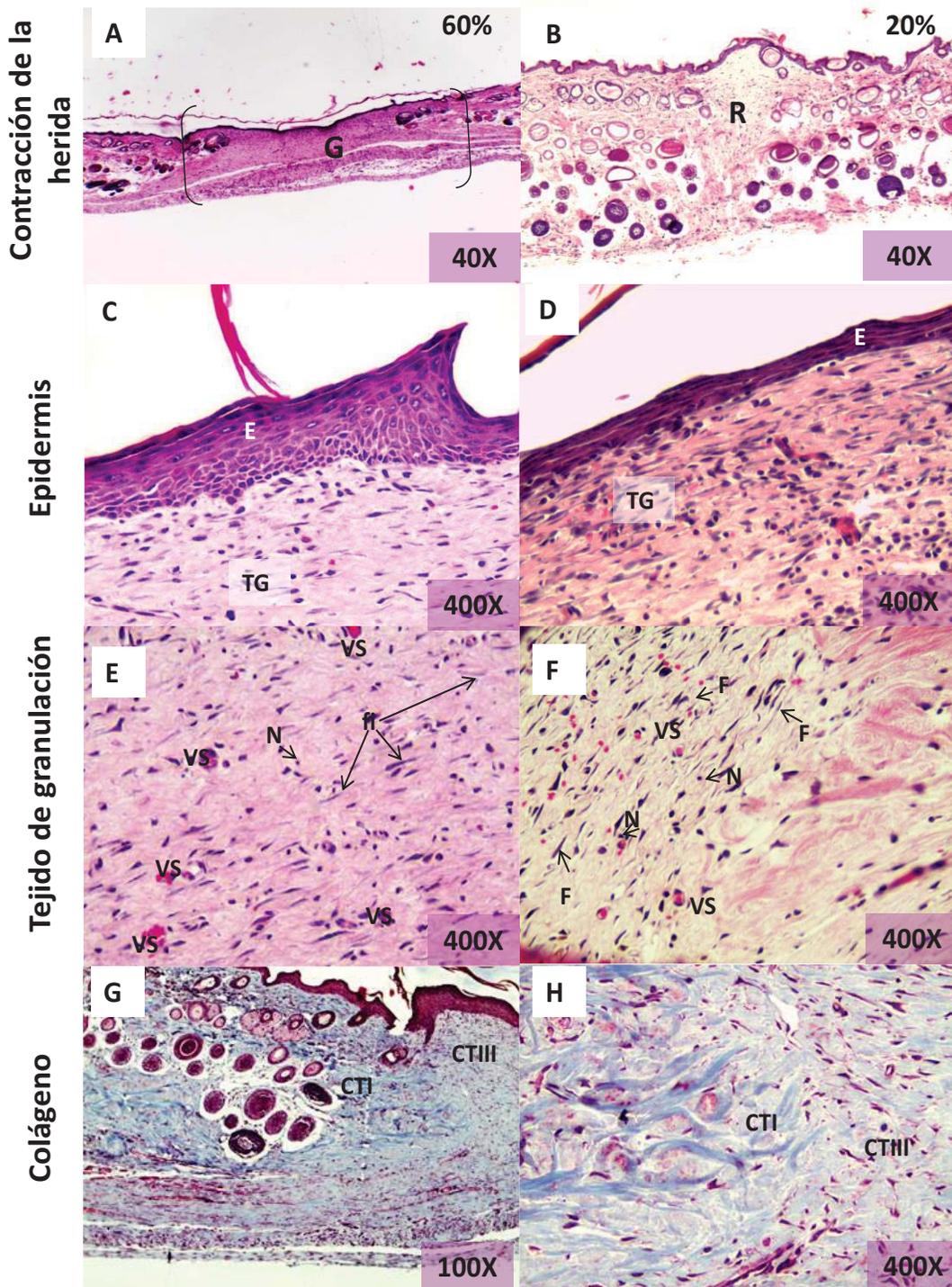


Fig. 13. Micrografías de pieles de ratón tratados con la aplicación tópica de Recoverón®. A) y B) Contracción en la ZCH. C) y D) Epidermis en la ZCH. E) y F) Tejido de granulación. G) Cambio del colágeno en la zona adyacente a la ZCH, H) Acercamiento que permite ver la diferenciación del tipo de colágeno en la zona adyacente de la ZCH. CH=chica, G=grande, ZCH=zona de cicatrización de la herida, E=epidermis, TG= Tejido de granulación, VS=vaso sanguíneo, F=fibroblasto, N=neutrófilo, CTI=colágeno del tipo I y CTIII=colágeno del tipo III. A, B, C, D, E y F tinción HE. G y H tinción Masson.

6.6.4.3. Análisis histológico de las heridas en la piel de ratones tratadas de manera tópica con *V. dentata*

Los animales tratados de manera tópica con *V. dentata* cuentan con ZCH generalmente medianas (80%) y solo una chica (20%) (Figura 14 A y B).

Los ratones cuyas heridas incisionales fueron tratadas con *V. dentata* presentaron un ligero engrosamiento es decir con hiperplasia (40%) (Figura 14 C) y el resto tuvo una epidermis similar a la normal (60%) (Figura 14 D).

Los ratones cuyas heridas incisionales fueron tratadas con *V. dentata* presentaron epidermis similar a la normal (60%) con un ligero engrosamiento es decir hiperplasia (40%) (Figura 14 C y D)

Los ratones que después del tratamiento con *V. dentata* presentaron un grosor normal en la epidermis (60%), también se observó en la zona de la dermis el tejido de granulación con pocos vasos sanguíneos, neutrófilos y presencia de fibroblastos (14 E). A diferencia de la piel de los ratones en los que se observó hiperplasia (40%), en los cuales se pueden observar vasos sanguíneos congestionados en los que aún hay migración activa de neutrófilos y pocos fibroblastos (14 F).

En todas las secciones histológicas de piel de ratón tratadas con *V. dentata* también se puede observar la disposición del colágeno con una diferenciación notable en su maduración en las regiones adyacentes a la ZCH (Figura 14 G). Además, se observó que en donde hay colágeno del Tipo I hay una disminución considerable de neutrófilos y fibroblastos (Figura 14 H).

V. dentata

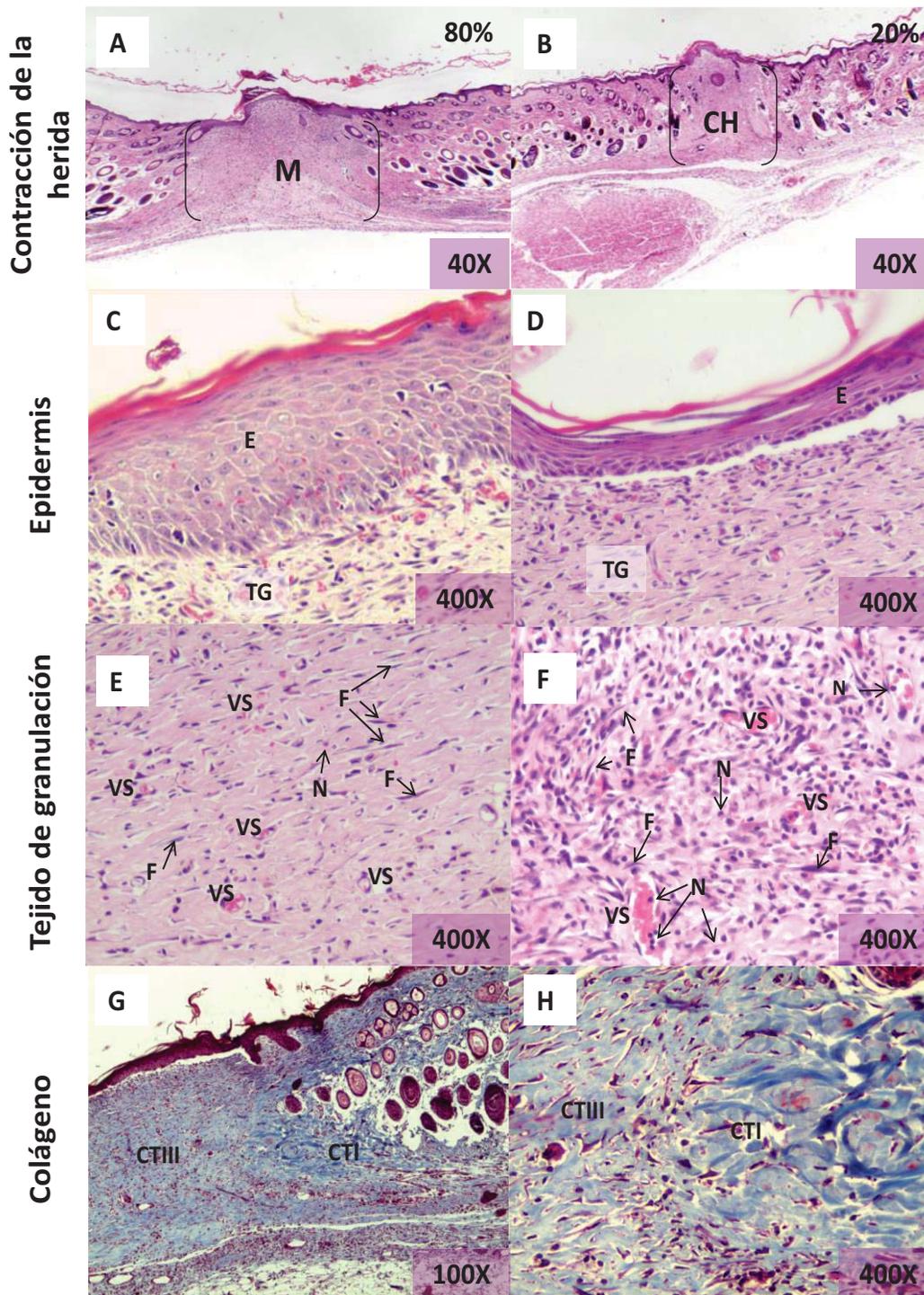


Fig. 14. Micrografías de pieles de ratón tratados con la aplicación tópica de *V. dentata*. A) y B) Contracción en la ZCH. C) y D) Epidermis en la ZCH. E) y F) Tejido de granulación. G) Cambio del colágeno en la zona adyacente a la ZCH, H) Acercamiento que permite ver la diferenciación del tipo de colágeno en la zona adyacente de la ZCH. CH=chica, G=grande, E=epidermis, ZCH=zona de cicatrización de la herida, TG= Tejido de granulación, VS=vaso sanguíneo, F=fibroblasto, N=neutrófilo, CTI=colágeno del tipo I y CTIII=colágeno del tipo III. A, B, C, D, E y F tinción HE. G y H tinción Masson.

6.6.4.4. Análisis histológico de las heridas en la piel de ratones tratadas de manera tópica con *A. monostachya*

Las secciones histológicas de piel de ratones en los cuales las heridas fueron tratadas con *A. monostachya* se clasificaron de la siguiente forma: una herida chica (20%) (Figura 17 A), mientras, el resto fueron ZCH's grandes (80%) y en dos casos se observó aun presencia de costra y hemorragia (Figura 15 B).

En cuanto a la epidermis que se observó en las secciones histológicas de los ratones tratados con *A. monostachya* en 60% de los casos era de apariencia similar a la de tejido sano (Figura 15 C). Sin embargo, en el 40% restante presentan aun vestigios de costra y no hay presencia de epidermis (Figura 15 D).

El tejido de granulación presentó diferencias importantes, los ratones que tuvieron epidermis normal (60%) tienen abundantes fibroblastos, pocos neutrófilos y pocos vasos sanguíneos (Figura 15 E), incluso un individuo presentó neodermis con la estratificación característica de la dermis normal, la presencia de glándulas y folículos pilosos (Figura 15 G). No obstante, aquellos ratones que aún presentan costra cuentan con infiltrado inflamatorio y la abundancia de vasos sanguíneos congestionados que nos indica que posible hemorragia (Figura 15 F).

El colágeno en las ZCH's que presentan epidermis normal (60%) se ve una mayor maduración del colágeno ya que se observa de manera más abundante el colágeno denso y ordenado similar al del tejido sano el cual podría ser del tipo I (Figura 15 Gy H). Mientras, en las que aun presentan costra (40%), se ve de manera homogénea colágeno laxo el cual podría del tipo III ya que el colágeno denso presenta una coloración azul más fuerte que el laxo como se puede ver en la figura 15 B.

A. monostachya

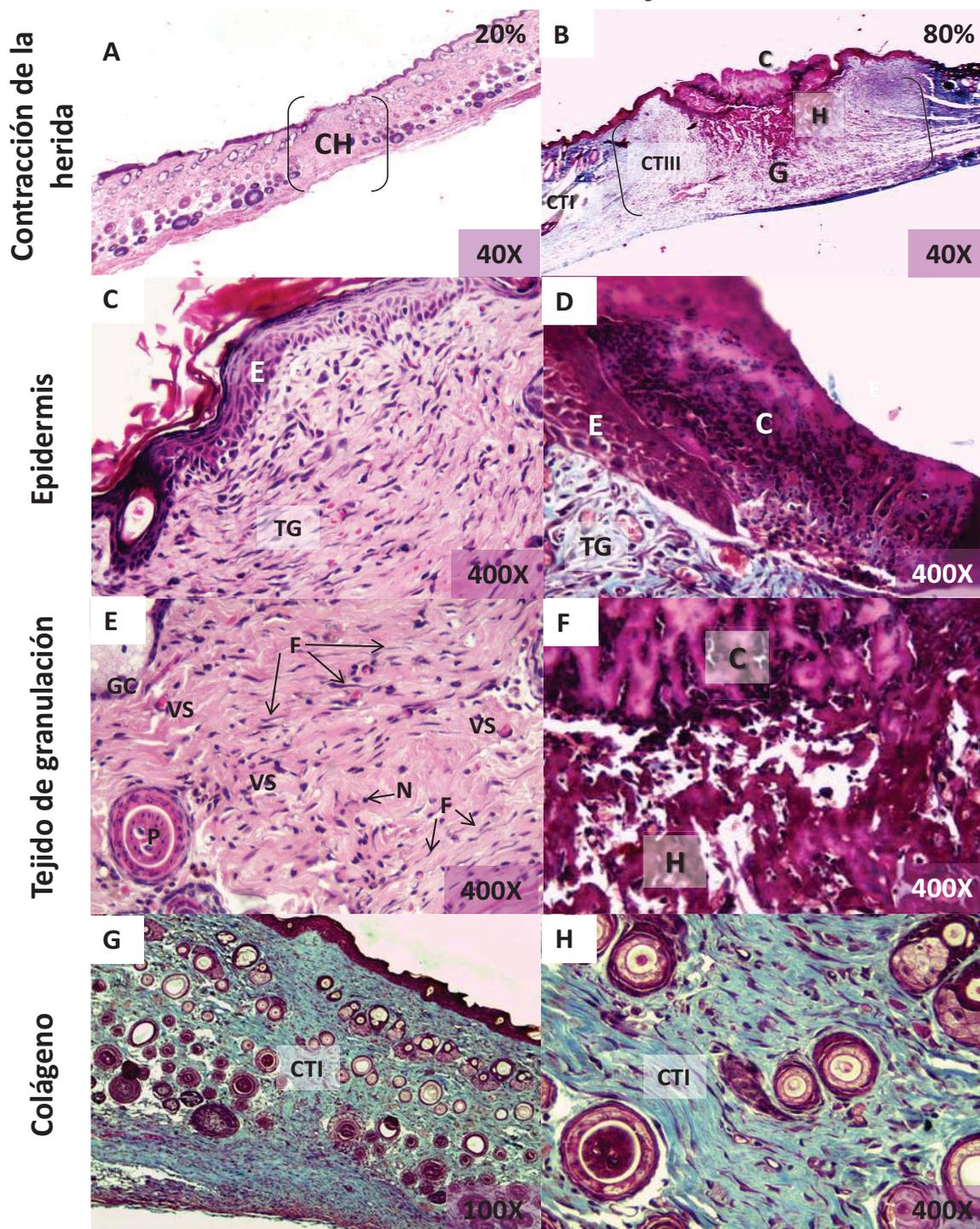


Fig. 15. Micrografías de pieles de ratón tratados con la aplicación tópica de *A. monostachya*. A) y B) Contracción de la herida en la ZCH. C) Epidermis en la ZCH. D) Re-epitelización de epidermis debajo de la costra en la ZCH. E) Tejido de granulación. F). Costra y Hemorragia en la ZCH. G) Colágeno del tipo I en la ZCH, H) Acercamiento que permite ver el ordenamiento y homogeneidad del colágeno del tipo I en la ZCH. CH=chica, G=grande, ZCH=zona de cicatrización de la herida, E=epidermis, TG= Tejido de granulación, VS=vaso sanguíneo, F=fibroblasto, N=neutrófilo, C= costra, H= hemorragia y CTI=colágeno del tipo I. A, C, y E tinción HE. B, D, F, G y H tinción Masson.

6.6.4.5. Análisis histológico de las heridas en la piel de ratones tratadas de manera tópica con *V. crocata*

Las heridas de los animales tratadas con *V. crocata* revelaron en el análisis histológico que el 80% de los individuos presentan ZCH' chicas (Figura 16 A) y una presentó signos de regeneración 20% por la presencia de dermis similar a la de piel intacta (Figura 16 B).

La epidermis se observó en todos los ratones tratados con *V. crocata*. En el 60% de los individuos es similar a la normal (Figura C) y en el 40% restante presenta un ligero engrosamiento (Figura 16 D).

El tejido de granulación los individuos de las ZCH's chicas (80%) cuentan con pocos vasos sanguíneos, pocos neutrófilos y fibroblastos (Figura 16 E). Además, con este tratamiento un individuo también presentó neodermis similar a la normal con la estratificación característica y la presencia de glándulas y folículos pilosos.

En las ZCH's se puede observar la maduración del colágeno tipo I que se encuentra en las regiones adyacentes y el colágeno del tipo III de la parte media (Figura 16 G y H). También, se puede ver que donde se encuentra el colágeno del tipo I hay una disminución considerable de neutrófilos y fibroblastos (Figura 16 H).

V. crocata

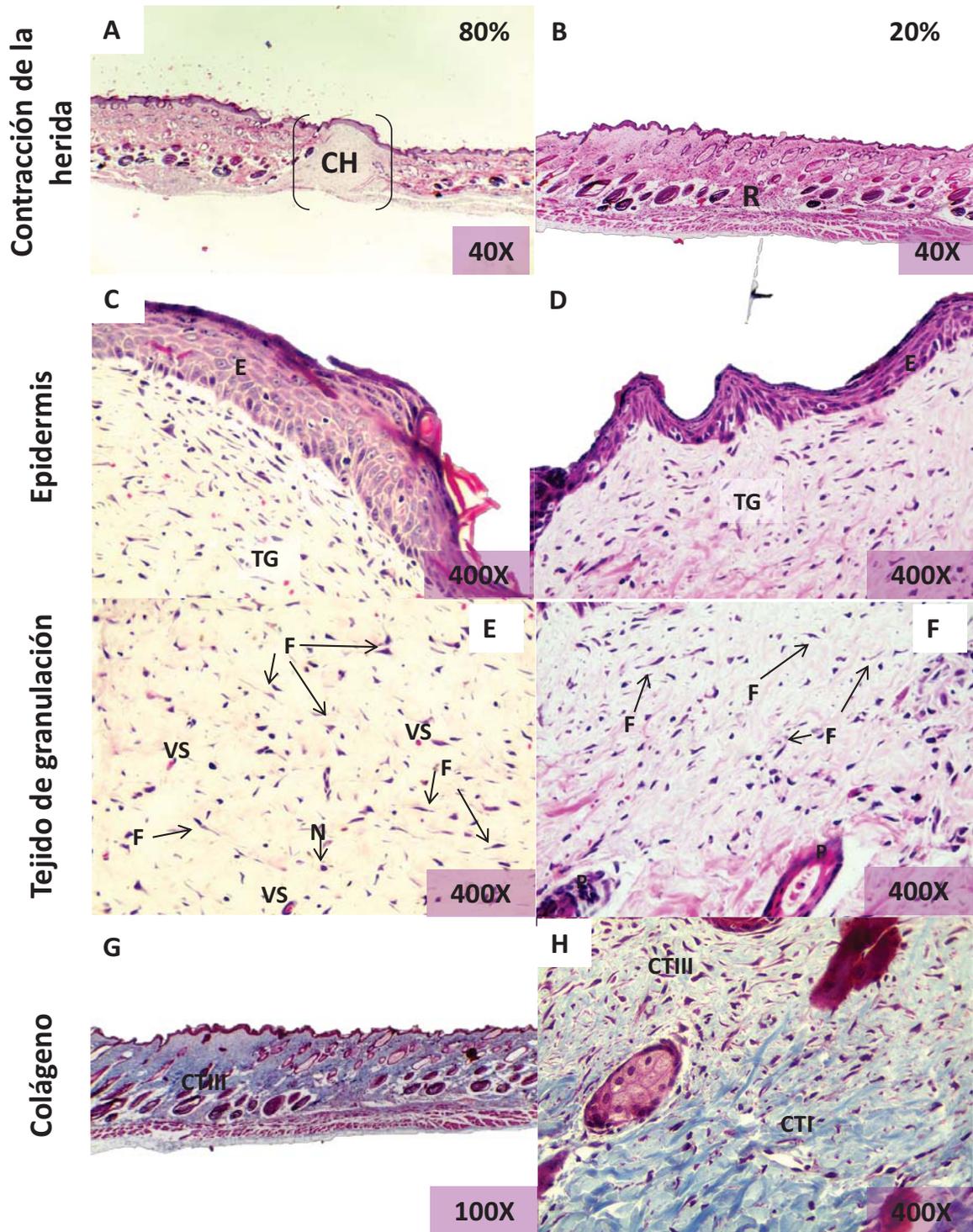


Fig. 16. Micrografías de pieles de ratón tratados con la aplicación tópica de *V. crocata*. A) y B) Contracción en la ZCH. C) y D) Epidermis en la ZCH. E) y F) Tejido de granulación. G) Cambio del colágeno en la zona adyacente a la ZCH. H) Acercamiento que permite ver la diferenciación del tipo de colágeno en la zona adyacente de la ZCH. CH=chica, G=grande, ZCH=zona de cicatrización de la herida, E=epidermis, TG= Tejido de granulación, VS=vaso sanguíneo, F=fibroblasto, N=neutrófilo, CTI=colágeno del tipo I y CTIII=colágeno del tipo III. A, B, C, D, E y F tinción HE. G y H tinción Masson.

6.6.4.6. Comparación del análisis histológico de los diferentes tratamientos.

Todos los tratamientos que se aplicaron en las heridas incisionales de los ratones CD-1 afectaron de forma diferencial el tamaño de la ZCH (Tabla 33), presentándose en el siguiente orden de mayor a menor tamaño: *A. monostachya* (grande 80%), Recoverón® (grande 60%), *V. dentata* (mediana 80%), Vaselina (mediana 40%) y *V. crocata* (chica 80%).

La epidermis en la ZCH se observó en casi todos las secciones de piel de ratón analizadas a las que se le aplicó de manera tópica los diferentes tratamientos con excepción de algunos individuos de *A. monostachya* (Tabla 34).

Los animales tratados de manera tópica con *V. crocata* presentaron pocos vasos sanguíneos, neutrófilos y fibroblastos. Además, fueron los que tuvieron la mayor contracción de la ZCH y un individuo con neodermis que tenía estratificación característica de dermis normal, presencia de glándulas y folículos pilosos. Por lo cual, se puede considerar que se encuentran en la fase de remodelación de la matriz extracelular.

Las heridas incisionales en piel de ratón tratadas con Recoverón® se observaron pocos vasos sanguíneos de neoformación, neutrófilos escasos y fibroblastos activos con un alineamiento evidente. Sin embargo, fueron los que presentaron una menor contracción de la herida en la mayor parte de los individuos y un individuo con neodermis. Por lo cual, estos resultados nos indican que se encuentran entre la fase proliferativa y la fase de remodelación de la matriz extracelular.

Los organismos tratados de manera tópica con *V. dentata* tuvieron observaciones dispares a nivel histológico. Cuenta con un grupo (60%) que presenta pocos vasos sanguíneos, neutrófilos y fibroblastos con un ordenamiento evidente; mientras que el otro grupo (40%) tiene vasos sanguíneos congestionados, migración activa de neutrófilos y pocos fibroblastos sin ordenamiento. Estos resultados nos podrían estar indicando que se encuentran entre la fase inflamatoria y la fase de proliferación.

Los individuos tratados de manera tópica con Vaselina presentan abundantes vasos sanguíneos de neoformación generalmente congestionados, neutrófilos abundantes y

pocos fibroblastos que no se encuentran alineados de manera evidente. Probablemente por estas características se encuentren al final de la fase de inflamación.

El grupo de ratones que presentaron una cicatrización más lenta en comparación con los otros tratamiento fueron a los que se les aplicó *A. monostachya*. Se observaron dos grupos característicos: a) los que aun presentaban costra (40%) y b) los que cuentan con epidermis regenerada (60%). Los individuos del grupo con costra probablemente están en las fases iniciales del proceso de cicatrización hemostasia-inflamación, ya que por lo visto anteriormente, presentan hemorragia e infiltrado inflamatorio. Mientras, en el grupo b se puede observar fibroblastos alineados de manera ordenada pocos vasos sanguíneos y neutrófilos, incluso uno de los individuos presenta una herida chica muy cercana a las que son valoradas como regeneradas por la presencia de neodermis.

En todos las secciones de la piel de ratón analizadas el cambio del tipo de colágeno fue evidente, ya que el que está en las zonas adyacentes a la ZCH es un colágeno más abundante formando fibras más gruesas, este colágeno probablemente sea del tipo I, mientras que el que se encuentra en la parte media de la ZCH son fibras más delgadas y laxas, el cual podría ser del tipo III (Tabla 34).

Tabla 34. Resumen del análisis histológico en las secciones analizadas de la piel de los ratones a los que se les aplicó de manera tópica los diferentes tratamientos y piel intacta. n=5

Tx's	ZCH	Epidermis	Tejido de granulación				Fase
			VS	N	F	CT	
Piel intacta	NA	NA	+	+	+	CTI	NA
Vaselina	Mediana (40%)	Engrosamiento Hiperplasia	+++	+++	+	CTI y CTIII	Inflamatoria
Recoverón®	Grande (60%)	Normal	+	+	+++	CTI y CTIII	Proliferativa y remodelación de la matriz extracelular
<i>V. dentata</i>	Mediana (80%)	Normal	++	++	++	CTI y CTIII	Inflamatoria y proliferativa
	Chica (20%)	Normal	++	++	++	CTI y CTIII	Remodelación de la matriz extracelular
<i>A. monostachya</i>	Grande (80%)	Presencia de costra	++++	++++	++	CTIII	Hemostasia e inflamatoria
<i>V. crocata</i>	Chica (80%)	Normal	+	+	+	CTI y CTIII	Remodelación de la matriz extracelular

Los signos (+) representan: poco (+), Intermedio (++) , abundante (+++) y sumamente abundantes (++++). ZCH=zona de cicatrización de la herida, NA=no aplica, VS=vasos sanguíneos, N=neutrófilos y F=fibroblastos, CT= Tipo de colágeno, CTI=colágeno tipo I y CTIII=colágeno tipo III.

Los resultados histológicos sugieren que el tratamiento que mejoró el proceso de cicatrización en los ratones con heridas incisionales fue *V. crocata*, seguido de Recoverón®, *V. dentata*, Vaselina y *A. monostachya* como el que probablemente tuvo el proceso de cicatrización más lento (Figura 17).

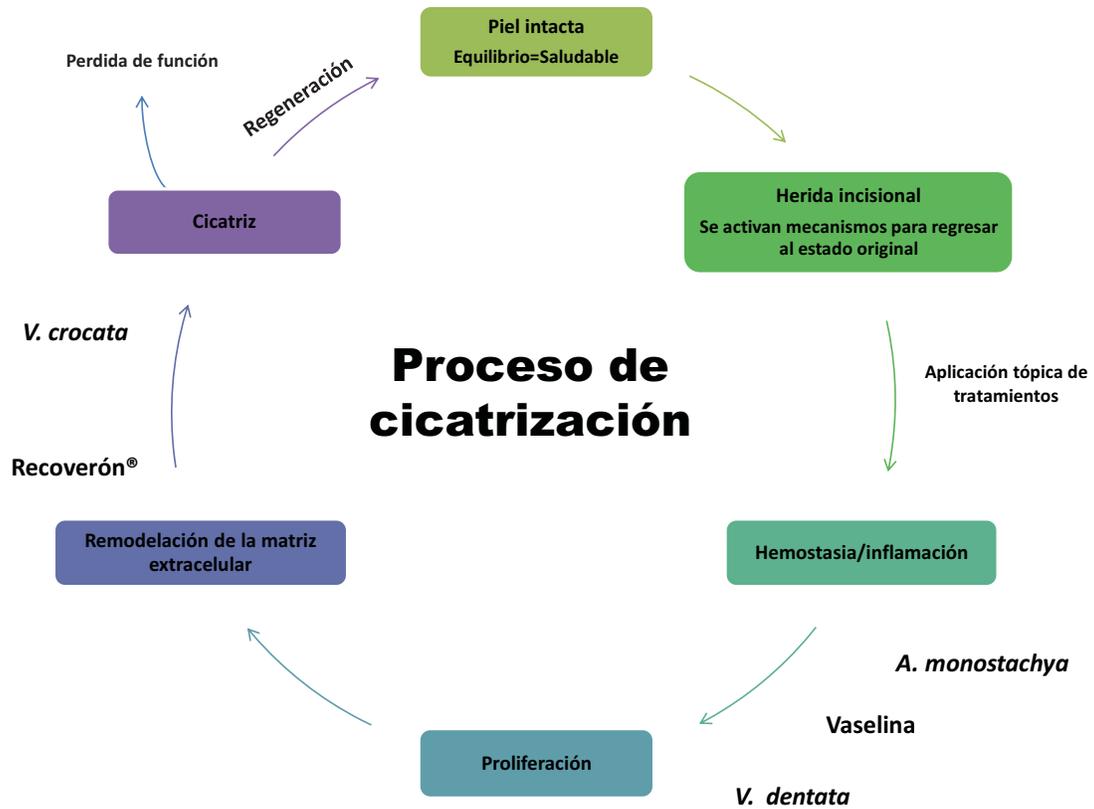


Fig. 17. Etapas del proceso de cicatrización en las que probablemente estén las secciones de piel tratadas de manera tópica con los diferentes tratamientos.

7. DISCUSIÓN

7.1. *V. dentata*

V. dentata es una planta que cuenta con diversos reportes etnobotánicas sobre su uso: antiséptico en Sonora; antitusivo en Quinta Roo (Escalante, 1986); se utiliza para tratar afecciones de la piel, tratar parturientas, aliviar la picadura de hormiga y el chincual granitos por rozadura del pañal en San Rafael Coxcatlán, Puebla (Rosas, 2003). Hay varios estudios en los que se ha reportado la actividad antibacteriana de esta especie en lo referente a bacterias que causan enfermedades intestinales e infecciones de la piel, principalmente se estudió la fracción hexánica y el aceite esencial (Gijon, 2003; Canales *et al.*, 2005, Canales *et al.*, 2008). Sin embargo, las actividades antioxidante y cicatrizante no habían sido reportadas hasta esta investigación.

Para este estudio se obtuvo el extracto metanólico de *V. dentata*; su rendimiento fue del 10.1%, el cual fue menor al obtenido por Gijon (2003) de 15.72%. Esta diferencia puede estar dada en la cantidad de hojas o tallos utilizados en cada extracto. Gijon obtuvo los extractos de las partes aéreas, también solo de hojas y solo tallos, obteniendo rendimientos diferentes, ya que reportó mayor rendimiento en hoja que en tallo.

En cuanto a la caracterización química de *V. dentata* se han descrito en la literatura sesquiterpenos, lactonas sesquiterpénicas y esteroides, como el ácido kaurenico, espatulenol, diversifolina y derivados de la cicloartanona (Bohlmann *et al.*, 1980; Gao *et al.*, 1987; Gao *et al.*, 1989; Gijon, 2003). Esto concuerda con los resultados de este estudio, ya que la reacción con vainillina y ácido sulfúrico indica que hay compuestos terpénicos en el extracto crudo y la FHex. Además, los resultados de la FHex de *V. dentata* en la CG/EM indican que tiene lupeol y vitamina E que son compuestos del tipo terpenoide. También, se han identificados terpenos en varias especies del género (Romo *et al.*, 1975; Box *et al.*, 1977; Bohlmann *et al.*, 1980; Delgado 1982; Liu *et al.*, 1984; Álvarez *et al.*, 1985; Gao *et al.*, 1986; Gao 1987; Gao *et al* 1989; Meragelman *et al.*, 1995; Da Costa 1996; Spring *et al.*, 2000; Marquina *et al.*, 2001; Spring *et al.*, 2003; Ambrosio *et al* 2004; Ambrosio *et al* 2006; Taylor *et. al.*, 2008; Nicolete *et al.*, 2009).

Los resultados de la FMeOH y el extracto crudo de las pruebas coloridas con cloruro férrico y Molisch, así como los resultados del HPLC indican que *V. dentata* cuenta con

compuestos del tipo fenólico. En el HPLC-DAD UV se detectaron un fenol simple, flavonoles y flavonas, algunos de ellos probablemente glicosilados. También, los resultados de HPLC-MS de la FMeOH indican que probablemente contenga ácido gálico y apigenina. Lo anterior, concuerda con lo reportado para *V. lanata*, *V. microphyla*, *V. parishii*, *V. reticulata*, *V. subincisa*, *V. tomentosa*, *V. chenopodina*, *V. deltoidea* y *V. tirangularis* donde se describen principalmente flavonas del tipo apigenina y luteolina (Shilling, 1989). Además, dentro del género *Viguiera* se han descrito en diversas investigaciones compuestos fenólicos, destacan las formas glicosiladas de luteolina, quercetina y apigenina (Glennie y Jain, 1980; Delgado *et al.*, 1984; Schilling *et al.*, 1988; Shilling y Panero 1988; Schilling, 1989).

Los compuestos detectados por las pruebas cualitativas en *V. dentata*, nos indican que tiene saponinas en el Cru pero hasta el momento de la revisión sólo se encontró referencia de presencia de saponinas en un extracto de raíz de *V. decurrens* (Marquina *et al.*, 2001). En cuanto, los resultados para alcaloides en *V. dentata* en la fracción hexánica fueron negativos con el reactivo de Mayer y positivo con el reactivo de Dragendorff, esto podría ser debido a que estos reactivos pueden dar falsos positivos, ya que pueden reaccionar con otras sustancias o incluso algunos alcaloides necesitan de reactivos más específicos para ser identificados (Ringuelet y Viña, 2013). Hasta el momento de esta revisión no se encontraron estudios sobre la presencia de alcaloides en *V. dentata* o alguna especie del género.

En el extracto y la FMeOH de *V. dentata* la actividad antioxidante (Cru 53.01 y FMeOH 45.89 CA₅₀) y la cuantificación de fenoles totales (Cru 126.2 y FMeOH 131.75 mg de EAG/g de extracto) no tuvieron diferencias significativas. La actividad antioxidante está relacionada principalmente con los compuestos fenólicos como flavonoides, dicha familia incluye flavonoles, flavanonas, antocianinas, flavonas y flavonoles, junto con fenilpropanoides o derivados del ácido hidroxicinámico (Rice-Evans *et al.*, 1995). Además, el ácido gálico tiene actividad antioxidante y efecto antiinflamatorio relacionado con el TNF- α (Karimi-Khouzani *et al.*, 2017). La flavona apigenina está relacionada a una mejora en el proceso de cicatrización de heridas debido a su capacidad antioxidante (Shukla *et al.*, 2016) y antiinflamatoria (Lopez-Jornet *et al.*, 2012). En el género *Viguiera* también se han aislado predominantemente chalconas, así como el flavonol quercetina y su variantes glicosiladas. A su vez, la quercetina se considera un fuerte antioxidante debido a su

capacidad para eliminar los radicales libres y unir los iones metálicos de transición (Sakanashi *et al.*, 2008; Young y McEneny, 2001). Sin embargo, Schilling *et al.*, (1989) indica que individuos de *V. dentata* del norte del país, no cuenta con quercetina y sus variantes glicosiladas. Cabe destacar que en el presente estudio tampoco se detectó quercetina.

En cuanto a la actividad cicatrizante podemos indicar que la fuerza de tensión necesaria para abrir la ZCH de la piel de ratones tratados con *V. dentata* fue similar a la del control negativo Vaselina y menor comparada con el control positivo Recoverón®. La fuerza en gramos necesaria para romper la herida refleja la organización subdérmica de las fibras de colágeno recién creadas (Razaini *et al.*, 2004). Además, la organización está determinada por la cantidad y calidad del colágeno recién sintetizado y depositado por los fibroblastos. En la dermis durante el proceso de cicatrización predomina el colágeno tipo I, que es una proteína fibrilar rígida que proporciona resistencia a la tensión, y el tipo III que tiene propiedad contráctil (Barnes *et al.*, 1976). El colágeno del tipo III se presenta en la etapa inicial de la cicatrización de heridas y en la etapa de maduración es remplazado gradualmente por colágeno del tipo I (Wang *et al.*, 2018). Por lo cual, podemos suponer que con la evaluación de este método el tratamiento con el control positivo Recoverón® es mejor que *V. dentata* ya que está mejorando la organización y maduración del colágeno.

La tasa de cierre de la herida de *V. dentata* fue mucho más cercana al Recoverón® y ambas fueron superiores a la velocidad de cierre de Vaselina. Sin embargo, en los tres tratamientos la herida cerró a los quince días. Por lo cual, se debe considerar que durante la contracción, el tamaño de una herida disminuye por el movimiento de la epidermis y dermis en el borde de la herida ya que se desplazan para disminuir el tamaño del defecto. Sin embargo, los proceso de epitelización (formación de epidermis o cierre total de la herida) y contracción son independientes, ya que uno puede producirse sin el otro. La epitelización puede ser considerada como un mecanismo temporario de reparación con el objeto de proporcionar una barrera contra la infección desde el exterior y contra la pérdida de líquido desde el interior (Fitzpatrick *et al.*, 1987). Esto nos indicaría porque a pesar de que la velocidad de cierre de la herida difiere en los tratamientos, el tiempo de cierre de la herida es igual para los tres tratamientos, ya que la formación del epitelio protegerá el resto del tejido permitiéndole seguir con el proceso de cicatrización, aunque este se esté llevando de manera diferente en los individuos tratados con cada uno de los tratamientos.

Los resultados histológicos reafirman lo mencionado anteriormente. Todas las ZCH's presentaron epidermis en las secciones analizadas para cada uno de los tratamientos. Además, al observar la contracción de la ZCH, la piel tratada con Recoverón® tuvo ZCH generalmente grandes (60%), *V. dentata* medianas (80%) y Vaselina medianas (40%), siendo Recoverón la que presentó una menor contracción de la herida. Es importante resaltar que la contracción incluye el movimiento de tejido existente en el margen de la herida, no la formación de tejido nuevo, por lo tanto puede apreciarse a que a medida que la contracción avanza el tejido que rodea la herida se encuentra adelgazado, estirado y bajo tensión (Fitzpatrick *et al.*, 1987), lo cual no se observa en las heridas tratadas con Recoverón® esto podría suponer la formación de tejido nuevo, incluso en las ZCH grandes.

La reparación de heridas es una serie coordinada de fases que tienen tipos de células predecibles (Childs y Murthy, 2017), por lo cual al observar el tejido de granulación nos permitió conjeturar en que parte del proceso de cicatrización se encontraban. El control negativo Vaselina se caracterizó por presentar individuos con inflamación evidente durante el tiempo del tratamiento, lo cual concuerda con lo que se observó en el tejido de granulación, ya que la mayoría de las heridas tenían una gran cantidad de neutrófilos y vasos sanguíneos abundantes (angiogénesis) con una presencia escasa a regular de fibroblastos. Estas características indican que aún se encuentran entre la fase inflamatoria y proliferativa; ya que la primera se caracteriza por la abundancia de neutrófilos que se encargan de desbridar la herida pero que a menudo tarda 72 horas en terminar (Childs y Murthy, 2017; Wang *et al.*, 2018). La segunda se caracteriza por durar entre 4 a 21 días, la presencia de tejido de granulación, angiogénesis, epitelización, la formación de la matriz extracelular y presencia de fibroblastos (Wang *et al.*, 2018). Cuando la herida se encuentra en una etapa intermedia se puede observar a ambos grupos celulares neutrófilos y fibroblastos (Gantwerker y Hom, 2012). También, se tiene que considerar que a pesar de que exista una superposición considerable entre las fases de la cicatrización e incluso diferentes áreas de la herida pueden estar en diferentes fases de curación (Gantwerker y Hom, 2012), la capacidad de transición a la siguiente fase puede determinar si una herida sana adecuadamente (Childs y Murthy, 2017). Entonces, en los ratones tratados con Vaselina a pesar de que se llevó un proceso de cicatrización significativo este podría ser claramente deficiente. Mientras, en comparación los individuos tratados con *V. dentata* se encuentren más cercanos a la fase proliferativa ya

que se pudieron observar un menor número de neutrófilos, vasos sanguíneos y una mayor presencia de fibroblastos en comparación con los tratados con Vaselina.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio las secciones histológicas de piel de ratón tratadas con Recoverón® se encuentran entre la fase proliferativa y la fase de remodelación. Estas fases tienen una duración de 3 semanas a un año. La contracción y remodelación de la herida se caracteriza por la maduración del colágeno tipo III al tipo I, así como por una cantidad importante de fibroblastos (Childs y Murthy, 2017). Esto explica el hecho de que los individuos tratados con Recoverón® necesitaran mayor fuerza de tensión para abrir la herida en comparación con Vaselina y *V. dentata*.

La maduración del colágeno del tipo III al tipo I es una característica de la etapa de remodelación que durar de meses a años (Wang *et al.*, 2018). Se puede observar en las zonas adyacentes de los tres tratamientos la maduración del colágeno. Sin embargo, por lo mencionado anteriormente y de acuerdo al análisis histológico es evidente que con el tratamiento de Recoverón® hay una mayor maduración del colágeno, lo cual concuerda con la mayor fuerza de tensión necesaria para abrir la ZCH, en comparación de los tratamientos de Vaselina y *V. dentata*.

Algunos de los compuestos detectados en *V. dentata* podrían estar ayudando a mejorar el proceso de cicatrización, como el lupeol detectado por CG/EM que tiene la capacidad de mantener la textura y la integridad de la piel promoviendo la regeneración epidérmica y reponiendo las enzimas antioxidantes cutáneas (Gallo y Sarachine, 2009), además, se ha le han atribuido actividades cicatrizantes (Patel *et al.*, 2017) y hay diversas investigaciones sobre su actividad antiinflamatoria (Saleem *et al.*, 2015; Sánchez-Burgos *et al.*, 2015). También, hay que considerar que la aplicación de preparaciones antioxidantes en la superficie de la herida se usa para la normalización del proceso de cicatrización tanto en medicina clínica como experimental (Hallberg *et al.*, 1996). El lupeol también cuenta con actividad antioxidante, ya que fue evaluado con diferentes pruebas (DPPH, H₂O₂, HO•, ABTS•, β-caroteno y superóxido), donde concluyeron que tenía mejores actividades antioxidantes en altas concentraciones (Tchimene *et al.*, 2016). También, se detectó en la FHex de *V. dentata* vitamina E por CG/EM, el cual es un potente antioxidante liposoluble debido a la acción de un captador de radicales peroxilo, donde la importancia de esta función es mantener la integridad de los ácidos grasos

poliinsaturados de cadena larga en las membranas de células y así mantener su integridad (Traber y Atkinson, 2007).

Estas aseveraciones nos indican que existe un mejor proceso de cicatrización en los individuos tratados con Recoverón®, seguidos por los tratados con *V. dentata* y finalmente los tratados con el vehículo Vaseline (Figura 19). Esto concuerda con el uso etnobotánica de *V. dentata* como tratamiento de afecciones de la piel como son las heridas.

7.2. A. monostachya

De acuerdo a la biblioteca de Medicina Tradicional Mexicana (Dzib y Moo, 2009) *A. monostachya* es utilizada en el Valle del Mezquital, Hidalgo, para el tratamiento de heridas con sangre y granos con pus. Se pone un manojo de esta hierba a hervir en 1 L de agua, después se aplica utilizando una gasa, algodón, etc., para lavar las heridas echando constantemente el agua. La cantidad de lavadas depende de lo grande o gravedad de la herida. Para desinfectar la garganta se utiliza esta misma cocción para hacer gárgaras sin tomar el líquido, por lo menos 20 min antes de acostarse y diario hasta que se alivie la infección. De manera similar, en el Valle de Tehuacán es utilizada en el baño para parturientas, granos, infección de heridas, quemaduras e inflamación (Rosas, 2003; Canales *et al.*, 2006).

Las propiedades biológicas de *A. monostachya* se han estudiado con el extracto hexánico, el cual es activo sobre *S. aureus*, *S. epidermidis*, *V. cholerae* y *S. thyphi*. Mientras, el extracto metanólico también es activo en *S. lutea* y *B. subtilis*, pero no en *S. thyphi*. También, reportan que el extracto metanólico cuenta con una potente actividad antioxidante. Además, se determinó que el extracto metanólico es tóxico en el modelo de *Artemia salina* con una concentración letal media de (CL₅₀) de 4.5 µg/mL (Canales *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de que se ha relacionado su capacidad antioxidante como probable anti-inflamatorio, hasta el momento de esta revisión no se ha reportado la validación de su actividad como cicatrizante.

Para *A. monostachya* se ha reportado el rendimiento del extracto hexánico de 1.96 g y 11.14 g para el metanólico, obtenido de 100 g la parte aérea con flores y semillas (Canales *et al.*, 2011). En este trabajo también se utilizó la parte aérea incluyendo las

flores y semillas. Sin embargo el rendimiento de la FHex fue mayor al reportado (4.6 g) y en cuanto a la FMeOH los rendimientos fueron similares.

Las pruebas para terpenos y lactonas sesquiterpénicas dieron positivo en la FHex y el Cru de *A. monostachya*. Hasta el momento de la revisión no se encontró información de dichos compuestos para esta especie. Asimismo, los resultados de CG/EM de la FHex determinaron al triterpeno α -amirina como el más abundante, lo cual concuerda con la prueba realizada de Liebermann-Buchard para esteroides detectados en el extracto crudo y la FMeOH. Además, para otras especies del género se han reportado compuestos de este tipo como en *A. californica* α -sitosterol y estigmasterol (Rascón-Valenzuela *et al.*, 2015), *A. australis* β -sitosterol y daucosterol (Wang *et al.*, 2008), *A. brachystachya* el ácido ursólico y en *A. brachystachya* espinasterol (Seebaluck *et al.*, 2015). En pruebas cualitativas se han reportado en las hojas de *A. alnifolia* (Noumedem *et al.*, 2013; Revathi *et al.*, 2013). En otras especies del género se han identificado diversos terpenos como en *A. ornata* el viridifloreno, aplopanona, ledol, apiol y cis-erolidol (Onocha *et al.*, 2011) y *A. segetalis* contiene α -pineno y 1,8-cineol (Aboaba *et al.*, 2010).

En el Cru y la FMeOH de *A. monostachya* se detectaron compuestos del tipo fenólico/flavonoide, con la prueba de cloruro férrico y por el análisis por HPLC-DAD UV, en este último se identificaron constituyentes del tipo fenol, flavonona y flavonas. Anteriormente en *A. monostachya* se han reportado compuestos del tipo flavona, flavanona y ácidos fenólicos por HPLC DAD UV (Canales *et al.*, 2011). También, en otras especies como *A. hispidina* se han identificado algunos flavonoles como kamferol y quercetina (Noumedem *et al.*, 2010). En *A. indica* se ha descrito que tiene kamferol (Nahrstedt *et al.*, 2006). En *A. fruticosa* se han identificados apigenina (Reiersen *et al.*, 2003) y compuestos del tipo fenólico/flavonoide como taninos, flavononas y antraquinonas (Gopalakrishnan *et al.*, 2010). También, en *A. californica* se han identificado quercetina y ácido elágico (Rascón-Valenzuela *et al.*, 2015). A su vez, *A. alnifolia* tiene taninos y flavonoides; *A. australis* tiene ácido gálico y rutina; *A. wilkesiana* ácido gálico, corilagina y geranina; y *A. hispidina* cuenta con ácido gálico corilagina y geranina (Seebaluck *et al.*, 2014).

Por otro lado, la prueba para saponinas fue negativa en el Cru, la FMeOH y FHex de *A. monostachya*. No obstante, se han encontrado presentes en *A. fruticosa* (Gopalakrishnan *et al.*, 2010).

La prueba de Dragendorff tuvo resultado positivo para la detección de alcaloides en la FHex, lo cual es factible, ya que algunas especies del género *Acalypha* cuentan con acalifina como en el caso de *A. indica* (Nahrstedt, 1981), *A. fruticosa* (Reiersen *et al.*, 2003) y *A. siamensis* (Kambara *et al.*, 2006). Además, se ha reportado la presencia en general de alcaloides como en *A. fruticosa* (Gopalakrishnan *et al.*, 2010). El alcaloide acalifina está en forma de glicósido cianogénico en *A. indica* (Nahrstedt *et al.*, 1981), esto es coincidente con la reacción positiva de la prueba de glicósidos en el Cru, la FMeOH y la FHex. También, el resultado positivo de esta prueba puede ser debido a que, anteriormente han sido identificadas en el género sustancias como la rutina que es la forma glicósilada de la quercetina en *A. australis* (Wang *et al.*, 2008).

A. monostachya en su FMeOH y el Cru tuvieron diferencias significativas en la actividad antioxidante, ya que este último fue más activo frente al radical DPPH. Esto es debido probablemente a que en el momento de la partición, se obtuvo una fracción insoluble en metanol y hexano, que probablemente contenga compuestos con actividad antioxidante, los cuales están presentes en el extracto crudo pero no en la FMeOH. A su vez, se debe considerar que estos resultados nos podrían indicar que en este caso no sólo los compuestos polares como los fenoles están actuando como antioxidantes, sino también otras sustancias como los terpenos (Evans *et al.*, 2000; Grassman *et al.*, 2002).

La actividad antioxidante tan diferente entre el Cru y la FMeOH se clarifica con la cuantificación de fenoles totales ya que en el Cru tiene una mayor cantidad de fenoles (107.56 mg de EAG/g de extracto) y comparación con la FMeOH (32.36 mg de EAG/g de extracto). Aproximadamente es la tercera parte de lo que contiene el Cru, por lo cual a pesar de ambos cuentan con compuestos fenólicos, en uno hay una mayor concentración de estos.

La cantidad de fenoles totales investigados en otras especies del género, en algunos casos se acercan más a los obtenidos en la FMeOH de *A. monostachya* por ejemplo en *A. alnifolia* en el extracto metanólico de hojas tuvo 24.33 mg EAG/g y el extracto de acetona

fue de 35.97 mg EAG/g (Revathi *et al.*, 2013). Pero en otros casos se puede observar que hay una variante importante entre los compuesto polares y de polaridad intermedia. En *A. indica* en los extractos de la parte aérea en MeOH contiene 41 mg EAG/g y en Acetona tiene 61 mg EAG/g (Perera *et al.*, 2016). Por lo anterior, se podría considerar que el extracto crudo puede contar con compuestos fenólicos de diferente polaridad que potencialicen su actividad antioxidante. Esta característica de diferente polaridad se ve en compuestos fenólicos como los flavonoides, en los cuales muchas veces los más polares no necesariamente cuentan con más grupos hidroxilos, ya que estos pueden estar glicosilados, lo cual disminuye su actividad antioxidante pero se incrementa su polaridad. También, se debe considerar que las propiedades de los flavonoides se ven favorecidas por varios aspectos: 1) la sustitución en orto de los grupos hidroxilo en el anillo B, 2) la sustitución en meta de grupos hidroxilo del anillo A; y 3) la presencia de un doble enlace, la combinación de un grupo ceto y un grupo hidroxilo en el anillo C (Carlaya y Reynaldo, 2001).

Canales y colaboradores (2011) evaluaron la capacidad antioxidante del extracto metanólico de *A. monostachya* mediante la reducción del radical DPPH, observando una pronunciada acción con un $CA_{50} = 3.45 \mu\text{g/mL}$, la cual es mucho mayor a la que se obtuvo en este estudio del Cru con una $CA_{50} = 33.55 \mu\text{g/mL}$ y de la FMeOH con una $CA_{50} = 150 \mu\text{g/mL}$. También, otras especies de *Acalypha* han sido evaluadas frente al radical DPPH, entre ellas se encuentra *A. racemosa* (Cameroon, Africa), la cual mostro una CA_{50} de $2.11 \pm 1.13 \mu\text{g/mL}$ en el extracto metanólico de hojas y en el extracto metanólico de tallos fue de CA_{50} de $2.28 \pm 0.98 \mu\text{g/mL}$ (Djacobou *et al.*, 2014). Mientras tanto en *A. fruticosa* (India) en la prueba de DPPH el extracto metanólico de hojas mostró una CA_{50} de $92 \pm 0.81 \mu\text{g/mL}$ (Thambiraj *et al.*, 2012). Incluso hay variaciones en la misma especie como en *A. indica* con sus extractos metanólicos frente al radical DPPH se han obtenido valores de CA_{50} desde 0.4 mg/mL (Pragada *et al.*, 2011) hasta 7.79 mg/mL (Sanseera *et al.*, 2012). La variación en los resultados dentro de la misma especie pueden estar influenciados por la forma en que los investigadores preparan la muestra y de dónde proviene la planta (Zahidin *et al.*, 2017) e incluso la fecha de colecta. Esto puede ser debido a la síntesis especie especifica de metabolitos secundarios, lo que es parte de una estrategia adaptativa de las plantas, ya que se modifica de acuerdo a las condiciones ambientales (Sepúlveda *et al.*, 2003). Por otro lado, también se tiene que considerar que en este estudio se evaluó el extracto crudo de toda la parte aérea de la planta y en las otras

especies se evaluaron sólo las hojas (*A. racemosa* y *A. fructicosa*) o los tallos (*A. racemosa*), lo cual también es importante, ya que los metabolitos por lo general no se encuentran distribuidos de manera homogénea dentro de la planta. Tomando en cuenta estos valores, podemos ver que existen diferencias claras en la capacidad antioxidante entre las especies del género e incluso entre la misma especie.

La evaluación de la actividad cicatrizante por el método del tensiómetro indica que los ratones cuyas heridas fueron tratadas de manera tópica con *A. monostachya* presentaron un proceso de cicatrización más lento en comparación con que Vaselina y Recoverón®. Esto a pesar de que de acuerdo a las tendencias la velocidad de cierre de la herida fue más rápida con la aplicación de *A. monostachya* que con la de Recoverón®. Esto probablemente se deba como se mencionó anteriormente, a los procesos de epitelización (formación de epidermis o cierre total de la herida) y contracción son independientes, ya que uno puede producirse sin el otro (Fitzpatrick *et al.*, 2014). Además, de acuerdo al análisis histológico algunos de los individuos presentaban costra, abundante presencia de neutrófilos, vasos sanguíneos, presencia intermedia de fibroblastos y mayor abundancia del colágeno del tipo III, por lo cual podrían estar aun en las etapas iniciales del proceso de cicatrización, es decir en la fase inflamatoria donde existe una respuesta vascular (hemostasia), que en primera instancia evita la hemorragia a través de la formación de tapón plaquetario (costra) y posteriormente aumenta la permeabilidad que permite la respuesta inmune (neutrófilos) (Childs y Murthy, 2017). Sin embargo, los demás individuos cuentan con cantidad intermedia de vasos sanguíneos, neutrófilos, fibroblastos y se observa la maduración del colágeno del tipo III al I en las zonas adyacentes. Debido a estas premisas se podría considerar que se encuentran en la fase proliferativa: tejido de granulación en el que se encuentran depósitos de colágeno, angiogénesis y epitelización (Childs y Murthy, 2017; Shrivastav *et al.*, 2018). Incluso en individuos con la ZCH chica (20%), se puede ver procesos de regeneración de la dermis donde se puede observar la estratificación similar a la de piel intacta.

Como se mencionó anteriormente, la actividad antioxidante está relacionada a una mejora en los procesos de cicatrización y en *A. monostachya* se encuentra el compuesto triterpénico α -amirina, el cual está relacionado con el funcionamiento de enzimas endógenas antioxidantes que ayudan a modular el estrés oxidativo hepático (Singh *et al.*, 2015). Este compuesto también cuenta con actividad antiinflamatoria dependiente de la

dosis, aplicado de manera tópica en edema de oreja de ratón (Otuki *et al.*, 2005). Además, se ha determinado que cuenta con otras actividades biológicas como: citotóxico (Wang *et al.*, 2010) y antinociceptivo (Oliveira *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2008).

Los resultados de la actividad cicatrizante no coinciden con el uso etnobotánico de la planta. Sin embargo se debe considerar que debido a la alta capacidad antioxidante de *A. monostachya*, podría funcionar en patologías que afectan los procesos de cicatrización como la diabetes, en la cual el estrés oxidativo esta exacerbado y se presentan con mayor incidencia heridas crónicas, debido al exceso de glucosa que promueve la formación de radicales libres produciendo estrés oxidante (Soneja *et al.*, 2005), o en la obesidad mórbida, donde hay un incremento de citocinas pro-inflamatorias y al mismo tiempo se da una reducción de enzimas antioxidantes (Mottillo *et al.*, 2010). Incluso, al modificar la el vehículo o la dosis aplicada del Cru de *A. monostachya* podría generar resultados distintos, ya que los antioxidantes pueden retrasar o inhibir los procesos oxidativos, siempre que sean utilizados en concentraciones óptimas (Islam *et al.*, 2016). La concentración elevada de antioxidantes podría inhibir el mecanismo de acción que tienen neutrófilos y macrófagos que desbridan la herida mediante la producción de ERO (Moncada y Higgs, 1993). Por lo cual, si no se concluye de manera normal la fase de inflamación puede retrasar la curación de la herida (Sathyanarayanan *et al.*, 2017).

Bajo estos modelos de evaluación (evaluaciones físicas y análisis histológico) podemos aseverar que el tratamiento que promovió un mejor proceso de cicatrización es Recoverón® que se encuentra entre las fases proliferativa-remodelación y además cuenta con mayor fuerza de tensión para abrir la ZCH; seguido por Vaselina que se encuentra entre la fase inflamatoria y proliferativa; finalmente *A. monostachya* debido a la presencia de individuos aun en la fase inflamatoria, falta de epitelización, menor fuerza de tensión para abrir la ZCH y a pesar de tener una mayor tasa de cierre total de la herida fue el que menos promovió el proceso de cicatrización (Figura 19).

7.3. *V. crocata*

V. crocata de acuerdo a la biblioteca de Medicina Tradicional Mexicana (2009) en Morelos se emplea para tratar afecciones ginecológicas como la retención de la placenta en el postparto. En Michoacán se utiliza para limpiar la matriz, se administra el cocimiento de la raíz por vía oral y en ayunas. También, en Guerrero se utiliza “para curar por dentro a la parturienta” se le practican baños con la infusión y se le da de beber una tacita de ésta. Mientras, en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Puebla-Oaxaca), el uso que se le da principalmente a *V. crocata* es para el tratamiento de aftas mediante gárgaras, utilizada para tratar parturientas y restaurar la cadera, infección de heridas, garganta irritada, tratamiento para ronchas, quemaduras y curación de los granos provocados por la varicela (Rosas, 2003). También, *V. crocata* ha sido reportada para el tratamiento de heridas en la piel y afectaciones dermatológicas (Biodiverstylibrary, 2018).

Las actividades biológicas reportadas para *V. crocata* incluyen la actividad antiinflamatoria con el modelo de inducción de edema en cojinete plantar por carragenina en ratón CD-1 (Rodríguez, 2014). Además, se evaluó la toxicidad de *V. crocata* en ensayo agudo y subcrónico con una administración de 100mg/K/día vía oral en ratón CD-1 y los resultados indican que no produce efectos evidentes de toxicidad (Guerrero, 2016). También, García (2016) evaluó la capacidad cicatrizante y antimicrobiana donde reporta que el extracto acuoso de *V. crocata* no tiene actividad, sin embargo no indican la procedencia de la planta y de que órgano se obtuvo el extracto. La actividad antioxidante de *V. crocata* no ha sido reportada hasta el momento de la revisión.

Con *V. crocata* se obtuvo un rendimiento del 17% del extracto metanólico, resultado similar al reportado por Guerrero (2016) que obtuvo un rendimiento del 17.5% mediante extracción acuosa del material seco y no menciona que partes se utilizaron.

Este es el primer estudio fitoquímico realizado sobre *V. crocata*, por lo cual se realizó una comparación con especies del género y tomando en consideración la revisión química de Mora y colaboradores (2013) del género *Verbesina* que indican que dentro de los compuestos más abundantes se encuentran los terpenos con un 75.5%, aromáticos 12.8%, flavonoides con solo un 3.5% y alcaloides 2.9%.

El Cru y la FHex de *V. crocata* dieron positivo para la identificación de terpenos con vainillina y ácido sulfúrico. Además, en la FHex analizada por CG/EM se detectó como compuesto principal la vitamina E. Como se mencionó anteriormente dentro de los compuestos más abundantes del género *Verbesina* se encuentran los terpenos del tipo eudesmano, germacreno y elemenólido. Además, se han descrito diterpenos derivados del tipo kaureno (Mora *et al.*, 2013). La FHex de *V. crocata* contiene esteroides y se han reportado en otras especies del género incluyendo los verbesinósidos A-F, sitosterol, taraxasterol, lupeol y el copterósido E (Mora *et al.*, 2013). Las lactonas sesquiterpénicas son una característica constituyente de la familia Asteraceae y también están presentes en especies del género *Verbesina*. En *V. coahuilensis* se han encontrado del tipo elemenólido como verafinina, verafina B y verafina C (Mora *et al.*, 2013) y en *V. seatonni* zempoalinas A-D (Ortega *et al.*, 1985). Sin embargo, en este trabajo la prueba de Baljet en el Cru, FMeOH y FHex de *V. crocata* fue negativa.

El extracto Cru y la FMeOH de *V. crocata* dio positivo a la reacción de cloruro férrico para fenoles. También por HPLC-DAD-UV se detectaron compuestos del tipo flavona y fenol. Lo cual concuerda con lo reportado en otras especies del género en las que se han descrito compuestos fenólicos. Se detectó ácido siríngico en *V. sublobata* *V. myriocephala*. En *V. gigantea* se detectó ácido ferúlico, en *V. myriocephala* y *V. virginica* ácido p-coumárico y verbesindiol (Herz y Kumar, 1980). En flores y hojas de *V. encelioides* se han aislado flavonoles glicosilados del tipo quercetina (Glennie y Jain, 1980). En *V. myriocephala* tiene ramnocitrina glicosilada (Wagner *et al.*, 1973), lo cual podría explicar que la FMeOH y el Cru dieran positivo a la prueba de Molish en los resultados de este estudio.

No hubo resultados indicativos de presencia de saponinas. Sin embargo para otra especie *V. virginica* si se ha reportado estos compuestos (Xu *et al.*, 2010).

De acuerdo a las reacciones coloridas para la detección de los diferentes grupos de metabolitos secundarios, *V. crocata* presenta alcaloides en la FHex y el Cru. En algunas especies del género *Verbesina* se han extraído alcaloides derivados de la guanidina, como la galegina presente en *V. encelioides* y las caracasanamidas de *V. caracasana* (Mora *et al.*, 2013).

V. crocata en su extracto Cru presentó una CA_{50} ante el radical DPPH de 464.66 $\mu\text{g/mL}$ y para la FMeOH fue de CA_{50} de $417.6 \pm 28.65 \mu\text{g/mL}$. Tomando en cuenta que la FDA (Food and Drug Administration, USA) considera como antioxidante aprobado a aquel que presente un CA_{50} menor a 200 $\mu\text{g/mL}$ (Gardziella *et al.*, 2000). Esta aseveración nos permite considerar que *V. crocata* no tiene capacidad antioxidante frente al radical DPPH. Aunque, la elevada concentración de vitamina E detectada por CG/EM en la FHex debería ser evaluada su capacidad antioxidante mediante otros métodos, ya que el modelo de DPPH solo permite evaluar antioxidantes muy polares y la vitamina E no es un compuesto polar, pero, es un potente antioxidante soluble en lípidos (Traber y Atkinson, 2007). En otras especies del género como *V. encelioides* fue evaluada su actividad antimicrobiana y su capacidad antioxidante del extracto acuoso de raíces con DPPH, en el cual se encontró que el máximo de reducción obtenido fue de 20% a una concentración de 80 $\mu\text{g/mL}$ (Satish *et al.*, 2008). Sin embargo no evaluaron la CA_{50} , además se estudió el extracto acuoso de raíz mientras en este trabajo se realiza con el extracto metanólico de la parte aérea de *V. crocata*. Por lo tanto, puede existir diferencia en los metabolitos presentes en ambos estudios dependiendo de la especie y la parte vegetal evaluada. Además, en *V. encelioides* también se ha determinado la cantidad de fenoles totales donde el extracto de hojas contiene 22.5 mg EAG/g y en tallos 18.31 mg EAG/g (Jain *et al.*, 2015). El contenido de fenoles es similar a la que encontramos en *V. crocata* en donde el Cru= 19.82 mg EAG/g de extracto y FMeOH=18.12 mg EAG/g de extracto.

En la evaluación de la actividad cicatrizante del extracto Cru de *V. crocata*, se pudo observar que se necesitó mayor fuerza de tensión para abrir la ZCH, que en el tratamiento con Vaselina e incluso que Recoverón®. Además, presentó una mayor velocidad de cierre de la herida que la de Vaselina y Recoverón®. A su vez, los individuos tratados con *V. crocata* presentaron al día doce el cierre total de la herida en comparación con los quince días que tuvieron los controles antes mencionados. Asimismo, de acuerdo al análisis histológico se observaron ZCH chicas o regeneradas, epidermis similar al tejido sano e incluso hay un individuo que presentó regeneración de la dermis con la estratificación característica, la presencia de folículos pilos y glándulas sebáceas. En la dermis de la piel de los ratones tratados de manera tópica con *V. crocata* presentaron poco o nulo tejido de granulación, ya que tiene pocos neutrófilos, fibroblastos y vasos sanguíneos característicos de dicho tejido. Además, presentó una mayor contracción y colágeno del tipo I en lo que resta de la ZCH. Bajo estas premisas se puede considerar que las

cicatrices de los ratones cuyas heridas incisionales fueron tratadas con *V. crocata* están en la fase de remodelación, ya que esta comienza cuando la matriz extra celular provisional y el colágeno de tipo III se reemplazan con colágeno de tipo I, los tipos de células restantes de las fases previas sufren apoptosis, con la colocación del colágeno tipo I, la resistencia a la tracción de la herida aumenta drásticamente, el tejido de granulación comienza a involucionar y el exceso de vasos sanguíneos se retrae (Gantwerker y Hom 2012).

La baja actividad antioxidante frente al radical DPPH de *V. crocata* no afecta su actividad cicatrizante. Esto puede estar relacionado al tipo de compuestos que le dan dicha propiedad, como por ejemplo el extracto hexánico de *V. persicifolia* es antiinflamatorio y antiproliferativo, debido a los compuestos aislados, sesquiterpenos del tipo eudesmano (Dalla *et al.*, 2014). Además, la Vitamina E identificada por CG/EM en este trabajo se ha reportado que su aplicación tópica en forma de emulsión (transferosomas) promueve la proliferación de queratinocitos y fibroblastos; la migración celular y protege a las células de la piel del daño oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno, lo que da como resultado una aceleración del cierre de la herida en piel (Caddeo *et al.*, 2018). También, como se mencionó anteriormente, el género cuenta con baja concentración de compuestos fenólicos, por lo que el efecto reportado y el uso etnobotánico de la planta tal vez sean producto de compuestos de naturaleza no polar.

En comparación con los grupos de ratones a los que se les aplicó Vaselina y Recoverón® podemos aseverar que el tratamiento que promovió un mejor proceso de cicatrización fue *V. crocata*. Ya que Vaselina se encuentra entre la fase inflamatoria y proliferativa, Recoverón® se encuentra aún entre las fases proliferativa-remodelación y *V. crocata* estaba en la fase de remodelación que es la etapa final del proceso de cicatrización.

7.4. Comparativo de la actividad antioxidante y cicatrizante de las tres plantas y los controles

La planta con mayor actividad antioxidante fue *A. monostachya*, seguida de *V. dentata* y finalmente *V. crocata*. Sin embargo, en la cuantificación de fenoles presentó una mayor concentración *V. dentata*, seguida de *A. monostachya* y finalmente *V. crocata*. Los resultados de HPLC indican la presencia de compuestos fenólicos en las tres plantas. Entonces, la diferencia en la capacidad antioxidante de las tres plantas debe de estar

relacionada con el tipo de compuestos fenólicos y su estructura (Carlaya y Reynaldo, 2001).

En la actividad cicatrizante sobresale el tratamiento de *V. crocata*, ya que las secciones analizadas nos indican que se encuentra en la fase de remodelación, es seguida por Recoverón® que se encuentra entre la fase proliferativa y la fase de remodelación. Posteriormente, se encuentra *V. dentata* que se encuentra en la fase proliferativa, enseguida se encuentra Vaselina que esta entre la fase inflamatoria y proliferativa; y finalmente se encuentra *A. monostachya* en la fase inflamatoria debido a la presencia de costra, falta de epitelización, menor fuerza de tensión para abrir la ZCH.

Estos resultados indican que el estrés oxidativo no es el único factor que afecta al proceso de cicatrización, pues no hay una relación directamente proporcional entre la actividad antioxidante y la cicatrizante, ya que *V. crocata* que tuvo la menor actividad antioxidante frente al radical DPPH, pero fue el que tiene los mejores resultados en la evaluación de cicatrización y por lo contrario *A. monostachya* que tuvo la mayor actividad antioxidante fue el que tuvo el proceso de cicatrización más lento. Sin embargo, actualmente se ha relacionado la capacidad antioxidante con la mejora del proceso de cicatrización. Como en el caso de extracto de hojas de *Clerodendrum infortunatum* L. tienen como compuestos principales componentes fenólicos a los que se les atribuye sus efectos farmacológicos como la actividad cicatrizante en modelo de heridas excisional e incisional en ratas albinas Wistar (Gouthamchandra *et al.* 2010). De igual forma, se ha demostrado que los antioxidantes derivados de *Chromolaena odorata* ayudan a curar heridas a través de su actividad antioxidante, ya que protege del peróxido de hidrogeno y de la hipoxantina-xantina oxidasa a los fibroblastos y queratinocitos en cultivo (Parsaeimehr *et al.*, 2014). También, el látex de *Jatropha neopauciflora* con una alta capacidad antioxidante y concentración de fenoles totales mejoró el proceso de curación de heridas en ratones CD-1 (Hernández-Hernández *et al.*, 2017).

Dentro de esta relación antioxidante/cicatrizante se tienen que tener varias consideraciones reportadas: 1) a pesar de que los compuestos fenólicos son los antioxidantes por excelencia, hay otras sustancias como los terpenos que pueden tener dicha actividad (Evans *et al.*, 2000; Grassmann *et al.*, 2002). 2) La bioactividad de los fitoquímicos está relacionada con sus estructuras moleculares, que les dan propiedades específicas (Parsaeimehr *et al.*, 2014). 3) Los antioxidantes pueden retrasar o inhibir los

procesos oxidativos siempre que sean utilizados en concentraciones óptimas (Islam *et al.*, 2016). 4) La concentración elevada de estos compuestos podría inhibir el mecanismo de acción que tienen neutrófilos y macrófagos que desbridan la herida mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (Moncada y Higgs, 1993). Así, si no se concluye de manera normal la fase de inflamación puede retrasar la curación de la herida (Sathyanarayanan *et al.*, 2017). Estas premisas nos podrían llevar a considerar que los fitoquímicos activos en *V. crocata* no necesariamente son compuestos fenólicos. Mientras, que en *A. monostachya* el excedente de compuestos antioxidantes podría estar afectando el proceso inflamatorio y por lo tanto retrasando la curación de la herida.

Por lo cual podemos discernir que bajo las condiciones en las que se llevó la investigación, claramente tiene mejor capacidad cicatrizante *V. crocata* en comparación con el resto de los tratamientos, ya que permitió el cierre total de la herida en menor tiempo, mayor contracción de la herida y facilitó el proceso de cicatrización, pues de acuerdo al análisis histológico se encontraba en la fase de remodelación

8. CONCLUSIONES

- La planta *A. monostachya* en su fracción hexánica cuenta con α -amirina como principal constituyente, este compuesto tiene reportadas actividades antiinflamatoria, antioxidante y antinociceptiva.
- La planta *V. dentata* en su fracción hexánica cuenta con lupeol como principal constituyente, este compuesto tiene reportadas actividades antiinflamatoria, antioxidante y cicatrizante.
- La planta *V. crocata* tiene vitamina E como el compuesto más abundante en la FHex, tiene reportadas actividades antioxidante y cicatrizante.
- Las tres plantas en su parte polar cuentan con compuestos fenólicos y flavonoides.
- La FMeOH de *V. dentata* tiene ácido gálico y baicaleina de acuerdo al análisis de HPLC-ESI-TOF/MS.
- *A. monostachya* presentó la mayor actividad antioxidante frente al radical DPPH, seguida de *V. dentata* y finalmente *V. crocata*.
- *V. dentata* es la planta con mayor cantidad de compuestos fenólicos, seguida de *A. monostachya* y *V. crocata*.
- Las pieles de ratón tratadas de manera tópica con *V. crocata* son las que requirieron mayor fuerza de tensión para abrir la zona de cicatrización de la herida, seguida de las tratadas con *V. dentata* y finalmente *A. monostachya*.
- Las heridas de los ratones tratadas con *V. crocata* cerraron de manera más rápida que las tratadas con *V. dentata* y *A. monostachya*.
- El análisis histológico de las secciones de piel de ratón que se les aplicaron los distintos tratamientos tópicos nos indican que *V. crocata* mejora el proceso de cicatrización, ya que las heridas están en la fase de remodelación de la matriz, seguida de las tratadas con *V. dentata* que se encuentran al final de la fase

inflamatoria y principio de la fase de proliferación y las heridas tratadas con *A. monostachya* se encuentran en la fase inflamatoria.

- *V. crocata* fue el tratamiento que de acuerdo a las evaluaciones físicas e histológicas tuvo la mejor actividad cicatrizante.
- Las plantas *V. crocata*, *V. dentata* y *A. monostachya* favorecen el proceso de cicatrización. Lo cual concuerda con su uso etnobotánico.

9. LITERATURA CITADA

Aboaba, S. A., Aiyelaagbe, O. O. y Ekundayo, O. 2010. Chemical composition toxicity and larvicidal activity of the essential oil from the whole plant of *Acalypha segetalis* from southwest Nigeria. *Nat Prod Commun.* 5 (3):481–483.

Agilent Technologies, 2016. Espectrometría de masas: Fundamentos y Teoría. *Academic & Institutional Research.* 43 pp.

Ambrosio, S. R. Schorr, K. y Da Costa, F. B. 2004. Terpenoids of *Viguiera arenaria* (Asteraceae). *Biochem Sys Ecol.* 32:221-224.

Ambrosio, S. R., Tirapelli, C. R., Da Costa, F. B., y De Oliveira, A. M. (2006). Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. *Life Sciences*, 79(10):925-933.

Andrades, P., Sepúlveda, S. y González, J. 2004. Curación avanzada de heridas. *Rev. Chil Cir.* 56:4, 396-403.

Álvarez, L., Mata, R., Delgado, G., y De Vivar, A. R. 1985. Sesquiterpene lactones from *Viguiera hypargyrea*. *Phytochemistry.* 24 (12):2973-2976.

Ashcroft, G. S., Herrick, S. E., Tarnuzzer, R. W., Horan, M. A., Schultz, G. S. y Ferguson, M. W. 1997. Human ageing impairs injury-induced in vivo expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)-1 and -2 proteins and mRNA. *J Pathol.* 183(2):169-76.

Auf dem Keller, U., Kümin, A., Braun, S. & Werner, S. 2006. Reactive Oxygen Species and Their Detoxification in Healing Skin Wounds. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 11(1): 106-111.

Barja, G. 2004. Free radicals and aging. *Trends Neurosci.* 27(10):595-600.

Barnes, M. J., Morton, L. F., Bennett, R. C., Bailey, A. J. y Sims, T. J. 1976. Presence of type III collagen in guinea-pig dermal scar. *Biochem J.* 157 (1): 263-266.

Berman, B. Madera, A. y Raphael, B. 2017. Keloids and hipertrophic scars: Pathophysiology, classification, and treatment. *Dermatol Surg.* 43:S3-S18.

Berlett, B. S. y Stadtman, E. R. 1997. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J. Biol Chem.* 272(33):20313-20316.

Bhourri, W., Boubaker, J., Kilani, S., Ghedria, K. y Chekir-Ghedira. 2012. Flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): Kaempferol 3-O- β -isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O- β -isorhamninoside protect against DNA damage in human lymphoblastoid cell and enhance antioxidant activity. *S African J Bot.* 80:57-62.

Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana. 2009. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Revisado noviembre 2018. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7043>

Bickers, D. R. y Athar, M. 2006. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol.* 126(12): 2565-2575.

Biodiversitylibrary, 2018. Revisado en noviembre de 2018.

<https://www.biodiversitylibrary.org/item/13783#page/1698/mode/2up>

Biswas, T. K., Pandit, S., Chakrabarti, S., Banerjee, S., Poyram N. y Seal, T. 2017. Evaluation of *Cynodon dactylon* for wound healing activity. *J Ethnopharmacol.* 197:128-137.

Bohlman, F., Grenz, M., Gupta, R. K., Dhar, K. A., Ahmed, M., King, M. R. y Robinson, H. 1980. Eudesmane derivatives from *Verbesina* species. *Phytochemistry.* 19:2391-2397.

Box, V. G. S., Barbouille, V. y Chan, W. R. 1977. Enantio-eudesmane sesquiterpenes from *Verbesina rupestris*. *Phytochemistry.* 16:987-990.

Caddeo, C., Manca, M. L., Peris, J. E., Usach, I., Diez-Sales, O., Matos, M., Fernández-Busquets, X., Fadda, A. M. y Manconi, M. 2018. Tocopherol-loades transfersomes: In vitro antioxidant activity and efficacy in skin regeneration. *Int J Pharma.* 551(1-2): 34-41.

Canales, M. M., Hernández, T. D., Caballero, N. J., Romo de Vivar, R., Ávila, G., Durán, A. D. y Lira, R. S. 2005. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlan, Pebla, México. *J Ethnopharmacol.* 97: 429-439.

Canales, M., Hernández, T., Rodríguez-Monroy, M. A., Jiménez-Estrada, M., Flores, C. M., Hernández, L. B. Hernández, Gijón, I. C., Quiróz, S., García, A. M. y Avila, G. 2005. Antimicrobial activity of extracts and essential oil of *Viguiera dentata*. *Pharmaceutical Biology.* 46:719-723.

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

Canales, M., Hernández, T., Rodríguez-Monroy, M. A., Flores, C. M., Jiménez-Estrada, M., Hernández, L. B., Duran, A., Hernández-Moreno, M., Trejo, N. A., Hernández, A. B., Ramírez, J. J., Orozco, J., Eleno, M. G. y Martínez, K. E. 2011. Evaluation of the antimicrobial activity of *Acalypha monostachya* Cav. (Euphorbiales: Euphorbiaceae). *Afr J Pharm Pharmacol.* 5 (5):640-647.

Carlaya, O. y Reynaldo, I. 2001. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales.* 22 (2):5-14.

Carocho, M. y Ferreira, I. C. F. R. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol.* 51:15-25

Casas, A., Valiente-Banuet, A., Viveros, J. L., Caballe, J., Cortés, L., Dávila, P., Lira, R. y Rodríguez, I. Plant Resources of the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México. *Econ Bot.* 55 (1):129-166.

Childs, D. R. y Murthy, A. S. 2017. Overview of wound healing and management. *Surg Clin N Am.* 97:189-207.

Chitra, S., Patil, M. B. y Ravi, K. 2009. Wound healing activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit (Lamiaceae). *Int. J. PharmTech. Res.* 1 (3):737-744.

Da Costa, F. B., Vichnewski, W. y Herz, W. 1996. Constituents of *Viguiera aspillioides* and *V. robusta*. *Biochem. Syst. Ecol.* 24 (6):585-587.

Da Costa, F. B., Ito, I. Y., André, R. F. G. y Vichnewski, W. 1998. Constituents of *Viguiera* species with antibacterial activity. *Fitoterapia.* 69: 86-87.

Dalla, V. L. García-Argáez, A. N., Braga, A., Martínez-Vázquez, M., Grancara, S., Martinis, P., Agostinelli, E. y Toninello, A. 2014. An eudesman derivative from *Verbesina persicifolia* D.C. as a natural mild uncoupler in liver mitochondria. A new potential anti-obesity agent? *Curr Pharm Des.* 20:253-261.

Dávila, P., Arizmendi, M. Valiente-Banuet, A., Villaseñor, J. L., Casas, A. y Lira, R. 2002. Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México. *Biodiversity and Conservation.* 11:421-442.

Delgado, G. Romo, D. V. A. y Herz, W. 1982. Sesquiterpene lactones from *Viguiera* species. *Phytochemistry.* 21(6):1305-1308.

Demianenko, I. A., Vsilieva, T. V., Domnina, L. V., Dugina, V. B., Egorox, M. V., Ivanova, O. Y., Ilinskaya, O. P., Pletjushkina, O. Y., Popova, E. N., Sakharov, I. Y., Fedorov, A. V. y Chernyak, B. V. 2010. Novel mitochondria-targeted antioxidants, skilachevion derivatives, accelerate dermal wound healing in animals. *Biochem (Moscow).* 75(3):274-280.

Devi, K. P., Malar, D. S., Nabavi, S. F., Sureda, A., Xiao, J., Nabavi, S. M. y Daglia, M., 2015. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacol Res.* 99:1-10.

Devika, R. y Koilpillai, J. 2014. Etiology of wound healing and hypertrophic scar formation. *Int J Pharm Sci Health Care.* 4(3):78-86.

Djacobou, D. S., Pieme, C. A., Cabral, B. P. y Veronique, P.B. 2014. Comparison of *in vitro* antioxidant properties of extracts from three plants used for medical pupose in Cameroon: *Acalypha racemosa*, *Garcinia lucida* y *Hymenocardia lyrata*. *Asian Pac J Trop Biomed.* 4:S625-S632.

Dzialo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J. y Kulma, A. 2016. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 17(160):1-41.

Dzib, A. L., y Moo, P., M. M. 2009. Flora medicinal Maya del estado de Quintana Roo. Biblioteca digital de la medicina tradicional Mexicana. Revisado noviembre 2018. http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/flora2.php?l=4&t=&po=&id=6308&clave_regi on=18

eFlora, 2018. Consultada en noviembre del 2018. http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=250101512

Escalante, S. 1986. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana. Revisado noviembre del 2018. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7770>

Evans, P. H., Becerra, J. X., Venable, D. L. y Bowers, W. S. 2000. Chemical study of squirt-gun defense in *Bursera* and counter defense by chrysomelid beetles. *J. Chem. Ecol.* 26:745-754.

Evans, M. D., Dizdaroglu, M. y Cooke, M. S. 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res.* 567(1):1-61.

Fitzpatrick, T. B., Eisen, A. Z., Wolff, K., Freedberg, I. N. y Austen, K. F. 1987. Dermatología en medicina general. Editorial Médica Panamericana. Tercera Edición. Argentina. 438-452 p.

Freinkel, R. K. y Woodley, D. T. 2001. The biology of skin. Parthenon Publishing. New York. 423 pp.

Gallo, M. B. C., Sarachine, M. J. 2009. Biological activities of Lupeol. *Int J Bio and Pharma Sci.* 3(1):46-66.

Gao, F., Wang, H. y Mabry, T. J. 1987. Diterpenoids and a sesquiterpene lactone from *Viguiera ladibractate*. *Phytochemistry.* 26(3):779-781.

Gao, F., Wang, H., Mabry, T. J., Abbound, A. K. y Simonsen H. S. 1989. Sesquiterpene lactones, flavanones y a diterpene acid from *Viguiera laciniata*. *Phytochemistry.* 28(9):2409-2414.

García, P. A. M. 2016. Evaluación del efecto cicatrizante y antimicrobiano del extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less., en ratones CD1. Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga. FES Zaragoza. UNAM. México. 76pp.

Gardziella, A., Pilato, L. A., Knop. A. 2000. Phenolic Resins. Editorial Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2da Edición. Alemania. 560 pp.

Gartner, L. P y Hiatt, J. L. 2001. Texto Atlas de Histología. Editorial. Mc Graw Hill Interamericana. Segunda Edición. Chile. 311-314pp.

Gauglitz, G. G. y Jeschke, M. G. 2011. Combined gene and stem cell therapy for cutaneous wound healing. *Mol. Pharmaceutics.* 8:1471-1479.

Gantwerker, E. A. y Hom D. B. 2012. Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. *Clin Plastic Surg.* 39:85-97.

Geever, E. F., Stein, J. M., Levenson, S. M. 1965. Variations in breaking strength in healing wounds of young guinea pigs. *J Trauma Acute Care Surgery.* 5(5):624-35.

Gijon, I. I. C. 2003. Actividad antibacteriana de *Viguiera dentata* (Cav.) Sprengel "Chimalacate". Tesis para obtener el título de Biólogo. FES Iztacala. UNAM. México. 91 pp.

Glennie, C. W. y Jain, S. C. 1980. Flavonol 3,7-diglycosides of *Verbesina encelioides*. *Phytochemistry.* 19:157-158.

Gopalakrishnan, S., Saroja, K., Elizabeth, J. D. 2010. Chemical investigation of aerial parts of *Acalypha fruticosa* forssk. *Der Pharma Chemica*. 2(5):383-389.

Gouthamchandra, K., Mahmood, R. y Manjunatha, H. 2010. Free radical scavenging, antioxidant enzymes and wound healing activities of leaves extracts from *Clerodendrum infortunatum* L. *Environ Toxicol Pharmacol*. 30:11-18.

Grassman, J., Hippeli, S. y Elstner, E. F. 2002. Plants defense and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoidins oxygen stress. *Plant Physiol Biochem*. 40:471-478.

Guerrero, A. J. 2016. Evaluación de la toxicidad aguda y sub-crónica del extracto acuso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less, (Capitaneja). Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. FES-Zaragoza. UNAM. 54pp.

Guillermo, F., Bonilla, P. y Arroyo, J., 2005. Efecto cicatrizante del tallo subterráneo de *Peperomia scutellaefolia* R. et P., en geles aplicados a *Ratus norvergicus*. *Folia Dermatologica de Peru*. 16(1):15-22.

Gupta, N. y Jain, U.K. 2011. Investigation of wound healing activity of methanolic extract of stem bark of *Mimusops elengi* Linn. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 8(2):98-103.

Gupta, R., Sharma, A. K., Dobhai, M. P., Sharma, M. C. y Gupta, R. S. 2011. Antidiabetic and antioxidant potential of β -sitosterol in streptozotocin-induced experimental hyperglycemia. *J Diabetes*. 3(1):29-37.

Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M. A., Ponce-Pardo, J. y Zarzosa-Norabuena. 2015. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horiz Med*. 15(1):57-60.

Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. N. 2015. Free radicals in biology and medicine. Quinta edición. Oxford. New York. 905 pp.

Harborne, J. B. 1973. *Phytochemical Methods*. Editorial Chapman and Hall. Inglaterra. 286 pp.

Hallberg, C. K., Trocme, S. D. y Ansari, N. H. 1996. Acceleration of corneal wound healing in diabetic rats by the antioxidant trolox. *Res. Commun Mol Pathol Pharmacol.* 93:3-12.

Hernandez-Hernandez, A. B. Alarcon-Aguilar, F. J., Almanza-Perez, J. C., Nieto-Yañez, O., Olivares-Sanchez, J. M., Duran-Diaz, A., Rodriguez-Monroy, M. A. y Canales-Martinez, M. M. 2017. Antimicrobial and anti-inflammatory activities, wound-healing effectiveness and chemical characterization of the latex of *Jatropha neopauciflora* Pax. *J Ethnopharmacol.* 204:1-7.

Herz, W. y Kumar, N. 1981. Aromatic and other constituents of four *Verbesina* species: structure and stereochemistry of verbesidniol. *Phytochemistry.* (20):247-250.

Hinz, B. 2006. Masters and servants of the force: the role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission. *Eur J Cell Biol.* 85:175e81.

Houghton, P. J., Hylands, P. J., Mensah, A. Y., Hensei, A. y Deters, A. M. 2005. In vitro test and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. *J Ethnopharmacol.* 100(1-2):100-107.

Hungeling, M., Lechtenberg, M., Fronczek, F. R. y Nahrstedt. 2009. Cyanogenic and non-cyanogenic pyridine glucosides from *Acalypha indica* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry.* 70:270-277.

Islam, M.T., Streck, L., Paz, M.F.C.J., Sousa, J.M.C., Alencar, M.V.O.B., Mata, A.M.O.F., Carvalho, R.M., Santos, J.V.O., Silva-Junior, A.A., Ferreira, P.M.P. y Melo-Cavalcante, A.A.C. 2016. Preparation of phytol-loaded nanoemulsion and screening for antioxidant capacity. *Int. Arch. Med.* 9:1-15.

Jain, S. C., Jain, R., Singh, R. y Menghani, E. 2008. *Verbesina encelioides*: Perspective and potentials of a noxious weed. *Indian Journal of Traditional Knowledge.* 7(3):511-513.

Jin, L., Piao, H. Z., Sun, Ryu, S., Liu, B., Ryu, Y., Choi, S. Y., Kim, F. R., Kim, H-S., Kee, H. J. y Jeong. 2017. Gallic acid attenuates pulmonary fibrosis in a mouse model of transverse aortic contraction-induced heart failure. *Vasc. Pharmacol.* 99:74-82.

Jones, D. P. 2006. Redefining Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal.* 8 (9):1865-1979.

Kambara, H., Yamada, T., Tsujioka, M., Matsunaga, S., Tanaka, R., Ali, H., Wiart, C., Yusof, M., Hassan, H., Hanifah, A., Fauzi, Z. M., Mazlan, N. H., Jay, M., Kunishima, M., Akaho, E. 2006. A study on medicinal plants Malaysia focused on *Acalypha siamensis* Olive. Ex Gage. Isolation and structure of a new tetraterpene, Acalyphaser A. *Chem Biodivers.* 3(12):1301-1306.

Karimi-Khouzani, O., Heidarian, E. y Amini, S. A. 2017. Anti-inflammatory and ameliorative effects of gallic acid on fluoxetine-induced oxidative stress and liver damage in rats. *Pharmacol Rep.* 69(4):830-835.

Kregel, K. C. y Zhang, H. J. 2007. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 292(1):R18-36.

Komarcevic, A. 2000. The modern approach to wound treatment. *Med. Pregl.* 53:363-368.

Kumar, B., Vijayakumar, M., Govindaraj, R. y Pushpangadan, P. 2007. Ethnopharmacological approaches to wound healing-exploring medicinal plants of India. *J. Ethnopharmacol.* 114:103-113.

Kudryavtseva, A. V. Krasnov, G. S., Dmitriev, A. A., Alekseev, B. Y., Kardymon, O. L., Sadritdinova, A. F., Fedorova, M. S., Pokrovsky, A. V., Melnikova, N. V., Kaprin, A. D., Moskalev, A. A. y Snezhkina, A. V. 2016. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget.* 7(29):44879-44905

Leonarduzzi, G., Robbesyn, F. y Poli, G. 2004. Signaling kinases modulated by 4-hydroxynonenal. *Free Radic. Biol. Med.* 37(11):1694-1702.

Leung, A., Cromblehome, T. M. y Keswani, S. G. 2012. Fetal wound healing: implications for minimal scar formation. *Curr Opin Pediatr.* 24(3):371-378.

Li, H., Yang, L., Zhang, Y. y Gao, Z. 2016. Kaempferol inhibits fibroblast collagen synthesis, proliferation and activation in hypertrophic scar via targeting TGF- β receptor type I. *Biomed Pharma.* 83:967-974.

Lim, C. P., Phan, T. T., Lim, I. J. y Cao, X. 2006. Stat3 contributes to keloid pathogenesis via promoting collagen production, cell proliferation and migration. *Oncogene.* 25(39):5416-5425.

Litter, M. I., Armienta, M. A. y Farías, S. S. 2009. Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos. Editorial CYTED. Argentina. 43-51pp.

Liu, Y. L., Gershenzon, J. y Mabry, T. J. 1967. Furanoheliangolides from *Viguiera greggii*. *Phytochemistry.* 23 (9):1967-1970.

Lopez-Jornet, P., Camacho-Alonso, F., Gómez-García, F., Molina, M. F., Cañas, X., Serafin, A., Castillo, J. y Vicente-Ortega, V. 2012. Effects of potassium apigenin and verbena extract on the wound healing process of SKH-1 mouse skin. *Int Wound J.* 489-495.

Mabry, T. J., Markham, K. R. y Thomas, M. B. 1970. The systematic identification of flavonoids. Editorial Springer-Verlag. New York. 361 pp.

Marquina, S., Maldonado, N., Garduño-Ramírez, M. L., Aranda E., Villareal, M. L. Navarro, V., Bye, R., Delgado, G. y Álvarez, L. 2001. Bioactive oleanolic acid saponins and other constituents from the roots of *Viguiera decurrens*. *Phytochemistry.* 56:93-97.

Mathieu, D., Linke, J. C. y Wattel, F. 2006. Non-healing wound. Handbook on Hyperbaric Medicine. Editorial Springer. Netherlands. 401–427pp.

- Meragelman, M. K., Ariza, E. L., Sosa, S. V., Uriburu, M. L. y De La Fuente, R. J. 1996. Terpenoid constituents of *Viguiera tucumanensis*. *Phytochemistry*. 41(2):499-502.
- Molnár-Perl, I. y Fuzfai, Zs. 2005. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. *J Chromatogr*. 1073:201-227.
- Moncada, S. y Higgs, A. 1993. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *N Engl J Med*. 329(27):2002–2012.
- Mora, F. D., Alpan, L., McCracken, V. J. y Nieto, M. 2013. Chemical and biological aspects of the genus *Verbesina*. *Nat Prod J*. 3:140-150.
- Mottillo, E. P., Shen, X. J. y Granneman, J. G. 2010. β 3-adrenergic receptor induction of adipocyte inflammation requires lipolytic activation of stress kinases p38 and JNK. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Biol. Lipids*. 1801 (9):1048-1055.
- Muñoz-Bernal, Ó. A., Torres-Aguirre, G. A., Núñez-Gastélum, J. A., De la Rosa, L., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, F. y Álvarez-Parrilla, E. 2017. Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *TIP Rev Esp Cienc Quím Biol*. 20(2):23-28.
- Nahrstedt, A., Kant, J. D. y Wray, V. 1982. Acalyphin, a cyanogenic glucoside from *Acalypha indica*. *Phytochemistry*. 21(1):101-105.
- Nahstedt, A. Hungeling, M. y Petereit, F. 2006. Flavonoids from *Acalypha indica*. *Fitoterapia*. 77:484-486.
- Nam, T. G. 2011. Lipid Peroxidation and its toxicological implications. *Toxicol Res*. 27(1):1-6.
- Nicolete, R., Arakawa, N. S., Rius, C., Nomizo, A., Jose, P. J, Da Costa, F. B., Sanz, M. J. y Faccioli, L.H. 2009. Budlein A from *Viguiera robusta* inhibits leukocyte-endothelial cell interactions, adhesion molecule expression and inflammatory mediators release. *Phytomedicine*. 16:904-915.

Nolasco, O. E. 2014. Análisis de la variación temporal de los principales metabolitos secundarios presentes en *Bursera morelensis* (Ramirez). Tesis para obtener el título de Biólogo. FES Iztacala. UNAM. México. 89 pp.

Noumedem, J. A., de Dieu Tamokou, J., Teke, G. N., Momo, R. C., Kuete, V. y Kuate, J. R. 2013. Phytochemical analysis, antimicrobial and radical-scavenging properties of *Acalypha manniana* leaves. *Springer Plus*. 2(1):503.

Oliveira, F. A., Costa C. L. S., Chaves, M. H., Almeida, F. R. C., Cavalcante, I. J. M., Lima A. F., Lima, R. C. P., Silva R. M., Rolim, A. C., Santos, F. A. y Rao, V. S. N. 2005. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral noniceptive pain by α,β -amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. *Life Sci*. 77:2942-2952.

Olsen, J. 1988. A revision of *Verbesina* section *Platypteris* (Asteraceae: Heliantheae). *Sida*. 13 (1):45-56.

Onocha, P. A., Oloyede, G. K., Afolabi, Q. O. 2010. Phytochemical investigation, cytotoxicity and free radical scavenging activities of non-polar fractions of *Acalypha hispida* (leaves and twigs). *Exp Clin Sci Int J Adv Science*. 10:1–8.

Otuki, M. F., Vieira-Lima, F., Malheiros, A., Yunes, R. A. y Calixto, J. B. 2005. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene. *Eur. J. Pharmacol*. 507:253-259.

Ortega, A., Maldonado, E., Fronczek, F. R., Delord, J. T. y Chiari, G. 1985. Elemanolides from *Verbesina seattonii*. *Phytochemistry*. 24(8):1755-1760.

Patel, S., Srivastava, S., Singh, R. M. y Singh, D. 2017. Preparation and optimization of chitosan-gelatin films for sustained delivery of lupeol for wound healing. *Int J Biol Macromol*. 107(Pt B):1888-1897.

Parsaeimehr, A., Chen, Y. F. y Sargsyan, E. 2014. Chapter 12-Bioactive Molecules of Herbal Extracts with anti-infective and wound healing properties. *Microbiology for Surgical Infections*. 205-220.

Perera, B. G. K. y Teklani, P.W.N.N. 2016. The important biological activities and phytochemistry of *Acalypha indica*. *Int J Res in Pharm Sci*. 65(1):30-35.

Pinto, H. S. A., Pinto, L. M. S., Guedes, M. A., Cunha, G. M. A., Cheves, M. H., Santos, F. A. y Rao, V. S. 2008. Antinociceptive effect of triterpenoid α,β -amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. *Phytomedicine*. 15:630-634.

Plascencia, V. G. 2003. Espectrometría de masas. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología. UNAM. México. 40pp.

Plikus, M. V., Guerrero-Juarez, C.F., Ito, M., Li, Y. R., Dedhia, P. H., Zheng, Y., Shao, M., Gay, D. L., Ramos, R., Hsi, T. C., Oh, J.W., Wang, X., Ramirez, A., Konopelski, S. E., Elzein, A., Wang, A., Supapannachart, R. J., Lee, H.L., Lim, C. H., Nace, A., Guo, A., Treffeisen, E., Andl, T., Ramirez, R. N., Murad, R., Offermanns, S., Metzger, D., Chambon P., Widgerow, A. D., Tuan, T.L., Mortazavi, A., Gupta, R. K., Hamilton, B. A., Millar, S.E., Seale, P., Pear, W. S., Lazar, M. A. y Cotsarelis, G. 2017. Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. *Science*. 355(6326):748-752.

Ptaschinski, C., Hrycaj, S. M., Schaller, M. A., Wellik, D. M. y Lukacs, N. 2017. Hox5 paralogous genes modulate Th2 cell function during chronic allergic inflammation via regulation of Gata3. *J Immunol*. 188(2):501-509.

Rajendran, P., Rengarajan, T., Nanadakumar, N., Palaniswami, R., Nishigaki, Y. y Nishigaki, I. 2014. Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. *Eur J Med Chem*. 86:103-112..

Ramírez, H. G. A. 2010. Fisiología de la cicatrización cutánea. *Revista Facultad de Salud*. 2(2):69-78.

Rascón-Valenzuela, L., Jiménez-Estrada, M., Velázquez-Contreras, C., Garibay-Escobar, A., Vilega, W., Campaner, L., Coqueriro, A. y Robles-Zepeda, R. E. 2015. Chemical composition and antiproliferative activity of *Acalypha californica*. *Ind Crops Prod.* 69:48-54.

Razaini, M. Z., Zuki, A. B. Z., Noordin, M., Norimah, Y., Hakim, A. N. 2004. The effect of different types of honey on tensile strength evaluation of burn wound tissue healing. *Intern. J. Res. Vet. Med.* 2(4):290–296.

Reiersen, B., Kiremire, B. T., Byamukama, R. y Andersen, O. M. 2013. Anthocyanins acylated with gallic acid from chenille plant, *Acalypha hispida*. *Phytochemistry.* 64:867-871.

Revathi, P., Parimelazhagan, T. y Manian, S. 2013. Quantification of phenolic compounds, in vitro antioxidant analysis and screening of chemical compounds using GC-MS in *Acalypha alnifolia* Klein ex Willd.- A Leafy Vegetable. *Int J of Pharma Bio Sci.* 4(2):973-986.

Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski y colaboradores, 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. Segunda edición. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro (Michoacán). 1406 pp

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. y Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20(7): 933-956.

Rijke, E. Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C. y Brinkman, U. A. T. 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J Chromatogr.* 1112:31-63.

Rodríguez, A. L. H. 2014. Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. (Capitaneja). Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga. FES-Zaragoza. UNAM. 70pp.

Romo, V. A., Guerrero, C., Díaz, E., Bratoff, E., Jiménez, L. 1976. The germacranolides of *Viguiera buddleiaeformis* structures of budlein-A y -B. *Phytochemistry.* 15:525-527.

Rosas, L. R., 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis Licenciatura en Biología. FES Iztacala. UNAM. México. 95 pp.

Sakanashi, Y., Oyama, K., Matsui, H., Oyama, T. M., Nishimura, Y., Sakai, H. y Oyama, Y. 2008. Possible use of quercetin, an antioxidant, for protection of cells suffering from overload of intracellular Ca²⁺: a model experiment. *Lif Sci.* 83:164-9.

Salem, C., Pérez, P. J. A., Henning, L. E., Uherek, P. F., Schultz, O. C., Butte, B. J. M. y González, F. P. 2000. Heridas. Conceptos generales. *Cuad. Cir.* 14:90-99.

Saleem, M. 2009. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer letters.* 285:109-115.

Sánchez-Burgos, J. A., Ramírez-Mares, M. V. Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo. R. F., Moreno-Jiménez, M. R., Cháirez-Ramírez, M. H., Medina-Torres, L. y Rocha-Guzmán, N. E. 2015. Isolation of lupeol from white oak leaves and its anti-inflammatory activity. *Ind Crops Prod.* 77:827-832.

Sanseera, D., Niwatananun, W., Liawruangrath, B., Liawruangrath, S., Baramée, A., Trisuwan, K. y Pyne, S. G. (2012). Antioxidant and anticancer activities from aerial parts of *Acalypha indica* Linn. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences.* 11 (2):157-168.

Santana, M., y Romo, J. 1976. Estudio químico de la *Viguiera augustifolia* (HBK.) Blake. *Rev. Latinoamer. Quím,* 7, 41.

Sathyanarayanan, S., Muniyandi, K., George, E., Sivaraj, D., Sasidharan, S. P. y Thangaraj, P. 2017. Chemical profiling of *Pterolobium hexapetalum* leaves by HPLC analysis and its productive wound healing activities in rats. *Biomed Pharmacother.* 95:287-297.

Satish, C. J. Singh, R. y Jain, R. 2008. Antimicrobial and Antioxidant potentials of *Verbesina encelioides* (Cav.) Benth. And Hook. Fil ex Gray. *J Med Plant.* 2(2):61-65.

Shi, G. B., Wang, B., Wu, Q., Wang, T. C., Wang, C. L., Sun, X. H., Zong, W. T., Yan, M., Zhao, Q. C., Che, Y. F. y Zhang, W. 2014. Evaluation of the wound-healing activity and anti-inflammatory activity of aqueous extracts from *Acorus calamus* L. *Pak J Pharm. Sci.* 27(1):91-95.

- Schilling, E. E., Panero, J. L. y Bohm, B. A. 1988. Flavonoids of *Viguiera* section *Maculatae*. *Biochem. Syst. Ecol.* 16(4):413-416.
- Schilling, E. E. y Panero, J. L. 1988. Flavonoids of *Viguiera* series *Brevifoliae*. *Biochem. Syst. Ecol.* 16(4):417-418.
- Schilling, E. E. 1989. External flavonoid aglycones of *Viguiera* series *Viguiera* (Asteraceae: Heliantheae). *Biochem. Syst. Ecol.* 17(7):535-538.
- Seebaluck, R., Gurib-Fakim, A. y Mahomoodally, F. 2015. Medicinal plants from the genus *Acalypha* (Euphorbiaceae)—A review of their ethnopharmacology and phytochemistry. *J Ethnopharmacol.* 159:137-157.
- Sen, C. K. y Roy, S. 2008. Redox signals in wound healing. *Biochim Biophys Act.* 1780(11): 1348–1361.
- Sepúlveda, J. G., Porta, D. H. y Rocha, S. M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana Fitopatología.* 21(3):355-363.
- Shrivastav, A., Mishra, A. K., Ali, S. S., Ahmad, A., Abuzinadah, M F. y Khan, N. A. 2018. In vivo models for assesment of wound healing potential: A systematic review. *Wound Medicine.* 20:43-53.
- Singh, D. Arya, P. V., Sharma, A., Dobhal, M. P. y Gupta, R. S. 2015. Modulatory potential of α -amyrin against hepatic oxidative stress through antioxidant status in wistar albino rats. *J Etnopharmacol.* 161:186-193.
- Song, Y., Zeng, R., Hu, L., Maffucci, K. G., Ren, X. y Qu, Y. 2017. In vivo wound healing and in vitro antioxidant activities of *Bletilla striata* phenolic extracts. *Biomed. Pharmacother.* 93:451-461.
- Soneja, A., Drews, M. y Malinski, T. 2005. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative strees in wound healing. *Pharmacol Rep.* 57:108-119.
- Spring, O., Zipper, R., Kaiber, I., Reeb, S. y Vogler, B. 2000. Sesquiterpene lactones in *Viguiera eriophora* and *Viguiera puruana* (Heliantheae; Asteraceae). *Phytochemistry.* 55:255-261.

Spring, O. Zipper, R., Conrad, J., Vogler, B., Klaiber, I. y Da Costa, B. F. 2003. Sesquiterpene lactones from glandular trichomes of *Viguiera radula* (Heliantheae; Asteraceae). *Phytochemistry*. 62:1185-1189.

Starr, J. M. y Starr, R. J. 2014. Chapter 2 - Skin aging and oxidative stress. In: Aging: Oxidative stress and dietary antioxidants. Preedy, V. R. (ed.). Academic Press. 15-22.

Su, W. H., Cheng, M. H., Lee, W. L. Tsou, T. S., Chang, W. H., Chen, C. S. y Wang, P. H. 2010. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for wounds: pain relief or excessive scar formation? *Mediators Inflamm*. Article ID 413238:1-8.

Sudsai, T., Wattanapiromsakul, C. y Tewtrakul, S. 2016. Wound healing property of isolated compounds from *Boesenbergia kingii* rhizomes. *J. Ethnopharmacol*. 184:42-48.

Taylor, P. G. Dupuy, O. A., Bonilla, J. A. y Murillo, R. 2008. Anticancer activities of two sesquiterpene lactones, millerenolide and thieleanin isolated from *Viguiera sylvatica* and *Decachaeta thieleana*. *Fitoterapia*. 79:428-432.

Tchimene, M. K., Nwaehujor, C. O., Ezenwali, M., Okali, C. C. y Iwu, M. M. 2016. Free radical scavenging activity of lupeol isolated from the metanol leaf extract of *Crateva adansonii* Oliv. (Capparidaceae). *Int J Pharmacog Phytochem Res*. 8(3): 419-426.

Teller, P. y White, T. K. 2009. Fisiología de la cicatrización de la herida: de la lesión a la maduración. *Surg Clin N Am*. 89:599-610.

Thambiraj, J., Paulsamy, S. y sevukaperumal, R. 2012. Evaluation of in vitro antioxidant activity in the traditional medicinal shrub of western districts of Tamilnadu, India, *Acalypha fruticosa* Forssk. (Euphorbiaceae). *Asian Pac J Trop Biomed*. S127-S130.

Traber, M.G. y Atkinson, J. 2007. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology & Medicine*. 43:4-15.

Tsai, H. W., Wang, P. H. y Tsui, K. H. 2018. Mesenchymal stem cell in wound healing and regeneration. *J. Chin Med Assoc*. 8(3):223-224.

Valdivia-Silva, J. E., Maya-Pastén, M., Peña-Fernández, J. 2014. Las células guardianes residentes de la piel y su papel en la respuesta inmune. Parte 1. *Dermatol Peru*. 24(1):19-29.

Valerio, M. y Awad, A. B. 2011. β -Sitosterol down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase SHP-1 in J774A.1 murine macrophages. *Int Immunopharmacol*. 11:1012-1017.

Vivancos, M. y Moreno, J. J. 2005. β -Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. *Free Radic. Biol. Med*. 39(1): 91-97.

Wagner, H., Iyengar, A. M. y Seligmann. 1974. Rhamnocitrin-3-Glucuronid in *Verbesina myricephala*. *Phytochemistry*. 13:493-494.

Wang, X. L., Yu, K. B. y Peng, S. L. 2008. Chemical constituents of aerial part of *Acalypha australis*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 38(22):3988–3990.

Wang, P., Ownby, S., Zhang, Z., Yuan, W. y Li, S. 2010. Citotoxicity and inhibition of DNA topoisomerase I of polihydroxylated triterpenoids and triterpenoid glycosides. *Bioorganic Med. Chem. Lett*. 20:2790-2796.

Wang, P. H., Huang, B. S., Horng, H. C., Yeh, C. C. y Chen, Y. J. 2018. Wound healing. *J Chin Med Assoc*. 81:94-101.

Werner, S. y Grose, R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 83: 835-870.

Xu, H.W. Liang, Q., Liang, Z. S. y Li, X. C. 2010. Two new eudesmane derivatives from *Verbesina virginica*. *Chin. Chem. Lett*. 21:293-695.

Xuan, Y. H., Huang, b. B., Tian, H. S., Chi, L. S. Duan, Y. M., Wnag, X., Zhu, Z. X., Cai, W. H., Zhu, Y. T., Wei, T. M., Ye, H. B., Cong, W. T. y Jin, L. T. 2014. High-glucose inhibits human fibroblast cell migration in wound healing via repression of bFGF-regulating JNK phosphorylation. *PLoS One*. 9(9):e108182.

Young, I. S. y McEneny, J. 2001. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem. Soc. Trans.* 29:358-62.

Zahidin, N. S., Saidin, S., Zulkifli, R. M, Muhamad, I. I., Ya'akob, H. y Nur, H. 2017. A review of *Acalypha indica* L. (Euphorbiaceae) as traditional medicinal plant and its therapeutic potential. *J Ethnopharmacol.* 207:146-173.