



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**UNIDAD DE BIOTECNOLOGIA Y PROTOTIPOS**

**LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA**

**Estudio de la actividad cicatrizante de las flores de  
*Prosopis laevigata***

**TESINA  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I Ó L O G A**

**PRESENTA:  
GARCÍA LOREDO MONTSERRAT ATENEA**

**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. MA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ**



**LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO 2022**



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.

## RECONOCIMIENTO

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biología y Prototipos (UBIPRO) en la Facultad de Estudios Superiores (FES) Campus Iztacala.

Fue dirigido por la Doctora María Margarita Canales Martínez.

Fue revisado por el siguiente jurado:

Dra. María Margarita Canales Martínez.

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

Dra. Judith Salas Oropeza.

Dra. Ana Bertha Hernández Hernández.

M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla.

Para su ejecución se contó con el apoyo de:

Financiamiento UNAM PAPIIT IN205020

## AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de Tesis la Doctora María Margarita Canales Martínez, quien desde mis primeros años en mi formación de bióloga encendió una llama de curiosidad y pasión por la Biología, además de ser una gran mujer a la que admiro y respeto profundamente. Agradezco la oportunidad de ser una de sus asesoradas, la comprensión y empatía brindada, así como los conocimientos, consejos y enseñanzas que siempre serán parte importante de mí.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy, por la ayuda brindada en la realización de este trabajo, por sus consejos, aportaciones y correcciones, así como por el apoyo brindado en la realización de este proyecto.

A la Dra. Judith Salas Oropeza, por interesarse en este proyecto y tomarse el tiempo de leer, corregir y engrandecer este trabajo.

A la Dra. Ana Bertha Hernández Hernández, por el apoyo y transmisión de conocimientos brindado en el laboratorio para la realización de este proyecto. Así mismo, por la revisión y aportaciones durante la elaboración del mismo.

Al M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla el apoyo brindado para la realización de este trabajo con sus consejos, aportaciones, correcciones, tomarse el tiempo de leer y contribuir en el engrandecimiento este trabajo

## DEDICATORIAS

A mis padres, Norma Loredó Acevedo y Felipe García García, quienes siempre estuvieron aconsejándome, guiándome, apoyándome y alentándome a continuar mi trayectoria escolar, a quienes reconozco su esfuerzo, dedicación, cariño y amor para que yo llegue a cumplir mis sueños y metas de vida. Gracias por ser un ejemplo a seguir, por confiar en mí, ya que este triunfo, es también suyo. Los amo infinitamente.

A mis hermanos, Ruth y Alfre, quienes me motivan y apoyan para seguir superándome y los cuales en todo momento me sacan una sonrisa y siempre están en las buenas y las malas, los amo mucho y quiero verlos triunfar.

A mi abuelita que amo con todo el corazón, que me brinda todo el cariño del mundo y me enseña tanto de la vida y de amor, gracias por preocuparte por mi bienestar y darme tanta alegría. Siempre te llevo en mi corazón.

A toda mi familia que me alentó y apoyó durante mi carrera universitaria y con quienes he pasado momentos preciosos. Los quiero mucho.

A mi mejor amiga Angie, quién a pesar de la distancia siempre ha sido un apoyo incondicional, gracias por el cariño y la felicidad que le has dado a mi vida, te convertiste en parte de mi familia, te quiero muchísimo.

A mi mejor amigo Emi, quien fue mi confidente y soporte durante los primeros semestres de la carrera, siempre te recuerdo con mucho cariño y admiración, sigue cumpliendo todas tus metas.

A Angie, quien desde el primer día fue mi cómplice y una amiga incondicional, sé que vas a llegar lejos, gracias por sobrellevar conmigo todos los sube y baja de la carrera y hacerlos más fáciles. Te quiero mucho.

A mis amigas Gaby, Dani, Pao y Diana que, a pesar de la distancia, nos hemos visto crecer y estar orgullosas de cada una, las quiero chicas.

A mis compañeros de clase, Chris, Gabo, Jair, Kari, Lalo, Alexis, Karlita, Ale, Mari y Abi quienes formaron parte importante en el desarrollo de muchos proyectos escolares y externos, con los cuales pase momentos inolvidables y alegres.

A mis profesores María Margarita Canales Martínez, Karla Stephanie Martínez Elizalde, Ramón Víctor Moreno Torres y María Guadalupe Villanueva Santiago, quienes con su entusiasmo y entrega infundaron en mí amor y cariño a la Biología y gracias a su excelente docencia influyen en el alumnado para continuar formándose y exigiéndose para dar lo mejor de sí.

ÍNDICE GENERAL	
RECONOCIMIENTO.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
DEDICATORIAS.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE CUADROS.....	vii
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
OBJETIVO GENERAL.....	10
OBJETIVOS PARTICULARES.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	12
ZONA DE COLECTA.....	16
MÉTODO DE MACERACIÓN.....	20
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	22
Fenoles.....	22
Flavonoides.....	24
Alcaloides.....	25
CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES.....	28
CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES.....	31
MÉTODO DOWD.....	32
CUANTIFICACIÓN DE ALCALOIDES.....	36
MÉTODO DE REDUCCIÓN DEL RADICAL 2,2-DIFENIL-1 -PICRILHIDRACIL (DPPH•).....	40
CROMATOGRAFÍA.....	46
Cromatografía en papel.....	47
Cromatografía en capa fina.....	48
Cromatografía de intercambio iónico.....	49
Cromatografía de afinidad.....	49
Electroforesis.....	49

CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS GC-MS.....	52
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS HPLC-MS.....	56
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN ACOPLADA A DETECTOR DE DIODOS HPLC-DAD.....	62
CORROBORACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....	67
BACTERIAS .....	69
Método de difusión en agar de Kirby-Baüer .....	69
Método de dilución en agar .....	72
Macrotitulación en tubo .....	73
Microtitulación .....	74
LEVADURAS.....	75
Método de difusión en agar de CLSI. ....	75
Método de microdilución para levaduras .....	77
Método de macrodilución para levaduras (M27-A3) .....	79
HONGOS FILAMENTOSOS.....	81
Inhibición del crecimiento radial: Método de difusión en agar .....	81
Método de microdilución en caldo M38-A para hongos filamentosos .....	82
Método de macrodilución en caldo M38-A .....	84
PIEL Y ANEXOS .....	85
PROCESO DE CICATRIZACIÓN.....	101
TOXICIDAD CUTÁNEA AGUDA PROCEDIMIENTO DE DOSIS FIJA: PRUEBA DE IRRITACIÓN .....	114
FUERZA DE CIERRE: MÉTODO TENSIOMÉTRICO .....	123
EFICACIA DE CICATRIZACIÓN: VELOCIDAD DE CIERRE .....	127
TECNICA HISTOLOGICA .....	131
RESULTADOS ESPERADOS Y DISCUSIÓN.....	147
CUALITATIVAS.....	147
Fenoles .....	149
Flavonoides .....	151
Alcaloides .....	152
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....	153
CROMATOGRAFÍAS .....	156
Actividad antimicrobiana.....	162

TOXICIDAD .....	172
CICATRIZACIÓN.....	174
CONCLUSIONES .....	177
APORTACIONES Y TRASCENDENCIA.....	177
REFERENCIAS .....	178



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Histología de la piel.....	2
Figura 2. Proceso de cicatrización. ....	5
Figura 3. <i>Prosopis laevigata</i> (mezquite blanco).....	8
Figura 4. Propuesta de métodos. ....	11
Figura 5. Hojas y flores de <i>Prosopis laevigata</i> .....	12
Figura 6. <i>Prosopis Laevigata</i> .....	13
Figura 7. Mapa de distribución de <i>Prosopis laevigata</i> . ....	14
Figura 8 Distribución geográfica de <i>Prosopis</i> en México .....	15
Figura 9. Mapa de Zapotitlán Salinas y alrededores.....	17
Figura 10. Montaje de destilación con rotavapor. ....	20
Figura 11. Prueba cualitativa para fenoles .....	22
Figura 12. Prueba de identificación de fenoles.....	23
Figura 13. Reacción de fenoles con hidróxido de sodio .....	23
Figura 14. Prueba de Shinoda .....	24
Figura 15. Prueba de identificación para alcaloides: Reacción de Mayer.....	26
Figura 16. Reacciones de identificación para alcaloides: Reacción de Dragendorff. .....	26
Figura 17. Mecanismo de acción del reactivo de Folin- Ciocalteu .....	28
Figura 18. Tabla de concentraciones para curva patrón y muestras problemas en la prueba para fenoles. ....	30
Figura 19. Resultado positivo de la prueba para cuantificación de fenoles para el extracto obtenido .....	30
Figura 20. Estructura básica de un flavonoide.....	31
Figura 21. Estructura central del esqueleto flavonólico de los principales subgrupos de flavonoides.....	31
Figura 22. Reacción de flavonoides con cloruro de aluminio.....	32
Figura 23. Tabla para las primeras concentraciones de la prueba de flavonoides. .....	33
Figura 24. Tabla de concentraciones para la prueba de flavonoides.....	33
Figura 25. Ensayo de cuantificación de 12 flavonoides .....	34
Figura 26. Cambio de color durante la reacción de alcaloides con verde de bromocresol. ....	37
Figura 27. Reacción de alcaloides con el reactivo Verde de Bromocresoll.....	37
Figura 28. Tabla para las concentraciones de la prueba de alcaloides. ....	38
Figura 29. Método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH*).....	43

Figura 30. Tabla para las primeras concentraciones de la prueba de actividad antioxidante.....	44
Figura 31. Tabla de concentraciones para la prueba de actividad antioxidante....	44
Figura 32. . Modelo de placa DPPH. ....	45
Figura 33. Reacción del DPPH con el extracto a diferentes concentraciones .....	45
Figura 34. Elución de compuestos en cromatografía de acuerdo a polaridad. ....	48
Figura 35. Componentes básicos de un sistema para de cromatografía de gases. .....	55
Figura 36. Cromatograma de la fracción metanólico del extracto de marzo de flores de <i>Prosopis laevigata</i> .....	55
Figura 37. Componentes básicos de un sistema para HPLC. ....	58
Figura 38. Montaje cromatográfico y cromatograma. F .....	60
Figura 39. Cromatografía Líquida de Alta Presión acoplada a Espectrometría de Masas (HPLCMS) del extracto de la colecta de marzo. ....	61
Figura 40. Componentes básicos de un detector de diodos. ....	65
Figura 41. Cromatograma del análisis de HPLC-DAD del extracto metanólico.....	66
Figura 42. Determinación del tamaño del halo de inhibición.....	71
Figura 43. Halos de inhibición obtenidos con el extracto de la colecta de marzo .	72
Figura 44. Determinación de la Concentración inhibitoria mínima (CIM) y de la Concentración Bactericida Mínima (CBM).....	73
Figura 45. Ejemplo de halos de inhibición de crecimiento de hongos levaduriformes obtenidos con el extracto de la colecta de marzo. ....	77
Figura 46. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos.. ....	78
Figura 47. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos solubles en agua e insolubles.....	80
Figura 48. Ejemplo de inhibición del crecimiento radial del micelio de hongos filamentosos con el extracto de la colecta de marzo. ....	82
Figura 49. Preparación del inóculo para hongos filamentosos. ....	83
Figura 50. Esquema que muestra las capas de la piel y sus anexos.....	85
Figura 51. Estrato córneo, lúcido, granuloso, espinoso y basal de epidermis en tinción H-E .....	87
Figura 52. Representación esquemática de los componentes celulares de la epidermis y los estratos que la constituyen. ....	88
Figura 53. Componentes celulares de la epidermis.....	89
Figura 54. Estratos de la dermis.....	91
Figura 55. Fibras de colágena, elatina y fibroblastos en la dermis. ....	92
Figura 56. Componentes celulares de la hipodermis.....	93

Figura 57. Folículo piloso y glándula sebácea visto en microscopio en tinción H-E .....	94
Figura 58. Glándula sebácea asociada a folículo piloso y músculo erector del pelo .....	96
Figura 59. Glándulas sudoríparas .....	97
Figura 60. Componentes de la uña. Referencia: Obtenido de <a href="https://analaura.pb.studio/ua">https://analaura.pb.studio/ua</a> .....	98
Figura 61. Imagen del corpúsculo de Ruffini. ....	98
Figura 62. Imagen del corpúsculo de Meissner. ....	99
Figura 63. Imagen de los corpúsculos de Paccini. ....	99
Figura 64. Imagen de vasos sanguíneos.....	100
Figura 65. Capas de la piel y sus anexos.....	100
Figura 66. Fases de la cicatrización y su respectivo protagonista. ....	101
Figura 67. Primera fase del proceso de cicatrización. ....	103
Figura 68. Fase de coagulación. ....	104
Figura 69. Factores de crecimiento en cicatrización.....	106
Figura 70. Fase de inflamación. ....	107
Figura 71. Fase de proliferación.....	111
Figura 72. Fase de maduración.....	113
Figura 73. Ketamina inyectable .....	119
Figura 74. Xilacina inyectable .....	119
Figura 75. Isoflurano y aplicador .....	119
Figura 76. Medetomidina inyectable I.....	119
Figura 77. Registro fotográfico de una prueba de toxicidad dérmica de un propóleo de Chihuahua al 10% y 50%. ....	121
Figura 78. Fotomicrografías de piel de ratón en un ensayo de toxicidad dérmica aguda de un extracto etanólico del propóleo de Chihuahua .....	121
Figura 79. Gráficas de peso en gramos de hígados y riñones.....	122
Figura 80. Realización de las heridas paravertebrales .....	123
Figura 81. Esquema representativo del método tensiométrico, base metálica a la que se sujeta el ratón de la cintura pélvica y torácica, se sujeta la piel con pinzas atadas a recipientes que se llenan con agua. Fuente: Pilar Domínguez Verano, pilardomver@hotmail.com.....	125
Figura 82. Porcentaje de fuerza obtenida del ensayo tensiométrico.....	126
Figura 83. Biopsy punch .....	128
Figura 84. Secuencia fotográfica de heridas y porcentaje de cierre en tres tiempos diferentes. ....	129

Figura 85. Cortes histológicos de la zona de la herida después de 14 días en tinción H-E. ....	130
Figura 86. Ejemplo de tamaño de muestra.....	132
Figura 87. Muestra fijada en formol 10%.....	134
Figura 88. Inclusión de muestra en bloques de parafina.. ....	137
Figura 89. Cortes en micrótopo de tejido incluido en parafina. ....	139
Figura 90. Proceso de desparafinación y proceso de coloración.....	142
Figura 92. Sección de 8 µm de grosor de una muestra incluida en parafina teñida con tricrómico de Van Gieson. Zona profunda de la dermis .....	146
Figura 93. Sección de parafina de 8 µm de grosor teñidas con tricrómico de Masson. Zona profunda de la lengua de rata. ....	146

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía de <i>Mus musculus</i> . ....	118
Cuadro 2. Grupos experimentales para evaluar la fuerza de cierre.....	124
Cuadro 3. Grupos experimentales para la prueba de velocidad de cierre. ....	128

## RESUMEN

El mezquite (*Prosopis laevigata*) es una especie importante en el Valle del Mezquital en Zapotitlán Salinas en Puebla, además de ser endémica de México, este árbol es empleado para la alimentación de ganado, como combustible a manera de leña, madera para elaborar artículos y en el tratamiento de enfermedades como las gastrointestinales, oculares, gripe, dolor de cabeza, inflamación, comezón, sarampión, garganta, y la curación de heridas; el presente escrito se enfoca en este último y como *P. laevigata* podría influir en un proceso de cicatrización. De los datos más relevantes encontrados en la bibliografía, se encontró que las flores de *P. laevigata* colectadas en marzo tuvieron 488 mg e AG/g en fenoles, 23.2 mg e Q/g en cuanto a flavonoides, 67.39 mg e A/g en alcaloides, metabolitos que aportarían antioxidantes durante la cicatrización de una herida, ayudando a que el área pueda sanar rápidamente. También en la bibliografía se reporta que extractos de *Prosopis* de la flor, vaina, hoja, raíz y tallo muestran una amplia capacidad inhibitoria contra bacterias (Gram-positivas y Gram-negativas), levaduras y hongos filamentosos, en concreto, las flores de *P. laevigata* pueden formar halos de inhibición de hasta 21 mm sobre Gram-positivas, de 26 mm en Gram-negativas y 20 mm en hongos levaduriformes, lo que indica que este extracto posee compuestos que serían capaces de evitar una infección por algún patógeno en una herida. Por esta razón, se plantea necesario realizar varias cromatografías que puedan detectar e identificar ciertas moléculas que se conozca que tengan capacidad antioxidante o antimicrobiana, algunas ya han sido identificadas para la especie de *P. laevigata* cómo: ácido palmítico y linoleico, vainillina, acacetina, crisina, ácido cafeico pinocembrina, apigenina, naringenina, kaempferol y quercetina. De acuerdo con la literatura revisada, se concluye que *P. laevigata* tiene altas probabilidades de presentar actividad cicatrizante.

## INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos cuentan con una cubierta que separa el medio interno del medio externo, en los vertebrados esa cubierta es la piel; es el órgano más extenso de nuestro cuerpo y de mayor peso, representando aproximadamente del 15-20% de masa corporal, el 6% de peso total de un organismo y cubre una superficie de 2m<sup>2</sup> sin discontinuidades, sin embargo, se puede transformar en mucosas en sitios donde existen orificios naturales del cuerpo (Merino et al., 2011).

Las células que conforman este órgano son queratinocitos 80%, melanocitos 10% (responsables de la pigmentación y protección contra rayos UV), células de Langerhans (protección inmune) y Merkel (células sensoriales) 10%. La piel tiene un arreglo en conjuntos de capas, las primeras 4-5 capas (más externas) componen la epidermis, las células forman un plano estratificado y queratinizado, que cubre todo el individuo, en esta zona las capas son gruesas debido a que están más expuestas al medio externo, en seguida está la dermis que se compone

esencialmente de dos capas: 1) Papilar que proporciona nutrientes a la epidermis, contiene terminaciones nerviosas y los receptores sensoriales. 2) Reticular que comprende los haces de fibras elásticas entrelazados con haces de colágena que permiten el movimiento. La capa más interna es la hipodermis, también llamado tejido subcutáneo, formada por

tejido conectivo laxo, puede anclarse a la dermis y relacionarse a tejidos profundos como las fascias de los músculos (Montalvo, 2018).

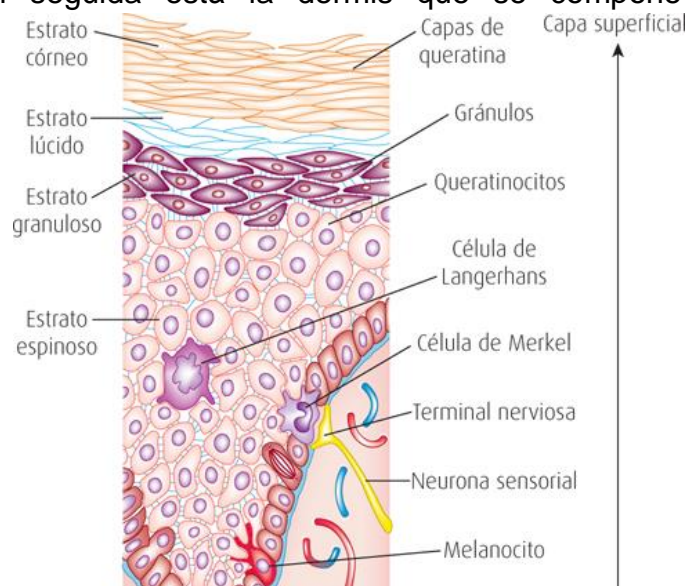


Figura 1. Histología de la piel. Fuente Julio Sepúlveda Saavedra, 2012. Texto Atlas de Histología, Biología celular y tisular. ida

La piel nos permite interactuar con el medio externo, percibe la temperatura del ambiente, si se le ejerce alguna presión externa o si algún estímulo llega a causar dolor, pero también se encarga de regular la presión osmótica, temperatura interna, excreción a través de las glándulas sudoríparas y la absorción de radiación UV para la síntesis de la vitamina D, así mismo, colabora en el mantenimiento del equilibrio hídrico, puede absorber sustancias que atraviesan la epidermis, como medicamentos, cremas o pomadas, además de captar antígenos y transferirlos a células de respuesta inmunológica, convirtiéndose en parte del sistema inmune (Navarrete, 2003).

Por tanto, se puede decir que es la primera barrera de protección del cuerpo, resguarda a los tejidos y órganos dentro de ella aislándolos del medio externo. Protege contra lesiones, deshidratación, infecciones, radiación solar, aire, agua, microorganismos patógenos (bacterias, hongos, virus o parásitos), daños por agentes mecánicos, químicos, térmicos y osmóticos, gracias a la resistencia del estrato córneo y las fibras que lo componen. Es tan importante que, si se llegara a herir más del 40% de la piel, es casi imposible que un organismo sobreviva a semejante deterioro, ya que la pérdida de líquidos corporales y las infecciones bacterianas lesionarían de tal manera a los tejidos expuestos que producirían la muerte en poco tiempo (Merino et al., 2011).

Una herida será la región anatómica donde se interrumpe la continuidad celular de los tegumentos, capas de revestimiento mucoso o cápsula fibrosa de los órganos, causando una pérdida de fluidos, dolor y liberación de productos celulares (Ramírez-Hernández, 2010). Las heridas en la piel se clasificarán en función de su profundidad:

- Superficial: epidermis con afectación que se cura sin dejar cicatriz.
- Espesor parcial: epidermis y dermis superficial afectadas, al curarse deja cicatriz
- Espesor completo: la afección llega hasta la hipodermis, a veces se llega a comprometer el músculo, tendón y hasta hueso, siempre dejan cicatriz.

Para que una herida cutánea sane correctamente tiene que atravesar el proceso de cicatrización, que depende de la dinámica del tejido celular dañado, el circundante y el medio ambiente externo. Cuando se lesionan las células de la piel emiten señales bio-eléctricas, generando un potencial eléctrico que produce estímulos químicos y mecánicos que causarán la activación de algunos grupos celulares específicos para comenzar con el proceso de cicatrización, que consta de cuatro fases que se solapan e interconectan entre ellas, son dependientes de la acción celular que estimula el crecimiento, reparación y remodelación del tejido, para reestablecer las características y condiciones iniciales del tejido (Guarín-Corredor et al., 2013).

La primera etapa de la cicatrización es la fase vascular, en la cual se activan los mecanismos de coagulación y agregación plaquetaria, los macrófagos y las plaquetas regularán la producción de citocinas, que van a activar el factor de crecimiento de plaquetas, el fibroblástico básico y el transformante, estos últimos tres dirigen la migración de células inflamatorias, dérmicas y epidérmicas sobre la herida, ya que el coágulo inicial funciona como matriz y permite el movimiento por medio de factores quimiotácticos; además se activan los neutrófilos y macrófagos que secretan enzimas y radicales libres para evitar infecciones. Seguida de esta etapa se encuentra la fase inflamatoria, donde ocurre una vasodilatación que permite la llegada de neutrófilos, monocitos y leucocitos a la herida, los macrófagos fagocitarán a los monocitos una vez cumplida su acción anti infecciosa, además son fuente de citocinas proinflamatorias, factores de necrosis tumoral, de crecimiento de tipo insulina 1 y de crecimiento transformante que ayudan a amplificar la inflamación, estimulan la proliferación de fibroblastos y producción de colágeno; los macrófagos en conjunto con los neutrófilos estimulan la producción y migración de queratinocitos, así como la síntesis de óxido de nitrógeno contribuyendo de esta forma a la actividad antimicrobiana (Senet, 2007).

Concluida la fase inflamatoria, la herida entra a la fase proliferativa, donde el coágulo de fibrina, es reemplazado por tejido de granulación rico en colágeno, también ocurre la emigración y luego la proliferación de los fibroblastos, que dependen de las citocinas producidas por plaquetas y macrófagos, participan en la



remodelación de la matriz a través de la producción de enzimas proteolíticas, esto facilita la migración de células para la reparación del tejido, fijación y proliferación. Las células endoteliales llegan al área dañada por medio de los vasos sanguíneos sanos y próximos, cuando la herida se cubre por una monocapa de queratinocitos, dejan de migrar y comienzan a proliferar y diferenciarse; entonces comienza la última etapa: la fase de maduración el tejido de granulación irá perdiendo fibroblastos por medio de apoptosis y aparecerá una estructura más densa de colágeno mientras la red vascular se organiza; la fibronectina y ácido hialurónico se sustituyen por colágeno, fibras elásticas y glucosaminoglucanos que forman una matriz con mayor resistencia y alcanza su fuerza final, sin embargo, la cicatriz no es tan elástica o resistente como la piel, por su deficiencia en elastina y la desorganización de la matriz reconstruida. El cierre de la herida se debe a que miofibroblastos, antes fibroblastos que se transformaron, son capaces de contraerse y transmitir esa capacidad a la zona aledaña, sellando así la herida.

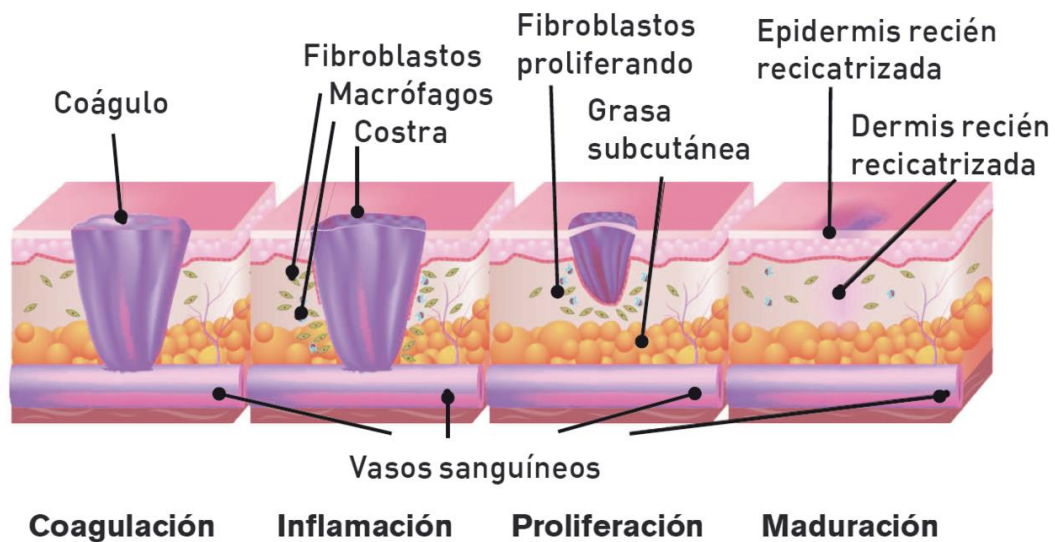


Figura 1. Proceso de cicatrización. Referencia: Obtenido de <https://www.douglaslabs.es/blog/terapia-enzimatica-sistematica-en-el-proceso-de-cicatrizacion/>

Una forma de acelerar el proceso de cicatrización es con ayuda de medicamentos, los fármacos que se han desarrollado con este fin tienen gran variedad de principios activos que funcionan para curar heridas, por ejemplo la crema de CICADONA y el gel de KitosCell contiene como principio activo la pirfenidona, de nombre IUPAC 5-metil-1-fenilpiridin-2-ona y de fórmula molecular  $C_{12}H_{11}NO$  (Centro Nacional de Información Biotecnológica, 2020), este compuesto ayuda a prevenir la infección de una herida por microorganismos, estimula la producción de colagenasas y regula las citosinas profibróticas evitando que se formen cicatrices fibróticas, sin embargo, en sus contraindicaciones se menciona que se debe usar con un protector solar o puede afectar el color de la piel, no causa efectos secundarios, pero se recomienda verificar si se puede ser alérgico a este medicamento, ya que puede causar hipersensibilidad (CellPharma, 2010). En cuanto a los precios KitosCell se encuentra en el mercado entre \$2021.00 a \$2608.00 pesos mexicanos por 90 gr del producto, Cicadona llega a costar de \$999.00 a \$549.00 por 40 gr, siendo precios poco accesibles para los consumidores.

Otro medicamento dirigido hacia la cicatrización es el RECOVERÓN, que tiene como base el ácido acexámico, de nombre IUPAC: Ácido 6-acetamidohexanoico y fórmula  $C_8H_{15}NO_3$ , este se encarga de acelerar el proceso de cicatrización en heridas que no estén infectadas, participa en la acción protéica del colágeno, regulando la producción de fibroblastos y la disposición de las fibras (Centro Nacional de Información Biotecnológica, 2020). Se puede encontrar adicionado con neomicina 5%, de fórmula molecular:  $C_{23}H_{46}N_6O_{13}$ , que funciona como antibiótico, elimina o previene la presencia de microorganismos patógenos que impidan la cicatrización, se une permanentemente al ARNr 16S y a la proteína S12 de la subunidad ribosómica bacteriana 30S, inhibiendo así el inicio de la síntesis de proteínas, también provoca que se lea incompleto el ARNm, conduciendo a la muerte de las bacterias (Centro Nacional de Información Biotecnológica, 2020). El RECOVERÓN no ha mostrado reacciones secundarias o adversas, pero se debe tener precaución si se es hipersensible al ácido acexámico o al excipiente (Vademécum Actuamed, 2020), en el mercado su precio ronda entre \$298.00 a

\$320.00 pesos mexicanos, siendo más barato que los anteriores y un poco más accesible.

Afortunadamente los medicamentos no son la única vía para acelerar el proceso de cicatrización, también existen productos naturales que pueden ayudar a la curación de heridas, algunos ejemplos son la miel, sábila y plantas medicinales, como es el caso de la familia Fabaceae, que, si bien se caracteriza por incluir algunas especies de interés alimenticio como el frijol, también reúne varias plantas con diferentes propiedades terapéuticas para tratar ciertas afecciones, por ejemplo las hojas machacadas de *Lupinus ananeanus* y *L. brachypremnon* reducen la inflamación en la zona herida, el polvo del fruto *Caesalpinia spinosa* se relaciona como cicatrizante (Castañeda et al., 2017). Muchos de estos productos son de fácil acceso y su costo está por debajo de un tratamiento dermatológico, es por esta razón que desde hace tiempo se ha comenzado a profundizar en la investigación de plantas que se sospeche sean curativas, para confirmar e identificar el papel que juegan en cierto proceso de reparación del cuerpo. Este es el caso del género *Prosopis*, también llamados algarrobos, en América Latina se ha visto que los frutos son usados para la fiebre, inflamaciones, como astringentes y diuréticos, además se usan como remedio para enfermedades de hígado, vejiga y enfermedades venéreas (Galera, 2000) y poseen propiedades que se emplean como analgésicos, antibacteriales y cicatrizantes.

En México hay una amplia extensión de zonas semiáridas y áridas, con características apropiadas para el desarrollo de varias especies del género *Prosopis*, como *P. glandulosa*, *P. juliflora*, *P. velutina*, *P. pubescens*, *P. reptans*, *P. articulata*, *P. tamaulipana*, *P. palmeri* y *P. laevigata*, también llamados mezquite, su madera es aprovechada como combustible, sus vainas como forraje y como alimento para el hombre; produce resina que tiene uso en la fabricación de pegamentos, barnices, mientras sus flores son importantes en la producción de miel (Rodríguez et al., 2014). Por su parte, se sabe que *Prosopis laevigata* además de ser utilizada como alimento, se reporta que presenta algunas propiedades medicinales que pueden curar algunas enfermedades oculares, diarrea, conjuntivitis, mal del orín, también se usa como relajante (Román, 2016).

*P. laevigata* (Humb. et Bonpl. ex Willd), llamado comúnmente como mezquite blanco es un árbol que llega a medir 12 m de altura, el diámetro del tronco puede ser de hasta 1 m, presenta corteza gruesa de color café-negruzco, su copa es más ancha que alta, las ramas tienen espinas con hojas pecioladas. Presenta inflorescencias dispuestas en espigas densas, son blanco-amarillentas son hermafroditas y son sésiles (Rodríguez et al., 2014). El fruto es linear de color café amarillento, a veces rojo, constreñido entre las semillas; éstas oblongas, comprimidas de 8 a 10 mm de largo, de color blanco-amarillento. la época de floración inicia en febrero a marzo y termina de abril a mayo; la floración coincide con el renuevo de los foliolos (CONAFOR-CONABIO, 2004).



**Figura 2. *Prosopis laevigata* (mezquite blanco).**  
Fuente: Fotografía original de Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

A pesar de que esta planta es relevante por los diversos usos que se le da y su gran extensión a lo largo de la República Mexicana, no hay muchos datos acerca de su uso etnobotánico como cicatrizante, se sabe que tiene efectos antiinflamatorios y bactericidas, por lo tanto, podría ayudar al proceso de cicatrización, para esto se decidió evaluar su efecto cicatrizante en un modelo murino para identificar y sustentar su uso medicinal.

## ANTECEDENTES

- Galera (2000), menciona, que en México, se extraen de las hojas de *P. juliflora* sustancias medicinales, como principios de vinalina, que son usados como antimicrobianos; en Perú, el jugo se usa como purgante, para dolores de estómago, escalofríos, diarrea, disentería, excrecencias, ojos, gripe, dolor de cabeza, ronquera, inflamación, comezón, sarampión, garganta, y la curación de heridas.
- En 1960 y 1970 el extracto acuoso y alcohólico del mezquite se usaban como elementos antimicrobianos, las flores en cocción y la corteza de la raíz se utilizan como vomitivo y purgante (García, 2003).
- Salinas-Sánchez y colaboradores (2009), reportan actividad antimicrobiana de los extractos hexánicos, cetónicos y metanólicos de hojas y tallo de *Prosopis laevigata* en una cepa de *Candida albicans* y de bacterias.
- El extracto alcohólico de las hojas de *Prosopis juliflora* reportan una alta actividad antimicrobiana sobre las cepas de *Escherichia coli* a concentraciones del 50% y 100% del extracto (Bezerra, 2014).
- En el 2015, Soares da Silva y colaboradores probaron la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de hojas y corteza de *Prosopis juliflora*, reportaron la inhibición de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Proteus mirabilis*.
- Vargas (2016) estudia al algarrobo (*Prosopis sp.*) y reporta que la infusión de flor es usada como diurética y que el fruto molido ayuda a la cicatrización de heridas y detención de hemorragias.
- Castro (2016) obtuvo halos de inhibición de 21 mm en cepas bacterianas gracias al extracto metanólico de la flor de *Prosopis laevigata*; en la caracterización química se encontraron alcaloides, xantofilas, ácido linolénico, ácido linoleico y ácido palmítico en altas concentraciones.

- Nava (2017) realizó un estudio comparativo del extracto metanólico de flores de *P. laevigata*, uno obtenido en marzo y otro en febrero, el primero mostró mayor actividad antimicrobiana y con una mayor concentración de fenoles, flavonoides y alcaloides, el de febrero fue el más tóxico, ambos tuvieron baja capacidad antioxidante, reportó compuestos como acacetina, crisina, ácido caféico, vainillina, pinoembrina, pigenina, naringenina, kaemperol y quercetina.
- Alethia Muñoz Ramírez, llevó a cabo una investigación para aislar e identificar compuestos de plantas que están en ecosistemas de zonas áridas con un valor farmacológico, incluye a *Prosopis laevigata* (mezquite) como una planta que puede ayudar a disminuir algunas de las complicaciones de la diabetes como hipoglucemia, inflamación, glicación avanzada y cicatrización (El Sol de San Luis, 2019).
- En el 2019, Moreno reportó que el extracto metanólico de las hojas de *Prosopis laevigata* tiene actividad anti-*Candida*, efecto fungicida para *Candida tropicalis* y efecto fungistático para *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida glabrata* y *Candida albicans*, se encontraron fenoles (catecol), flavonoides, alcaloides y baja capacidad antioxidante.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿El extracto de flores de *Prosopis laevigata* tendrá actividad cicatrizante y conservará su acción antibacteriana?

## OBJETIVO GENERAL

Describir las técnicas y procedimiento útiles para determinar la actividad cicatrizante de las flores de *Prosopis laevigata*.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Detallar las técnicas para cuantificar la concentración de fenoles, flavonoides y alcaloides.
- 2.- Detallar la técnica para determinar la capacidad antioxidante.

- 3.- Redactar en extenso la técnica para determinar la composición química con una GC-MS, HPLC-DAD, HPLC-MS
- 4.- Redactar en extenso la técnica para corroborar la actividad antimicrobiana.
- 5.- Desarrollar teóricamente el método de evaluación de toxicidad en un modelo murino.
- 6.- Describir la técnica para evaluar la fuerza de cierre de una herida.
- 7.- Describir la técnica para evaluar la velocidad de cierre de una herida.
- 8.-Especificar teóricamente la técnica para evaluar la actividad cicatrizante a nivel histológico

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las flores de *Prosopis laevigata* fueron colectadas en el estado de Puebla, municipio Zapotitlán Salinas, en la Reserva de la Biosfera de Tehuacán Cuicatlán al sureste del estado de Puebla y el norte del estado de Oaxaca.

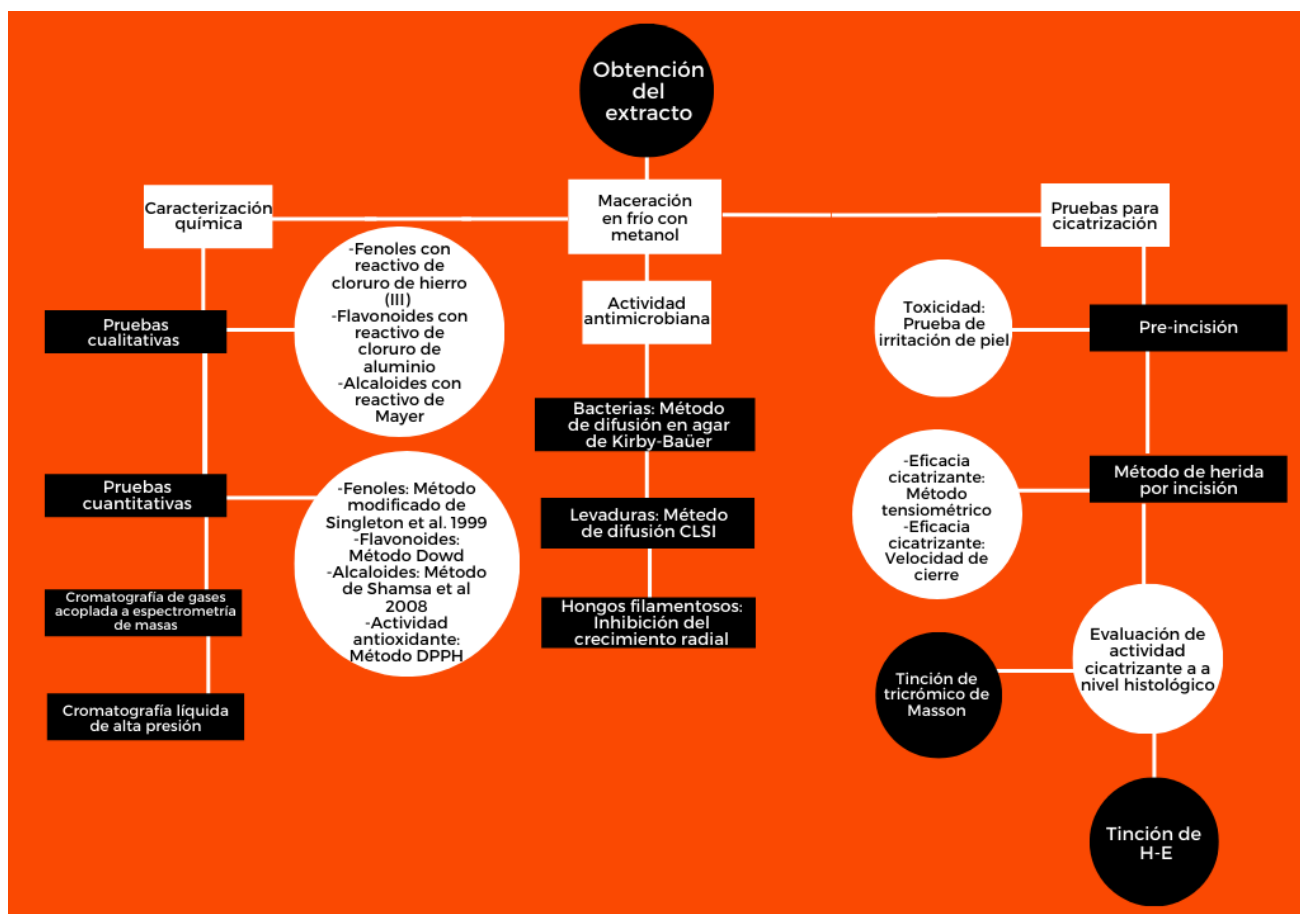


Figura 3. Diagrama de flujo, propuesta de métodos a llevar a cabo. Imagen original de García Loredo Montserrat Atenea.

## Descripción botánica

Nombre común: Mezquite (llamado así en toda su zona de distribución), útu (huasteco), tirtzecua (lengua tarasca) y algarrobo (en Colima, Jalisco y Nayarit).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida (Dicotiledóneas)

Subclase: Rosidae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Prosopis*

Especie: *Prosopis laevigata*

Sinonimia: *Acacia laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd; *Algarobia dulcis* (Kunth)

Benth; *Mimosa laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Poir; *Mimosa rotundata* Sessé & Moc; *Neltuma attenuata* Britton & Rose; *Neltuma laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Britton & Rose; *Neltuma michoacana* Britton & Rose; *Neltuma pallescens* Britton & Rose; *Prosopis dulcis* Kunth, *Neltuma palmeri* Britton & Rose.

*P. laevigata* es un árbol espinoso y perenne, que puede alcanzar una altura de hasta 13 metros.

Raíz: Puede llegar hasta los 50 m de profundidad la raíz principal, para alcanzar el manto freático, las laterales se extienden en un radio de 15 m (CONAFOR-CONABIO, 2004).

Tronco y ramas: el tronco es leñoso, puede medir hasta 1 m de diámetro, o 30-60 cm por lo general, la corteza es gruesa de color café-negrusco y con fisuras, tiene ramas flexuosas con espinas estipulares de 1-4 cm, las más tiernas carecen de hojas; las ramas forman una copa esférica o deprimida, más ancha que alta (CONAFOR-CONABIO, 2004)..

Hojas: Son pecioladas con 1-3 pinnas, cada una con 10-20 pares de folíolos sésiles. Son perennes, las hojas se caen en invierno y los renuevos nacen de marzo a mayo (CONAFOR-CONABIO, 2004)..



Figura 4. Hojas y flores de *Prosopis laevigata*.  
Fuente: Fotografía original de Marco Aurelio Rodríguez Monroy



Flores: Son pequeñas, de color amarillo-verdoso, se encuentran agrupadas en espigas (inflorescencias), son hermafroditas, actinomorfas, con cinco sépalos y pétalos y 10 estambres, ovario súpero, unilocular y unicarpelar, el estigma es cóncavo, la floración coincide con el renuevo de los foliolos, inicia en febrero-marzo y termina en abril-mayo (CONAFOR-CONABIO, 2004).

Fruto: Son vainas o legumbres alargadas, rectas o arqueadas, de 7-20 cm de largo por 8-15 mm de ancho, de color café-amarillento a rojizo, el mesocarpio contiene una pulpa gruesa y esponjosa, contiene 12-20 semillas, la fructificación dura de mayo a agosto (CONAFOR-CONABIO, 2004).

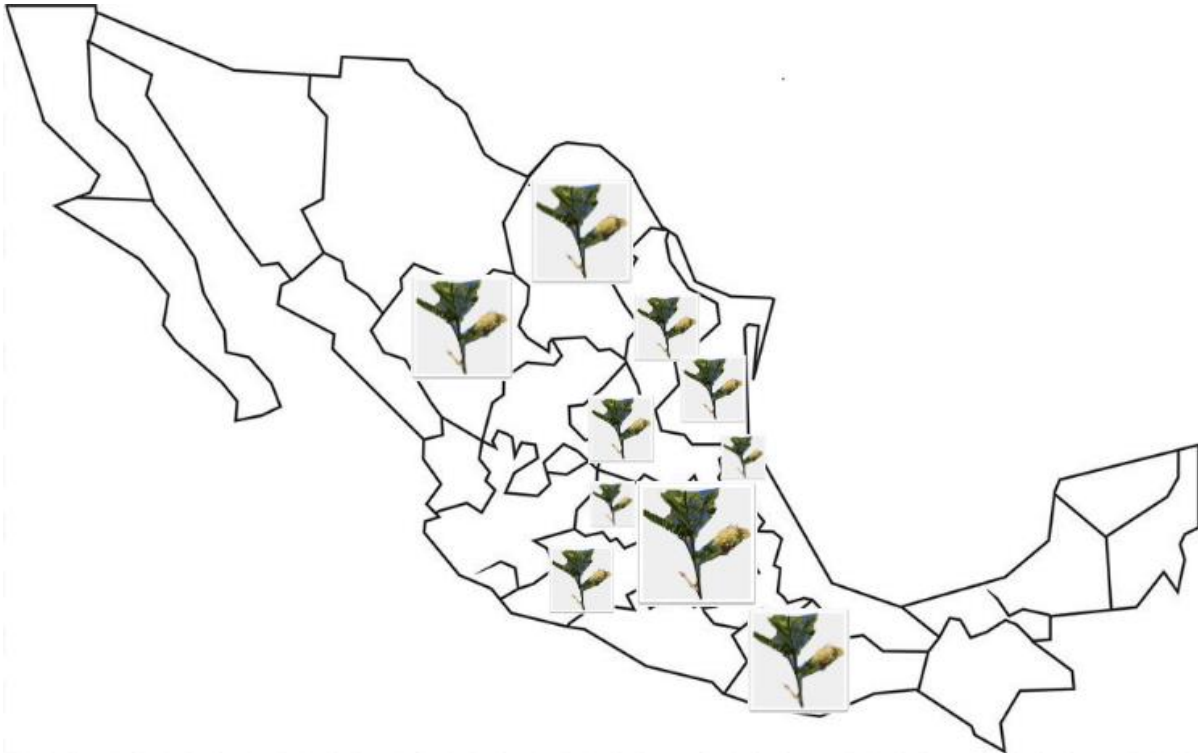
Semilla: Es oblonga y dura, es de color blanco-amarillento, son de 8-10 mm de largo y su dispersión es zoófila y endozoica (CONAFOR-CONABIO, 2004).



**Figura 5. *Prosopis Laevigata*: Rama con racimos, hojas; glándula interpeciolar, foliolo, flor y bráctea, perianto extendido y estambres, pistilo, fruto. Fuente: Tomado de: Grether et al., 2006).**

### Distribución geográfica

El mezquite abarca desde Michoacán hasta Oaxaca y de Nuevo León, Tamaulipas y norte de Veracruz y en regiones del centro de México, es la especie dominante en San Luis Potosí, Guanajuato, Zacatecas, Durango y Coahuila. Se distribuye de 300-2300 msnm, principalmente entre 1800-1900 msnm (Rodríguez et al., 2014).



**Figura 6. Mapa de distribución de *Prosopis laevigata*. Fuente: Imagen original de García Loredo Montserrat Atenea con fotografía original de Marco Aurelio Rodríguez Monroy.**

### Condiciones climáticas

El bosque de *Prosopis* prefiere lugares moderadamente secos, prospera en climas que son, desde, desérticos, cálidos, subhúmedos a templados subhúmedos, constituyen la vegetación característica de regiones de la Altiplanicie con clima seco, donde pueden desarrollarse en su forma arbórea; su principal rango de distribución en áreas con precipitación anual es de 350-1200 mm y la temperatura es de 20°-29°C, necesitan del aire seco y luminosidad para la fructificación (Rodríguez et al., 2014).

### Condiciones edáficas

Es importante para el correcto desarrollo del mezquite que los suelos sean profundos, de pH alcalino, con estructura granular y medianamente ricos en materia orgánica, de textura arenosa o arcillo-arenosa con mal drenaje, también puede crecer en suelos arenosos, someros, pedregosos, en llanuras salinas, sobre dunas y en suelos de origen ígneo y calizo. Los tipos de suelos donde crece son sierozem y chesnut, además si crece en laderas la altura será menor (Rodríguez et al., 2014).



**1. Distribución geográfica:** ● *P. odorata* ■ *P. glandulosa* ▲ *P. laevigata* \* *P. velutina*

Figura 7 Distribución geográfica de *Prosopis* en México. Fuente: Recuperado el 1 de junio de 2021 de <http://riaa.uaem.mx/xmlui/handle/20.500.12055/1369>

## Zona de colecta

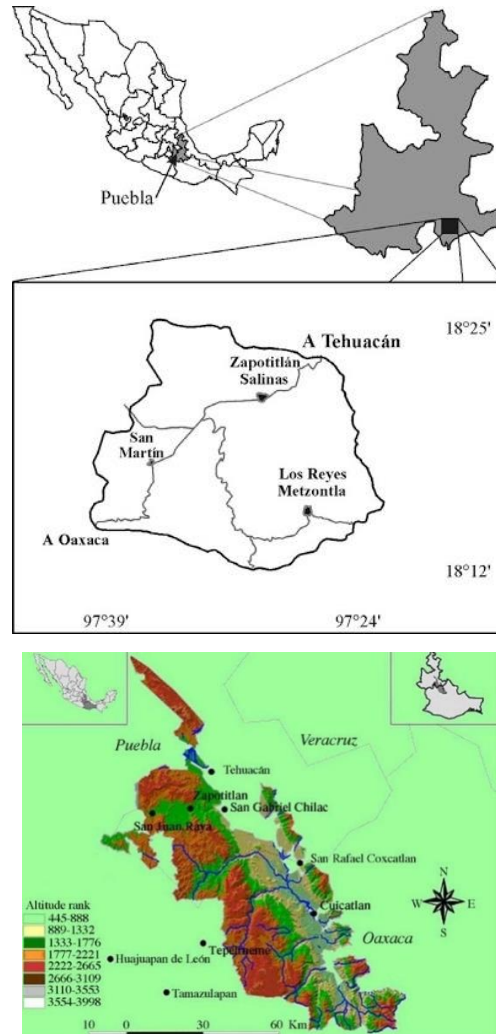
Las flores de *Prosopis laevigata* fueron colectadas en el estado de Puebla, municipio Zapotitlán Salinas, en la Reserva de la Biosfera de Tehuacán Cuicatlán al sureste del estado de Puebla y el norte del estado de Oaxaca. Cuenta con una superficie de 427.75 km<sup>2</sup> y sus coordenadas con son: 18° 19' 46" N y 97° 19' 24 y 97° 28' 31" W, su altitud es de 1 481 msnm (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2017), colinda al oeste con San Gabriel Chilac, San José Hiahuatlán y Altepexi, al este con Atexcal y el Estado de Oaxaca, al norte con Tehuacán y al sur con Caltepec.

Zapotitlán ha sido importante en el estudio de la biología, ya que se ha estudiado el área y sus componentes biológicos por más de quince años, debido a que las riquezas de recursos vegetales de esta zona son aprovechados por los grupos humanos locales, de acuerdo con Paredes-Flores et al., (2007).

Los antecedentes de estudios etnobotánicos particulares para esta zona están representados por trabajos que no fueron hechos de manera exclusiva en el pueblo de Zapotitlán, sino que abarcaron a varios poblados del municipio, tal es el caso de Dávila et al (2002) que habían identificado 815 especies de plantas vasculares, 159 se reportaban para remedios medicinales, por su parte Ramírez (1996) registra 69 especies medicinales, Arias-Toledo (2000) documenta 58 especies útiles de la zona y Pardo-Núñez (2001), que describe el uso de 72 plantas comestibles para todo el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, de las cuales 47 se citan para el municipio de Zapotitlán.

En 2003, ya se había logrado identificar un total de 87 familias botánicas, las cuales se veían representadas por 249 géneros y 374 especies, de estas últimas un 18% fueron reportadas como plantas medicinales y las familias que representaron un mayor número de especies fueron Asteraceae, Cactaceae, Solanaceae, Araceae y Euphorbiaceae, que corresponden a las familias representativas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Rosas, 2003). Además el área de Tehuacán-Cuicatlan es una Reserva de la Biosfera, dentro de ella existe una gran diversidad de plantas y animales, muchos endémicos de la zona, abarca 145,255.20 hectáreas (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2018), se protegen los paisajes y vegetación, como matorrales secos, pastizales y bosques de diferentes tipo,

conservando así la biodiversidad y permitiendo, a su vez, que sea un área idónea para el estudio de la biología, en esta región cerca del 30% de plantas son endémicas (Arias et al., 2000); además se encuentra el Jardín Botánico Helia Bravo Hollis donde se llevan a cabo estudios de tipo taxonómico y resguardan especies en peligro, todo esto hace relevante las investigaciones realizadas en esta zona.



**Figura 8. Mapa de Zapotitlán Salinas y alrededores. Fuente: Imágenes tomadas de Hernández et al., 2005 y Canales et al., 2005.**

### Orografía

Dentro del municipio se encuentra al noreste el Valle de Tehuacán y la parte sur-occidental está la sierra de Zapotitlán, que tiene un relieve montañoso, el cual forma un arco que va del noreste a sureste, declinado al este donde se registra la menor altura en el municipio, se encuentran zonas planas al occidente; destacan el cerro el Conucos, Pajarito y el Calvario (INAFED, 2020).

## Hidrografía

El área sureste del municipio se ubica en la cuenca del Balsas, afluentes del Acatlán corresponden a esta cuenca, mientras que la otra parte pertenece a la cuenca del Papaloapan; el municipio es recorrido por varios arroyos intermitentes que se concentran en el arroyo principal: Agua el Gavilán, ubicado al centro-este, es el principal afluente del Zapotitlán. El río Zapotitlán contiene grandes concentraciones de sal de sodio, que provienen de las depresiones del Zapotitlán, se une en el Valle del Tehuacán a un río con el mismo nombre y forman el Río Salado, de los principales afluentes del Papaloapan. Algunos arroyos que se encuentran en la zona sureste y destacan son: Acatepec y Las Manzanas, este último sirve como límite con el estado de Oaxaca (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2017).

## Clima

Sobre la Riviera del arroyo las Manzanas predomina el clima semicálido subhúmedo con lluvias de verano. En el centro norte, donde se ubica el cerro Pajarito y en el extremo suroeste destaca el clima templado subhúmedo con lluvias de verano. En las zonas planas al poniente domina el clima semiseco cálido con lluvias en verano y escasas a lo largo del año, en esta zona el verano es cálido, la temperatura media anual es de 12-18°C y es el clima que más predomina. Por último, al oriente se ubica el clima semicálido con lluvias en verano y escasas a lo largo del año, el invierno es fresco en esta área y se registra una temperatura media anual de 18°C a 22°C (INAFED, 2020).

## Vegetación

En el municipio se destacan grandes áreas de matorral crasicaule, asociado con cardonales y vegetación arbustiva; también hay zonas de chaparrales asociados a arbustos, dispersos por el municipio. Hay superficies con matorral desértico rosetófilo, cubren grandes extensiones de terreno, suelen estar asociados a matorral suviner. En el territorio suroeste hay una franja de bosques de encino. Las zonas de agricultura de riego se ubican en el Arroyo Manzanas y en el Valle de Tehuacán. La vegetación más importante en Zapotitlán son los Mezquitales, selva baja perennifolia con espinas laterales, la especie dominante es *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. Ex Wild) y el matorral xerófilo, representado por *Neobuxbaumia*

*tetetz*o (F. A. C. Weber) Backeb (“Tetecho”), *Fouquieria formosa* (Kunth) (ocotillo), *Parkinsonia praecox* (“Manteco”) y *Beaucarnea gracilis* L. (“Sotolín”) (Oliveros-Galindo, 2000).

#### Edafología

El municipio presenta cuatro tipos de suelos:

1-. Litosol: no son aptos para ningún tipo de cultivo, son destinados al pastoreo, es predominante y ocupa una extensa área entre las rendzinas y vertisoles, así como todo el extremo sureste de las zonas montañosas.

2-. Rendzina: suelos fértiles para actividades agropecuarias con cultivo de raíces, comprende desde el centro hasta el oeste y el área de la cuenca del Arroyo Agua El Gavilán.

3-. Regosol: están formados por materia suelta no aluvial, como dunas, cenizas volcánicas, playas, etc., son pobres en nutrientes y casi infértiles, están localizados al poniente.

4-. Vertisol: tienen textura arcillosa y pesada, se agrietan cuando se secan, su labranza es difícil, sin embargo, el manejo correcto de estos suelos permite grandes variedades de cultivo, su fertilidad es alta, se encuentra en el extremo este en el Valle de Tehuacán.

#### Población

En 2015, se reportó que la población en el municipio de Zapotitlán rondaba en la cifra de 8, 495 habitantes, que representaban el 0.14% de la población en el estado de Puebla (SEDESOL, 2016). Sus principales actividades es la agricultura de temporal, con cultivos de maíz, huertos familiares con plantaciones de maguey (*Agave marmoratada*), nopal (*Opuntia pilífera*) y pitahayas, también se dedican a la artesanía del mármol y ónix, explotación de la gema y graveras y granjas avícolas (Montoya et al., 2004).

## Método de maceración

La maceración en frío es un proceso de extracción sólido-líquido, en donde la muestra presenta ciertos compuestos solubles que pueden ser extraídos por medio de un líquido de extracción, la eficacia de este método reside en la naturaleza de los compuestos, su afinidad al solvente y el tiempo de extracción. Las ventajas de la maceración en frío consisten en la utilización de equipos simples que requieren mínimas cantidades de energía y la capacidad de extraer la mayoría de las propiedades de lo que se macera, sin alterar por efectos de la temperatura. Para la obtención del extracto, se pesaron las flores, que fueron separadas del resto del material biológico, y se colocaron en un matraz con metanol, se dejaron en el solvente por varios días (4-10), agitándose por lo menos una vez al día, alejados de la luz solar y tapados para que no entraran contaminantes, posteriormente se filtró y destiló a presión reducida con ayuda de un rotavapor (Domínguez, 1979). El rendimiento se obtuvo de la siguiente forma:

Rendimiento= (gramos de extracto) (100) / gramos de peso seco de flores



**Figura 9. Montaje de destilación con rotavapor.  
Fotografía original Laboratorio de Farmacognosia (UBIPRO, FES Iztacala).**



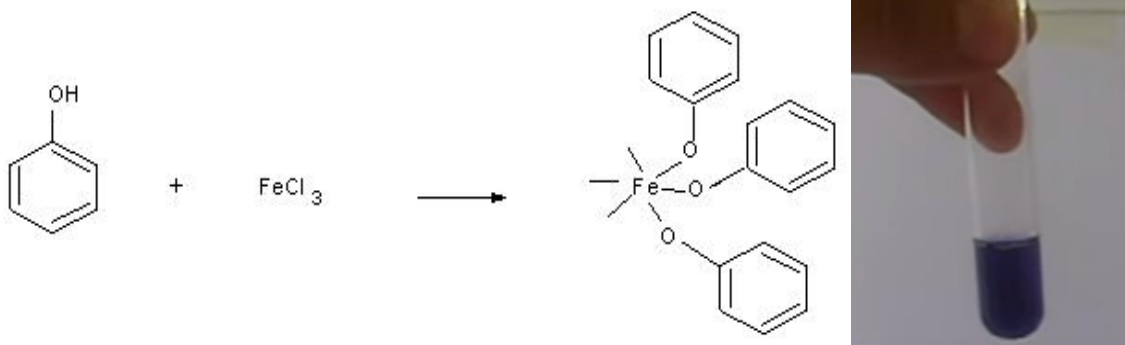
Existen más métodos para la obtención de extractos vegetales como la infusión, donde se vierte agua hirviendo sobre el material biológico, o la hidrodestilación que permite la separación de los compuestos volátiles de la muestra a través de la aplicación de calor, también se encuentra la percolación, donde se hace pasar un flujo de solvente a través de la muestra cediendo sus componentes solubles, incluso está la extracción mecánica, en la cual se ejerce presión sobre el material y se obtiene un “jugo” con algunos principios activos de interés (Amaguaña y Churuchumbi, 2018); sin embargo en algunos de estos métodos descomponen los compuestos volátiles que pueden ser de importancia con la aplicación de calor (infusión), otros no extraen completamente los componentes, como es el caso de la destilación y la extracción mecánica, la desventaja que presenta la percolación es que requiere de una cantidad considerable de solvente que se pasa por la muestra, estas complicaciones hacen más viable la extracción mediante la maceración, ya que es un procedimiento que se puede hacer a temperatura ambiente, evitando la degradación de compuestos volátiles que ocurre cuando se aplica calor, ocupa poco solvente y a pesar de ser largo el tiempo de obtención del extracto se obtienen los componentes deseados, además es una técnica sencilla y al alcance de muchos laboratorios al no necesitar de instrumentos o reactivos complicados de manejar o difíciles de conseguir.

## Determinación cualitativa de metabolitos secundarios

### **Fenoles**

Son compuestos aromáticos, tienen uno o varios grupos hidroxilo unidos a un anillo benceno, interaccionan fuertemente uno con el otro causando nuevas propiedades, como puntos de fusión y ebullición más altos y mayor solubilidad en agua, además sirven como antioxidantes, algunos polifenoles pueden proteger a las células contra el daño causado por radicales libres mediante el estrés oxidativo. Se clasifican según el número de carbonos en su estructura primaria, se sintetizan por la ruta del ácido malónico y ácido siquímico. Entre sus funciones destaca el papel estructural, proporcionan fuerza y rigidez a la pared celular, protección contra la herbivoría y la radiación UV (Flores et al., 2012).

La detección de fenoles en una muestra se puede llevar a cabo por medio de la reacción con cloruro de hierro (III), se le agrega unas gotas de la solución  $\text{FeCl}_3$  al 5% al extracto disuelto en agua o agua-etanol, si esta toma un color rojo, azul, verde o púrpura se asume que hay presencia de fenoles, esto se debe a que el ion cloruro se une al hidrógeno del grupo hidroxilo del fenol, la ruptura del enlace covalente oxígeno-hidrógeno permite que el hierro pueda unirse al grupo fenóxido, ya que al poseer una carga negativa puede reaccionar con un electrófilo, en este caso el Fe, para formar complejos (Rengifo-Penadillos, 2013).



**Figura 10. Resultado positivo de la prueba cualitativa para fenoles con cloruro de hierro. Fuente: Imágenes obtenidas de: <https://es.quora.com/Qu%C3%A9-se-forma-cuando-un-fenol-reacciona-con-FeCl3>**

También se puede hacer una prueba cualitativa con  $\text{Br}_2$ , el cual puede reaccionar con los fenoles, se lleva a cabo la sustitución electrofílica aromática, generando bromofenoles, se puede observar que pasa de un color rojizo a uno incoloro, sin embargo, no se recomienda utilizar esta prueba ya que el bromo también puede interactuar con alquenos, se produce una adición electrofílica, rompiendo los enlaces dobles formando dihaloalcanos, causando una falsa lectura de presencia de fenoles (Sandoval, 2013).

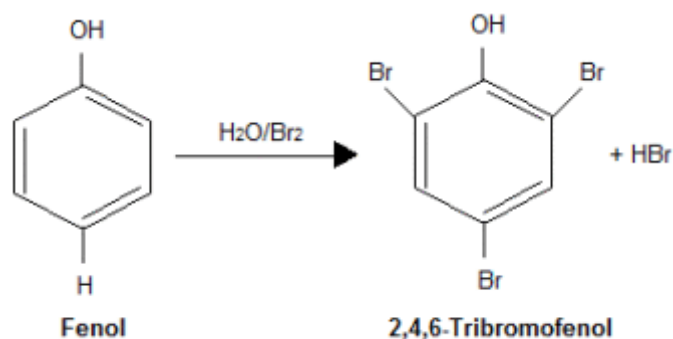


Figura 11. Prueba de identificación de fenoles: Reacción con  $\text{Br}_2$ .  
 Fuente: Imagen obtenida de <https://fenolesblog.wordpress.com/>

También se puede llevar a cabo una identificación cualitativa por medio de una solución de NaOH al 20%, este reactivo no se recomienda para esta prueba por el simple hecho de que en la preparación de la solución se utilizan demasiados reactivos para el producto final, son necesarios 2 mL de solución helada de diazonio se le añade unas gotas de 0.1 g de  $\beta$ -naftol en dos mililitros de solución NaOH y en 5 mL de agua; el uso de esta técnica generará muchos desechos lo cual es una gran desventaja para el investigador (Flores et al., 2012).

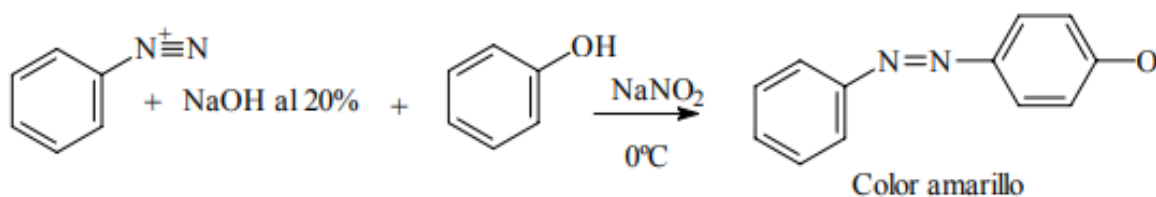
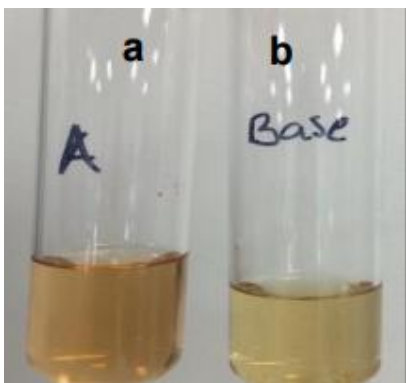


Figura 12. Reacción de fenoles con hidróxido de sodio al 20%. Fuente: Imagen obtenida de <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/ingenieria/article/view/34165/36160>

## Flavonoides

Forman parte de los fenoles, se caracterizan por poseer quince carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos, entre sus funciones se encuentra la defensa y la pigmentación de flores, frutos y hojas; presentan diferentes matices de solubilidad, pueden ser totalmente solubles en agua o insolubles pero solubles en éter etílico u etanol, sin embargo, todos los flavonoides son insolubles en éter de petróleo. Pueden actuar como antioxidantes por su condición de polifenoles y su clasificación es en función a su grado de oxidación del puente de tres carbonos, se dividen en: flavanona, aurona, chalcona, flavona, flavanonol, flavonol, antocianinas, catequina, isoflavona, etc (Rengifo-Penadillos, 2013).

Para corroborar la presencia de flavonoides se puede hacer mediante la prueba de Shinoda y el método de cloruro de aluminio, a continuación, se describen:



**Figura 13. Resultado positivo de la prueba de Shinoda (tubo A), para el extracto obtenido. Fuente: Imagen tomada de Monedero Pasiminio, 2016.**

- Método de cloruro de aluminio: a 2 mL de solución de extracto se le agregan 2 mL de cloruro de aluminio al 2% (en etanol) a cada tubo, se agitan las soluciones; los flavonoides al entrar en contacto con el  $AlCl_3$  producen un complejo color amarillo, con pico de absorción de luz de 420-425 nm (Monedero Pasiminio, 2016).

- Prueba de Shinoda: los extractos alcohólicos incoloros o ligeramente amarillentos se les agrega trozos de magnesio y gotas de ácido clorhídrico concentrado, se deja reposar 10 minutos y si la coloración cambia a naranja o rojo hay flavonas, rojo-azuloso o violeta presenta flavanonas. El cambio de color se debe a que el magnesio es oxidado por el HCl concentrado, produciendo  $H_2$ , que se eliminará en forma de gas y se forma  $MgCl_2$ , que será el que interactúa con los flavonoides dando las diversas coloraciones, el magnesio divalente intensifica la coloración por estar doblemente coordinado (Vidaurre-Martínez et al., 2019).

Para un estudio, como el que se propone en este escrito, se recomienda hacer la prueba cualitativa de alcaloides con el reactivo de cloruro de aluminio (2%), ya que con la prueba de Shinoda se generan desechos muy tóxicos por la utilización del ácido clorhídrico, también se debe mencionar que esta prueba utiliza dos reactivos mientras que la primera solamente requiere de uno. Además de estas técnicas se puede usar amoniaco para la detección cualitativa de alcaloides, pero este al trabajarse en forma de gas y ser perjudicial para la salud, se descarta, sin tomar en cuenta que también produce muchos desechos tóxicos.

### ***Alcaloides***

Son sustancias básicas que contienen nitrógeno en un anillo heterocíclico, son derivados de los aminoácidos, la mayoría son incoloros y se hallan en las plantas como sales de ácidos orgánicos, su característica más importante es su basicidad, por lo que pueden ser extraídos en un medio básico, ácido o con solventes orgánicos (Carranza et al, 2009). Pueden detectarse por dos técnicas utilizando el reactivo de Mayer o Dragendorff, se basan en la capacidad de los alcaloides de combinarse con yodo o metales pesados para formar precipitados.

Con el reactivo de Mayer, los alcaloides reaccionan y dan un precipitado blanco o amarillo claro, amorfo o cristalino, cuando a 1 mL del extracto se le agregan unas gotas del reactivo, la reacción se da en un medio ácido al adicionarse el reactivo, puede formar una turbidez opaca (+), definida (++) o abundante (+++), el yoduro de potasio forma un complejo con el alcaloide, se une el yodo al nitrógeno y desarrollan una coloración crema-blanco. El reactivo se prepara disolviendo 3.g de bicloruro de mercurio en 60 mL de agua y 6 g de yoduro de potasio, se afora a 100 mL (Coy-Barrera et al., 2014).

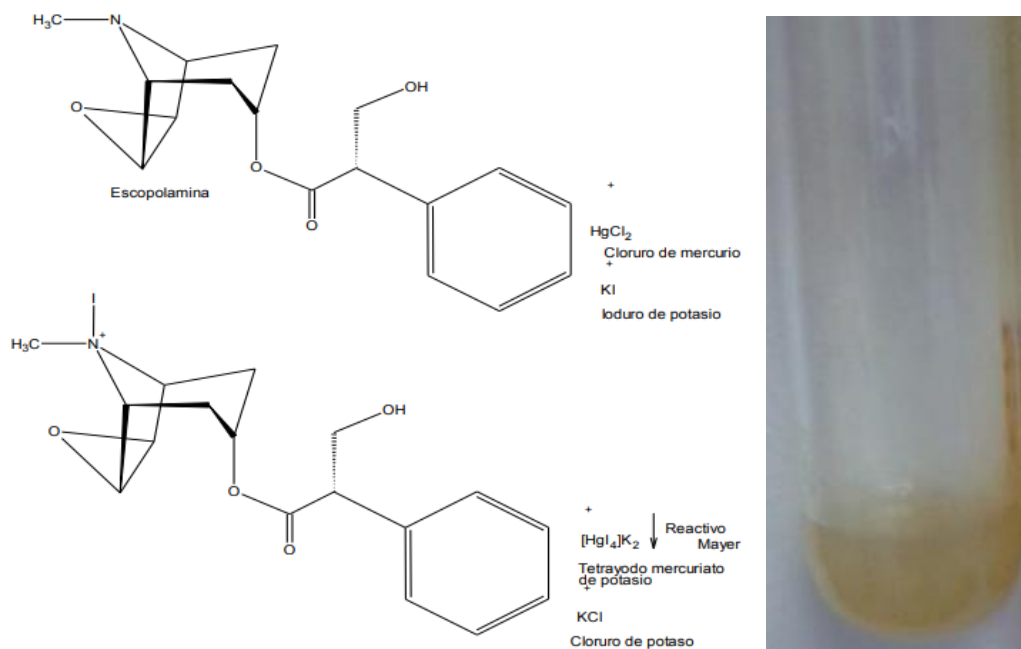


Figura 14. Prueba de identificación para alcaloides: Reacción de Mayer. Fuente: Imágenes tomadas de Yampuezan Yanpuezan, L. M., 2017; San Román Ávila, 2014.

Para el caso del reconocimiento de alcaloides con el reactivo de Dragendorff, el reactivo se prepara mezclando 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 mL de ácido nítrico (30%) con una solución de 27.2 g de yoduro de potasio en 50 mL de agua, se deja reposar 24 hrs, se decanta y se afora a 100 mL. Al adicionarse unas gotas del reactivo de Dragendorff a 2 mL del extracto se forma un precipitado rojizo-naranja, en un medio ácido, esto es consecuencia de la unión del yodo al nitrógeno al entrar en contacto con el reactivo (Coy-Barrera et al., 2014).

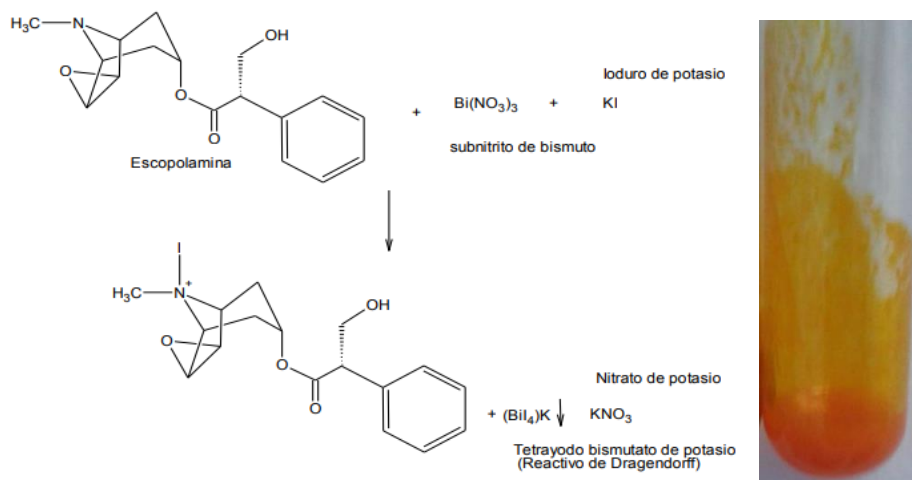


Figura 15. Reacciones de identificación para alcaloides: Reacción de Dragendorff. Fuente: Imágenes tomadas de Yampuezan Yanpuezan, L. M., 2017; San Román Ávila, 2014.

También se puede realizar la detección cualitativa de alcaloides por medio del reactivo de Wagner, el cual se prepara con 1.27g de  $I_2$  y 2g de KI disueltos en 5 mL de agua destilada, que se afora a 100 mL, se forma un complejo triyoduro el cual es el que atrae de manera electrostática al alcaloide protonado, se pueden detectar con un color marrón. Otro reactivo que se puede utilizar para esta prueba es el de Hager, que es una solución saturada de ácido pícrico en agua, el anillo de este compuesto se encuentra con diferencia electrónica, la cual se compensa con ayuda del anillo donde está el grupo metoxi del alcaloide, producen un complejo sigma, dando como resultado cristales amarillos, por la capacidad de los picratos para cristalizar (San Román, 2014).

Se recomienda realizar la prueba con el reactivo de Mayer, ya que tiene la capacidad de reaccionar con casi todas las soluciones de alcaloides, además es sencillo de preparar y no requiere demasiados reactivos, el reactivo de Wagner y Hager también tienen la utilidad de que pueden ser preparados con pocos reactivos, de ambos se recomienda el de Wagner ya que es muy sensible, la coloración es particular e inequívoca. Asimismo, se sugiere utilizar el reactivo de Dragendorff, siempre y cuando se cuente con el tiempo y los compuestos para poder prepararlo y la capacidad para manejar los residuos que se producen durante la técnica, pero se debe tomar en cuenta que este puede dar una lectura falsa si en la muestra hay sustancias oxigenadas con alta densidad electrónica como la cumarinas, chalconas, acetogeninas, etc.

## Cuantificación de fenoles totales

La concentración de fenoles se puede medir por espectrofotometría, por medio de una reacción colorimétrica redox, se emplea el reactivo de Folin-Ciocalteu, este tiene coloración amarillenta y presenta pH ácido, puede reaccionar con cualquier tipo de fenol por el molibdato y tungstato que contiene. Para prepararlo se disuelven 100 g de tungstato sódico ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y 25 g de molibdato sódico en ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) en 700 mL de agua destilada, se le añaden 50 de ácido fosfórico al 85% y 100 ml de ácido clorhídrico concentrado, se hierve a reflujo durante 10 horas. Se le agrega 150 g de sulfato de litio ( $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) y unas gotas de bromo, se vuelve a hervir por 15 min., se deja enfriar y se afora a 1 L con agua destilada. Forma complejos fosfomolibdico-fosfotúngsticos, dando como resultado el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que cambiará su coloración a azul cuando se reduzca debido a la transferencia de electrones de los fenoles, el cromógeno de color azul intenso de tungsteno es proporcional al número de grupos hidroxilo de los fenoles que se oxidaron, susceptibles para ser determinados espectrofotométricamente a 760 nm (Ramos, 2016, Nava, 2017).

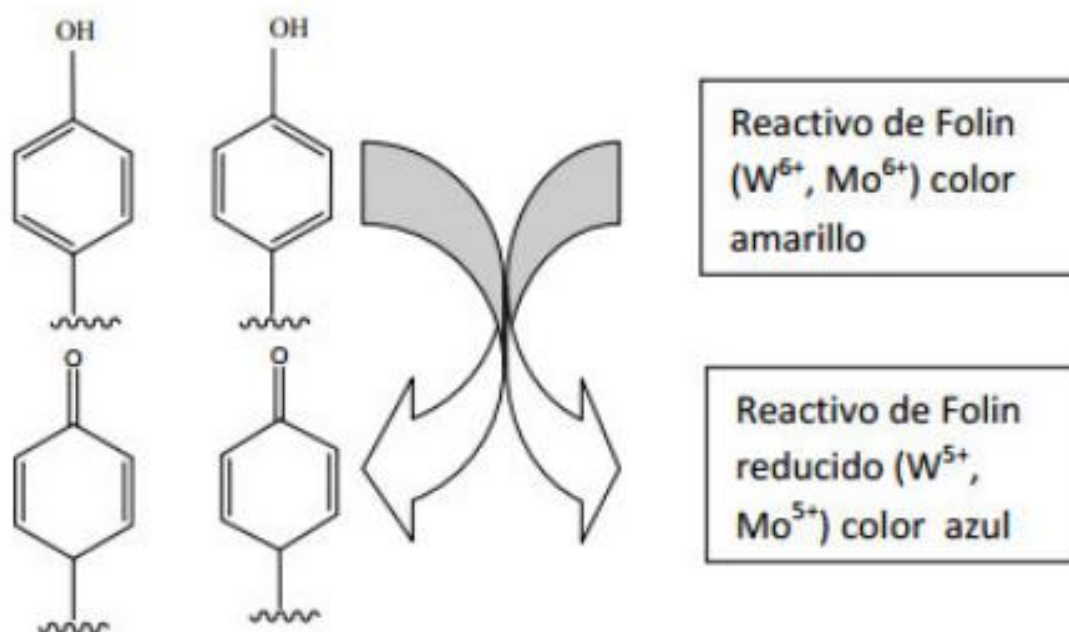


Figura 16. Mecanismo de acción del reactivo de Folin- Ciocalteu. Fuente: Imagen obtenida de Colina Ramos, 2016.



Método modificado de Singleton et al. (1999)

Para la curva de calibración se emplea ácido gálico, que gracias a su estabilidad y estructura fenólica puede reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu y servir de referencia para la muestra problema, presenta un grupo benceno unido a un grupo carboxilo. Para la preparación del patrón de ácido gálico se hace una solución de 1 mg en 5000  $\mu\text{L}$ , del patrón se toman las alícuotas correspondientes según la concentración que se desea tener.

**Curva de calibración** Se utiliza una solución estándar de ácido gálico de 1mg/5mL, de los cuales se utilizará aproximadamente 0.4mg/2mL. A partir de esta solución se toman alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.00625, 0.0125, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL); a cada una se le agrega el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas en un volumen final de 1 mL.

El  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , que se utiliza en esta técnica, debe estar a un 20% p/v, para que esto sea posible se debe agregar a 20 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a un volumen menor de 100 mL de agua destilada, se disuelve completamente y se afora a 100 mL de agua destilada o 3 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en 15 mL de agua destilada, se le agrega a cada tubo 1.5 mL de esta solución.

La solución estándar del extracto se preparará con 50 mg del extracto en 5 mL de agua destilada, de esta se toma 250 y 500 $\mu\text{L}$ , cada volumen se hace por triplicado y se le agrega agua destilada para obtener un volumen final de 1 mL. En caso de que se presente precipitado se procederá a diluir las veces necesarias que considere el investigador, si al realizar la lectura e interpolar la concentración llegará a salir muy baja y no estar dentro de los valores de la curva patrón, se incrementará la concentración del extracto en la dilución inicial.

En seguida, a todos los tubos se les agregan 7 mL de agua destilada y se les adiciona 500  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu, se deja reaccionar por cinco minutos y posterior a ese tiempo se les agrega 1.5 mL de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20%. La mezcla se deja reposar por dos horas, a temperatura ambiente, se lee a 760 nm.

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

Figura 17. Tabla de concentraciones para curva patrón y muestras problemas en la prueba para fenoles. Fuente: Imagen obtenida de Nava, 2017.

Para la interpretación de resultados, se grafica la concentración del ácido gálico (eje de las "x") contra la absorbancia (eje de las "y"), para conocer la concentración de fenoles presentes en el extracto problema se hace un análisis de regresión lineal con los datos obtenidos de la curva patrón, se interpola la absorbancia de las muestras evaluadas, los resultados se reportan como equivalentes al ácido gálico por gramo de extracto (eAG mg/g) o en porcentaje.

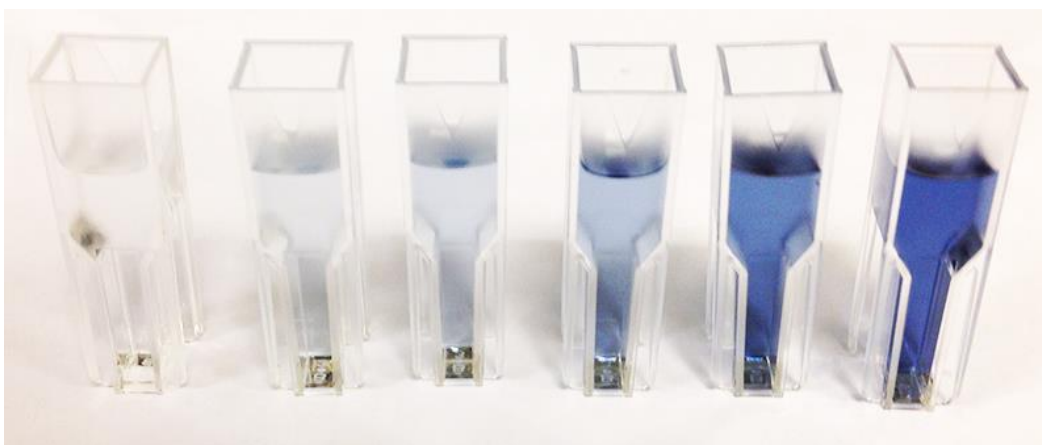


Figura 18. Resultado positivo de la prueba para cuantificación de fenoles para el extracto obtenido.

Fuente: Imagen tomada de: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c4/Tyrosin\\_standards\\_developed\\_by\\_Folin-Ciocalteu%27s\\_reagent.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c4/Tyrosin_standards_developed_by_Folin-Ciocalteu%27s_reagent.jpg)

## Contenido de flavonoides totales

Los flavonoides son de naturaleza fenólica, su característica principal es que poseen dos anillos aromáticos bencénicos (A y C) unidos por un puente de tres carbonos, tienen una estructura general de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, se puede o no formar un tercer anillo (B), suelen presentar al menos tres hidroxilos fenólicos y se encuentran generalmente combinados con azúcares en forma de glicósidos, lo que ocasionará que sean menos reactivos y más solubles en agua, los azúcares más comunes son la galactosa, ramnosa, glucosa y xilosa (Colinas, 2016).

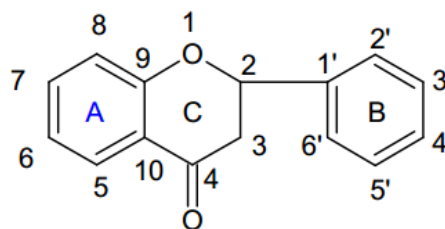


Figura 19. Estructura básica de un flavonoide. Fuente: Imagen obtenida de Colina Ramos, 2016.

Se pueden clasificar por la conformación del anillo C, en función del estado de oxidación de ese anillo y la posición del anillo B, algunos ejemplos se muestran en la siguiente figura; las propiedades físicas van a ser regidas por la clase y forma del flavonoide, las flavonas, flavonoles y auronas debido al sistema conjugado son compuestos sólidos con colores de rojo a amarillo, las antocianinas son de tonos rojos, morados, violetas y azules además son solubles en agua, las flavanonas y flavanoles presentan rotación óptica debido al carbono quiral C-2; los flavonoides altamente hidroxilados son solubles en etanol, metanol y n-butanol, mientras que las poco hidroxiladas se disuelven en éter etílico, acetato de etilo y acetona, algunas otras en éter de petróleo y cloroformo (Meneses-Reyes et al., 2008).

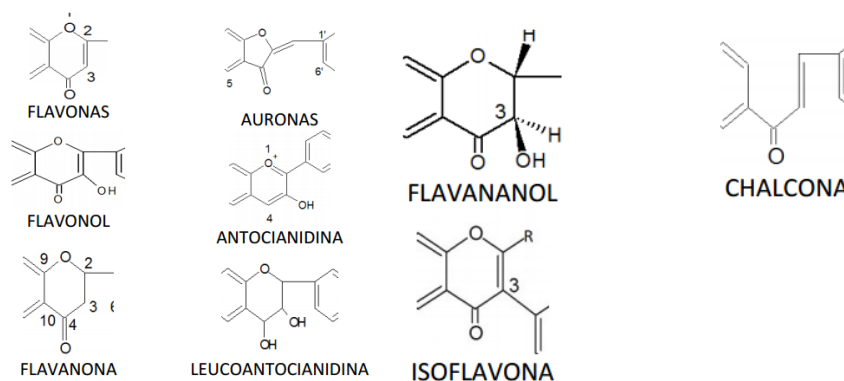
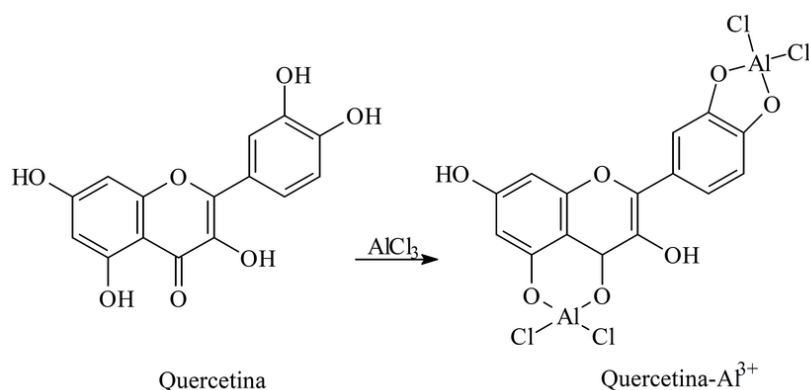


Figura 20. Estructura central del esqueleto flavonólico de los principales subgrupos de flavonoides. Fuente: Imagen obtenida de Colina Ramos, 2016.

Los flavonoides en las plantas tienen la función de defensa contra la radiación UV, bacterias, hongos, insectos y otras plantas, además sirven como marcadores químicos para atraer a los polinizadores hacia el néctar. Recientemente se ha visto que también participan en la inhibición de infecciones de origen viral, son capaces de suprimir la formación de radicales libres, tienen acción antiinflamatoria, antialérgica, antihepatotóxico, antimicrobiano y se pueden usar contra la diabetes mellitus y como vasodilatadores. Los flavonoides más representativos son la quercetina, kaemferol y miricetina (Colinas, 2016).

Este método se basa en el viraje de color de una solución de  $\text{AlCl}_3$  (2%) a un color amarillo, esto sucede debido a que cuando los flavonoides entran en reacción con el  $\text{AlCl}_3$  se forman complejos metálicos con el grupo ceto del C-4 y/o en el grupo hidroxilo en el C-3/C-5, al igual que con los grupos O-dihidroxi del anillo aromático B y A, formando complejos lábiles ácidos; se pueden diferenciar a las flavonas y flavonoles por medio del grupo oxo del C-4 que permanece estable cuando se acidifica el medio debido a la ácido-labilidad (Nava, 2017).



**Figura 21. Reacción de flavonoides con cloruro de aluminio. Fuente: Imagen obtenida de [https://www.researchgate.net/figure/FIGURA-1-Esquema-ilustrado-da-complexacao-do-flavonoide-quercetina-com-cloreto-de\\_fig1\\_260191442](https://www.researchgate.net/figure/FIGURA-1-Esquema-ilustrado-da-complexacao-do-flavonoide-quercetina-com-cloreto-de_fig1_260191442)**

Método Dowd (Ramamoorthy y Bono, 2007)

Para llevar a cabo este ensayo se prepara un stock de quercetina, flavonoide que servirá como referencia para la cuantificación de flavonoides totales, se pesan 3 mg de quercetina y se disuelven en 3 mL de MeOH de grado HPLC, de esta disolución se toman alícuotas para preparar una curva patrón con las concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 ppm.

Para las primeras concentraciones (1-5 ppm), se toma del stock 20  $\mu\text{L}$  y se diluyen en 180  $\mu\text{L}$  de MeOH, de esta forma se obtienen 1  $\mu\text{g}$  en 10  $\mu\text{L}$ . De esta forma se hace posible trabajar con las primeras concentraciones de una forma más sencilla; del nuevo stock se toma:

[ ] ppm	$\mu\text{L}$ stock de quercetina	$\mu\text{L}$ de MeOH	$\text{AlCl}_3$ al 2%
1	10	990	1
2	20	980	1
3	30	970	1
4	40	960	1
5	50	950	1

Figura 22. Tabla para las primeras concentraciones de la prueba de flavonoides. Fuente: Imagen obtenida de Nava, 2017.

Del stock inicial de 3 mg de quercetina en 3 mL de MeOH se toma:

[ ] ppm	$\mu\text{L}$ stock de quercetina	$\mu\text{L}$ de MeOH	$\text{AlCl}_3$ al 2%
6	6	994	1
7	7	993	1
8	8	992	1
9	9	991	1
10	10	990	1
20	20	980	1
30	30	970	1
40	40	960	1
50	50	950	1
60	60	940	1
70	70	930	1
80	80	920	1
90	90	910	1
100	100	900	1

Figura 23. Tabla de concentraciones para la prueba de flavonoides. Fuente: Imagen obtenida de Nava, 2017

Para el stock del extracto se pesa 3 mg del extracto etanólico y se procede a disolverlo en 3 mL de MeOH de grado HPLC. Del stock se toma 1 mL y se hace por triplicado la muestra problema.

Para el blanco se prepara añadiendo únicamente 1 mL de MeOH de grado HPLC. Preparada la curva patrón, las muestras problema y el blanco, se procede a añadir a cada tubo 1 mL de  $\text{AlCl}_3$  (2%), obteniendo como volumen final en todos los tubos 2 mL, de cada uno se toman 200  $\mu\text{L}$  y se colocan en una placa de ELISA por triplicado. Luego de un lapso de 10 minutos a temperatura ambiente se procede a leer en el espectrofotómetro a una absorbancia de 450 nm.

En cuanto a la interpretación de resultados, se grafica la concentración obtenida de la quercetina en ppm (eje "x") contra la absorbancia (eje "y"). Se hace un análisis de regresión lineal y se interpolan los valores de absorbancia obtenidos de los tubos problema, se hace un promedio de la absorbancia y los resultados se expresan como equivalente de quercetina/g de extracto eQ mg/g).



Figura 24. Fotografía del ensayo de cuantificación de 12 flavonoides. Fuente: Imagen obtenido de Tenorio Domínguez, 2016.

Existen otras técnicas para la cuantificación de flavonoides totales por ejemplo el método de Chang y colaboradores (2002), en este se construye una curva de quercetina con concentraciones de 1-100 microgramos preparadas en un stock de etanol al 80%, se le añade a cada concentración una disolución de nitrato de aluminio al 10%, otra de acetato de potasio al 1M, etanol al 95% y agua destilada; se homogeniza la mezcla y se deja incubar a temperatura ambiente por 30 minutos y se mide la absorbancia de la curva y de los tubos problema 415 nm en el espectrofotómetro, al final los resultados de la absorbancia del extracto se reportan como miligramos equivalentes de quercetina en 100 gramos de muestra seca.

También podemos encontrar el método descrito por Kostennikova Z. (1983) en el cual se emplea ácido sulfúrico al 10% para la extracción de los fenoles en etanol, mediante la técnica de reflujo por un lapso de dos horas, después se filtra en baño maría, hasta que quede la mitad del volumen inicial, la fracción filtrada se le hace pasar a un baño en frío durante media hora, se elimina el filtrado y los lavados, por lo que se procede a recolectar el residuo que se disuelve en etanol al 96% que previamente fue calentado a 50 grados centígrados y se lleva a la lectura en el espectrofotómetro, para el patrón de referencia se hace una curva con quercetina, al cual se interpolará la absorbancia del tubo problema y el resultado se reporta como equivalentes miligramos de quercetina; las hojas que se utilizan para esta técnica se lavan con etanol para poder desecharlo.

Los dos métodos anteriores descritos, aunque sirven bien para la cuantificación de flavonoides totales, ambos tienen la desventaja de que requieren demasiado tiempo para que las reacciones se lleven a cabo y se pueda proceder a leer en el espectrofotómetro, además en las dos técnicas se utilizan más reactivos, que el método que propone Dowd, para el investigador esto representaría un mayor costo económico tanto para conseguir todos los reactivos necesarios para cada método así cómo un mayor costo a la hora del manejo de residuos ya que se necesitan más recursos para lograr el correcto manejo y desecho de ellos; por lo que se recomienda seguir el método de Dowd, por ser sencillo de reproducir, barato y rápido.

## Cuantificación de Alcaloides

Los alcaloides son compuestos heterocíclicos que tienen en su estructura un nitrógeno básico, son derivados de los aminoácidos, presentan un grupo funcional amina o imina, suelen ser insolubles o pocos solubles en agua, pero solubles en solventes orgánicos a pH alcalino y cuando entran en reacción con ácidos forman sales (Rojas De Astudillo et al, 2015). Se pueden clasificar de acuerdo a su procedencia, por ejemplo:

- a) Alcaloides derivados de la ornitina y lisina
- b) Alcaloides derivados de tirosina y fenilalanina
- c) Alcaloides derivados del triptófano
- d) Alcaloides derivados del ácido nicotínico
- e) Alcaloides derivados de histidina

Todas las diferentes y diversas estructuras químicas de los alcaloides hacen posible que estos compuestos presenten un extenso abanico de actividades farmacológicas, como: actividad sobre el sistema nervioso central, la morfina que se aísla de las cápsulas de adormidera y de opio causa depresión del SNC funcionando como analgésico, por el contrario, la cafeína excita el SNC; las hojas de jaborandi tienen actividad sobre el sistema nervioso autónomo, tiene propiedades parasimpaticolíticas, la atropina de las hojas de belladona tiene actividad anticolinérgica, la efedrina de la efedra es útil como vaso constrictor en caso de asma, la cocaína de las hojas de coca puede causar anestesia local, la quinidina de la corteza de quina tiene propiedades antiarrítmicas, alcaloides como vincristina o vinblastina tienen actividad antitumoral; hay algunos que son tóxicos como la aconitina de la raíz de acónito, la conina de la cicuta, alcaloide pirrolizidínicos del género *Senecio* con hepatotoxicidad. Los alcaloides suelen usarse en cantidades dosificadas debido a su marcada acción en el organismo (Sreevidya y Mehrotra, 2003).

La cuantificación de alcaloides se basa en el método de Shamsa et al. (2008), el cual consiste en hacer reaccionar los alcaloides, que tienen nitrógeno en su estructura interna, con el verde de bromocresol (BCG) y su capacidad de estabilizarse al momento de entrar en contacto con un medio ácido (de 4-5 pH), al



encontrarse en este se torna de coloración azul a amarillo, debido a la pérdida de protones, esto permite que ocurra la precipitación de los alcaloides, para que después se de paso a los lavados con cloroformo para arrastrar el BCG con los alcaloides, haciendo posible su extracción para la cuantificación por espectrofotometría.

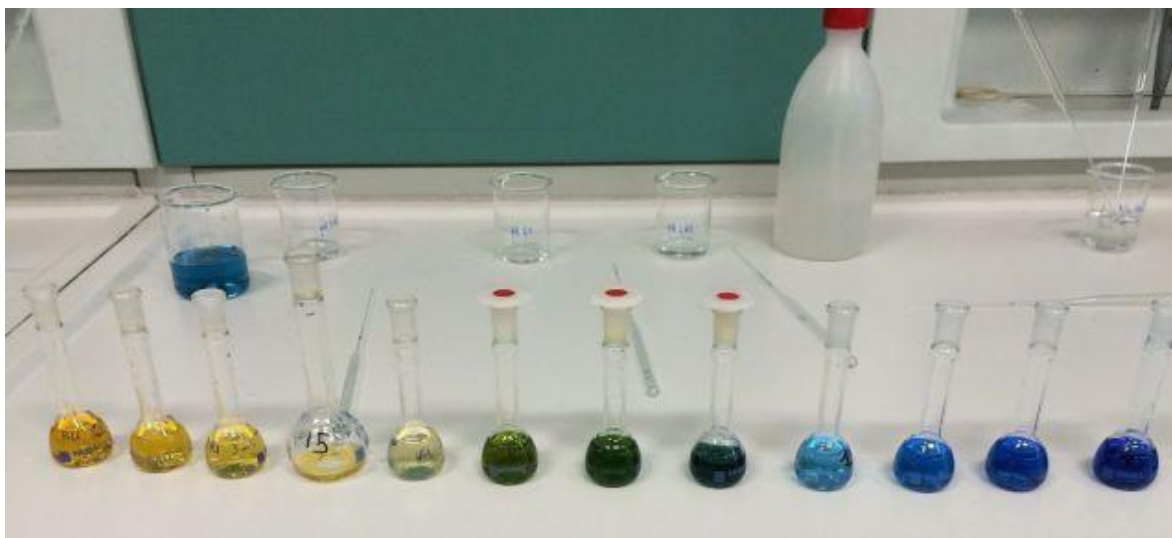


Figura 25. Cambio de color durante la reacción de alcaloides con verde de bromocresol. Fuente: Imagen obtenida de: <https://100cia.site/index.php/quimica/item/8231-como-hacer-verde-de-bromocresol>

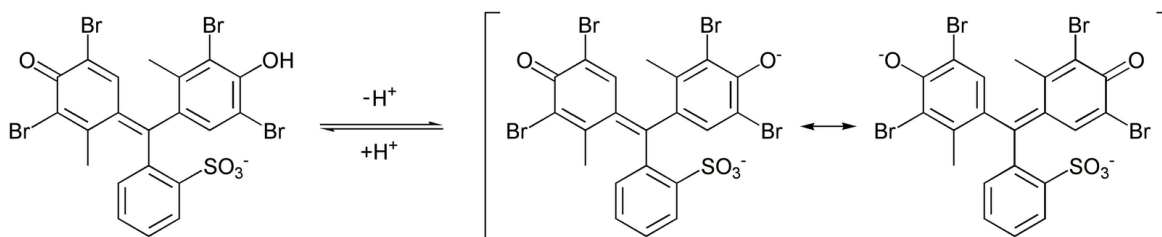


Figura 26. Reacción de alcaloides con el reactivo Verde de Bromocresol. Fuente: Imagen obtenida de [https://es.wikipedia.org/wiki/Verde\\_de\\_bromocresol](https://es.wikipedia.org/wiki/Verde_de_bromocresol)

Para realizar este método se prepara una solución de Verde de Bromocresol, con 69.8 mg de este colorante disueltos en 3 mL de una solución de hidróxido de sodio (NaOH al 2N). Cuando esté disuelto, se añaden 5 mL más de agua destilada, se debe calentar para terminar de disolver completamente el colorante, cuando se haya logrado se procede a aforar a un litro con agua destilada; de la solución final sólo se utilizarán 20 mL para realizar el experimento.

Además, se prepara un Buffer de fosfato (2M) con 21.6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en un litro de agua destilada, se ajusta el pH a 4.7 con una solución de ácido cítrico, en

proporciones de 42.02 g para un litro de solución. Con un potenciómetro se ajusta el pH hasta 4.7; de esta solución se ocuparán 20 mL para la prueba.

Para el estándar de atropina para la curva patrón, se hace una solución de 1 mg de atropina en 10 mL, sin embargo, sólo se usarán 0.4 mg/mL, se preparará más de lo necesario debido a que no se puede pesar en una balanza analítica la cantidad que sólo se requiere para esta prueba.

Stock del problema, de la muestra problema se toman 9 mg y se diluyen en 4.5 mL de agua destilada, de este se toma una alícuota de 1.5 mL que llevara 2.5 mg del extracto, esto se hace por triplicado.

Una vez que se prepararon los tubos para la curva patrón de atropina, se procede a colocar las siguientes cantidades:

mL de stock	Atropina (mg)	Buffer fosfato (4.7 pH) mL	Verde de bromocresol mL
0.2	0.02	2.5	2.5
0.3	0.03	2.5	2.5
0.4	0.04	2.5	2.5
0.5	0.05	2.5	2.5
0.6	0.06	2.5	2.5
0.8	0.08	2.5	2.5
1.0	0.1	2.5	2.5

Figura 27. Tabla para las concentraciones de la prueba de alcaloides.  
Fuente: Imagen obtenida de Nava, 2017.

Después de tener los tubos preparados, se procede a realizar los lavados con cloroformo, con concentraciones crecientes (0.5, 1, 1.5 y 2 mL), con ayuda de un agitador automático se mezcla cada lavado, para arrastrar la mayor cantidad posible de alcaloides, se empezará a formar un precipitado amarillento, que se debe recolectar, hasta después del segundo lavado, con una pipeta Pasteur para trasladarlo a otro tubo.

En cuanto a la interpretación de resultados, se lee en un espectrofotómetro las concentraciones de atropina y del tubo problema a 470 nm. Se hace un análisis de regresión lineal con los datos obtenidos de la curva patrón y se interpola con los

datos de la muestra, se reporta como mg equivalentes de atropina por gramo de extracto (eA mg/g) (Nava, 2017).

El siguiente método es propuesto por Sreevidya y Mehrotra (2003) y también sirve para la cuantificación de alcaloides, en este caso para obtener el extracto vegetal se hace por medio de una destilación de Soxhlet durante 2 horas, luego se concentra el extracto por medio de un rotavapor, cuando se haya recolectado el extracto se le van a agregar 10 mL de hidróxido de potasio en etanol al 10% y después se afora con etanol a 100 mL. El extracto vegetal se le hace reaccionar con el reactivo de Dragendorff, que formará un complejo de bismuto unido al alcaloide, este debe estar a un pH de 7.4 el cual se ajusta con ácido clorhídrico, se procede a centrifugar las muestras para obtener los diferentes precipitados, los cuales se van a lavar con alcohol y se van a centrifugar para decantar el sobrenadante, al final se obtiene el precipitado y se trata con 2 mililitros de sulfuro disódico, que va a causar el desprendimiento del bismuto con el alcaloide y se verá como un precipitado negro marrón, el cual se va a disolver con 2 mL de ácido nítrico para que el bismuto sea lixiviado, posteriormente se hace reaccionar con urea para producir un complejo de color amarillo que puede ser cuantificado espectrofotométricamente a 435 nm. No se recomienda llevar a cabo esta técnica para la cuantificación de alcaloides puesto que en un inicio el sólo preparar el reactivo de Dragendorff demanda mucho tiempo y varios reactivos, que sólo usar el verde de bromocresol por el método del Shamsa et al. 2008, además el procedimiento llega a ser un poco más largo debido a que se utiliza el sulfuro disódico, ácido nítrico y urea para poder proceder a leer a las absorbancias mientras que en la técnica que en este escrito se recomienda, sólo se necesita agregar posteriormente en el buffer de fosfato y el cloroformo para hacer los lavados y obtener los alcaloides, además que para el extracto se necesita emplear otra técnica: la destilación de Soxhlet que requiere de mucho tiempo y material, lo cual, en general, indica un gasto de tiempo y dinero mayor que si se emplea el método de Shamsa et al., 2008.

### **Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH•)**

Un antioxidante es cualquier sustancia que puede retrasar o prevenir la oxidación de un compuesto oxidable, aun cuando su concentración es menor a la del sustrato, pueden ser enzimáticos, no enzimáticos o proteínas de unión, incluso pueden actuar en sinergismo para neutralizar alguna fuente de especies reactivas de oxígeno, de tal forma que hacen una red de antioxidantes, estos compuestos son estudiados a nivel químico-biológico por su función en el deterioro oxidativo (Mariaca et al., 2016). El proceso de óxido-reducción está asociado a los antioxidantes y se puede dividir en dos fases:

- 1) Oxidación donde se pierden electrones de hidrógeno
- 2) Reducción donde se ganan electrones de hidrógeno

El oxidante se verá reducido al reaccionar con la molécula que se oxida, estas reacciones suceden en el organismo humano, durante procesos celulares internos que conllevan a la aparición de algunas enfermedades crónicas causadas por los radicales libres, que son moléculas que tienen dentro de su estructura uno o más electrones no apareados, lo que causa que sean muy reactivos, su vida media es de micro segundos, pero es suficiente para su rápida propagación en moléculas aledañas y mayor daño, esa es la clave para formar otros radicales libres en cadena, se calcula que aproximadamente un radical libre puede afectar 1 millón de moléculas durante la reacción en cadena (Venegas-Casanova, 2012).

Serán las especies reactivas del oxígeno (ROS) los compuestos que forman los radicales libres, estos se pueden producir por contaminantes ambientales y radiaciones, se relaciona con el consumo o uso de sustancias tóxicas como el alcohol, tabaco, alimentación no adecuada, exposición de fertilizantes o pesticidas. El estrés oxidativo está ligado a este tema, ya que es el equilibrio entre la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno con los mecanismos antioxidantes (exógenos y endógenos) en células, disminuyendo la toxicidad y el daño por parte de estas moléculas tan reactivas, cuando el equilibrio se llega a corromper se puede deber a un déficit en el sistema antioxidante o la descontrolada proliferación de los radicales libres, para evitar estas situaciones hay dos vías

fundamentales: endógena y exógena, que protegen al organismo y su interacción puede ser intracelular o extracelular (Coronado et al, 2015).

En 1956, Denham Harman planteó una relación entre los radicales libres y el envejecimiento, señaló que los efectos del proceso oxidativo pueden disminuir la expectativa de vida, ya que se puede alterar la membrana o el ADN mitocondrial de las células, produciendo a su vez más ROS y más daño al perder el equilibrio, llevando a la destrucción celular; los antioxidantes pueden propiciar una menor degradación de las mitocondrias y, por tanto, al metabolismo celular y consumo de oxígeno, además de disminuir los procesos de oxidación pueden actuar como vasoprotectores, antitrombóticos o antiescleróticos.

En la diabetes los mecanismos antioxidantes se relacionan con la inhibición de la digestión de carbohidratos y la estimulación de secreción de insulina, la metformina es un poderoso antioxidante que se usa en el tratamiento de pacientes diabéticos ya que disminuye la formación de radicales libres. En el cáncer, las lesiones precancerosas están relacionadas con el estrés oxidativo, el cual se podría controlar con ayuda de los antioxidantes (Coronado et al, 2015).

Entre los antioxidantes encontramos a los flavonoides, los cuales incluyen a las antocianidinas, catequinas e isoflavonoides, se recomienda que la ingesta de estos sea de 20-26 mg al día y se encuentran en el té verde, vino, manzana y peras; otro tipo son los taninos, que son útiles para la industria alimentaria y de cosméticos; la vitamina E es uno de los más consumidos y se encuentra en el aguacate, aceite de oliva, arroz integral y frutas secas; el antioxidante más conocido es la vitamina C encontrada en acelgas, tomates, todos los cítricos, kiwi y fresa; también están los  $\beta$ -carotenos presentes en zanahorias, espinacas, mango y melón. Otra fuente de antioxidantes (procianidinas, antocianinas y flavononas) es el cacao y sus productos ricos en catequinas (Ramos, 2016).

Para poder evaluar la actividad antioxidante de algún compuesto se pueden realizar diferentes pruebas como el ensayo de captación de peróxido de hidrógeno de Ruch et al (1989), el  $H_2O_2$  puede ingresar al cuerpo humano por inhalación o por la piel y ojos, se descompone rápidamente en oxígeno y agua, pero durante su degradación puede producir radicales hidroxilos que inician una peroxidación lipídica y dañan el

ADN, esta prueba se sustenta en la capacidad del extracto o muestra a probar para eliminar el peróxido de hidrógeno, para esto se prepara una solución de peróxido de hidrógeno (40 mM) en una solución tampón de fosfato (50 mM, pH 7.4), se hacen concentraciones del extracto de 20-60 µg/mL y se le añade el peróxido, después de 10 minutos se determina a una absorción de 230 nm en un espectrofotómetro para determinar la concentración de antioxidantes por medio del porcentaje de captación de peróxido de hidrógeno.

Otra prueba es el método de capacidad antioxidante equivalente (TEAC) de Trolox, ensayo de decoloración de cationes radicales ABTS. En esta técnica se utiliza un espectrofotómetro de diodos, a diferencia de los anteriores, aquí el antioxidante va a reducir ABTS<sup>+</sup>, de color azul-verde y que no está presente en los humanos, a ABTS, este compuesto se prepara con los iones de dióxido de magnesio (80mg) a 5 mM en una solución acuosa de ABTS (20 mL, usando un buffer de Na/K a 75 mM y pH de 7), el Trolox puede ser usado como el estándar antioxidante y se construyen concentraciones de 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 y 350 µM, a cada concentración se le añaden 200 µL de ABTS<sup>+</sup> en una placa de elisa y se lee la absorbancia a 750nm después de 5 minutos, los valores de TEAC se calculan a partir de la curva estándar de Trolox y se expresa el resultado en equivalentes de Trolox mM, este tiene la ventaja de ser aplicable para antioxidantes hidrófilos y lipófilos (Md.N. Alam et al., 2013).

Sin embargo, la actividad antioxidante no debe concluirse basándose en sólo un modelo de prueba, lo más adecuado es que se llevaran a cabo varios debido a que los métodos varían en diferentes aspectos y resulta difícil comparar uno con otro, incluso si existe la posibilidad, se debería realizar una técnica *in vitro e in vivo*. Pero debido a su sencillez (no implica muchos pasos y reactivos), rapidez, accesibilidad y costo, en comparación con los otros modelos, se recomienda la técnica de DPPH para la actividad antioxidante *in vitro*, ya que el 2,2-difenil-1-picrilhidracil es un radical libre estable, en virtud de la deslocalización del electrón libre sobre la molécula completa, de modo que el compuesto no se dimeriza a comparación de otros radicales libres. Además la deslocalización del electrón provoca el color violeta, cuando la solución de DPPH se mezcla con un sustrato capaz de donar un

átomo, entonces éste toma su forma reducida (DPPH-H o DPPH-R), pierde el color violeta y vira a amarillo (Nava, 2017). Este método fue propuesto por Blois, en 1958, donde demostró la capacidad del radical libre DPPH para aceptar un átomo de hidrógeno que provenía de una molécula de cisteína, se mide de acuerdo a la capacidad captadora de radicales libres de los antioxidantes, el DPPH en solución etanólica tiene una absorción a 520 nm y cuando entra en contacto con un compuesto antioxidante su absorción cambiará a 517 nm, la diferencia de absorbancias permite obtener el porcentaje de captación de radicales DPPH.

La CA<sub>50</sub> es la concentración necesaria para obtener el 50% de DPPH reducido, proporciona un índice para estimar la capacidad de un compuesto para atrapar radicales y explica su actividad como antirradical se ejemplifica con la siguiente ecuación:

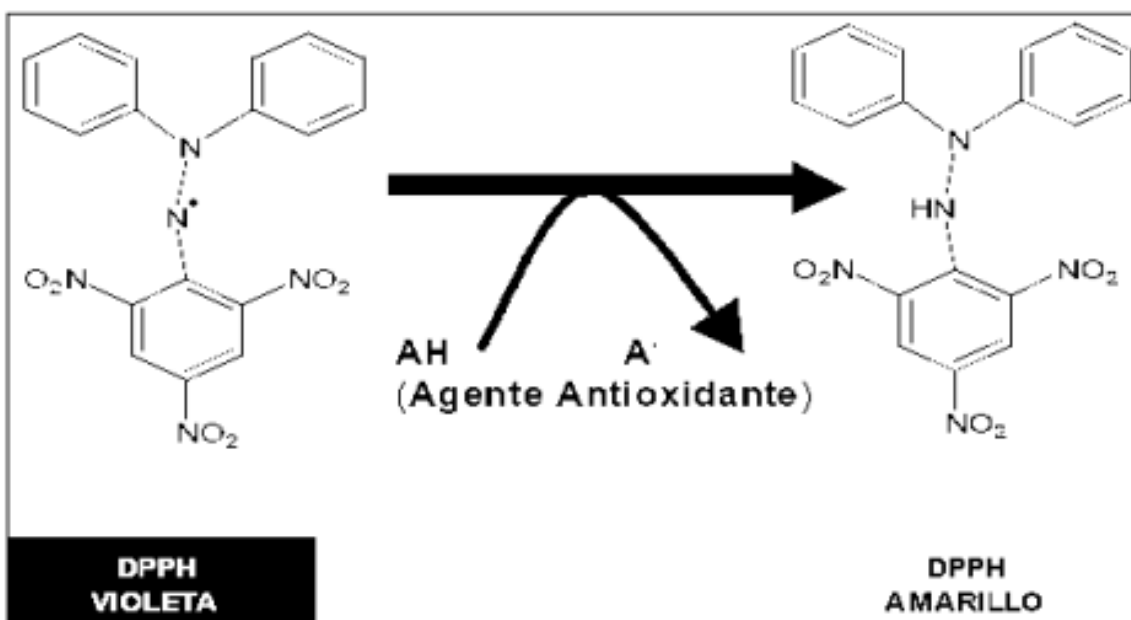


Figura 28. Método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH\*).  
Fuente: Imagen obtenida de Venegas E., 2012.

AH es el antioxidante que dona los átomos de hidrógeno, estabilizando de esta forma los radicales e interrumpiendo la reacción en cadena. El radical A• puede interactuar con otro radical y formar moléculas estables DPPH-A y A-A (Nava, 2017).

De acuerdo con Okusa et al (2007) y Nava (2017) se propone la siguiente técnica: Inicialmente se prepara una solución de DPPH con 2 mg de este reactivo en 50 mL

de MeOH de grado HPLC. Para el ensayo se diluyen 7 mg del extracto y se disuelven en 7 mL de MeOH de grado HPLC, de esta solución se toman 20  $\mu$ L y se les adicionan 180  $\mu$ L de MeOH para obtener un volumen final de 200  $\mu$ L, este nuevo stock se utiliza para las concentraciones 1, 2, 3 y 4 ppm.

[ ] ppm	$\mu$ L stock	$\mu$ L de MeOH
1	10	990
2	20	980
3	30	970
4	40	960

Figura 29. Tabla para las primeras concentraciones de la prueba de actividad antioxidante. Fuente: Imagen obtenida de Nava, 2017.

Del stock 7 mg en 7 mL de MeOH, se toma:

[ ] ppm	$\mu$ L stock	$\mu$ L de MeOH
5	5	995
6	6	994
7	7	993
8	8	992
9	9	991
10	10	990
20	20	980
30	30	970
40	40	960
50	50	950
60	60	940
70	70	930
80	80	920
90	90	910
100	100	900
150	150	850
200	200	800
250	250	750
300	300	700
400	400	600
500	500	500
600	600	400
700	700	300
800	800	200
900	900	100
1000	1000	0

Figura 30. Tabla de concentraciones para la prueba de actividad antioxidante. Fuente: Imagen obtenida de Nava, 2017.



Para el blanco se utilizan 200 µL de metanol y para medir la absorbancia del DPPH disuelto en MeOH de grado HPLC, se ocupan 200 µL de la solución de DPPH.

En una placa de ELISA se adicionan 50 µL de cada concentración de la solución problema, del blanco y de la solución de DPPH por triplicado, a los pozos que contienen el extracto se les agrega 150 µL de la solución metanólica de DPPH; se protege de la luz con ayuda de papel aluminio y se incuba a 37°C por 30 minutos. Después se procede a determinar la absorbancia a 540 nm, en un lector de ELISA.

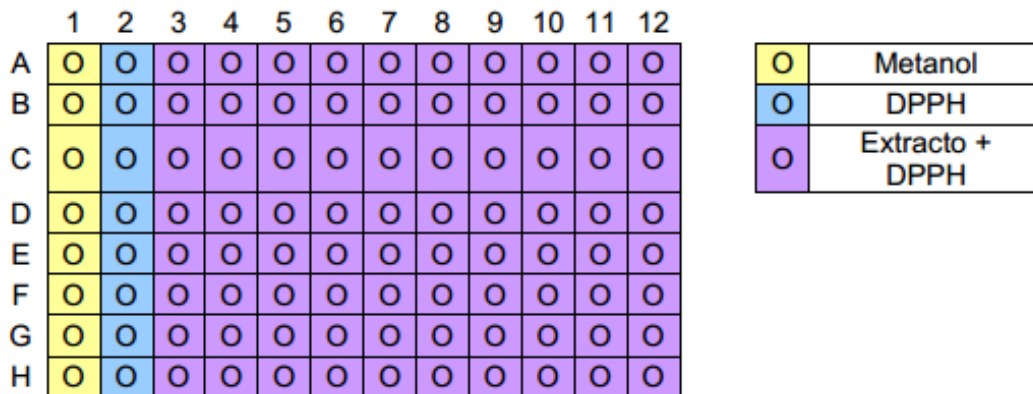


Figura 31. . Modelo de placa DPPH. Fuente: Imagen tomada de Ramos Castro, 2016.

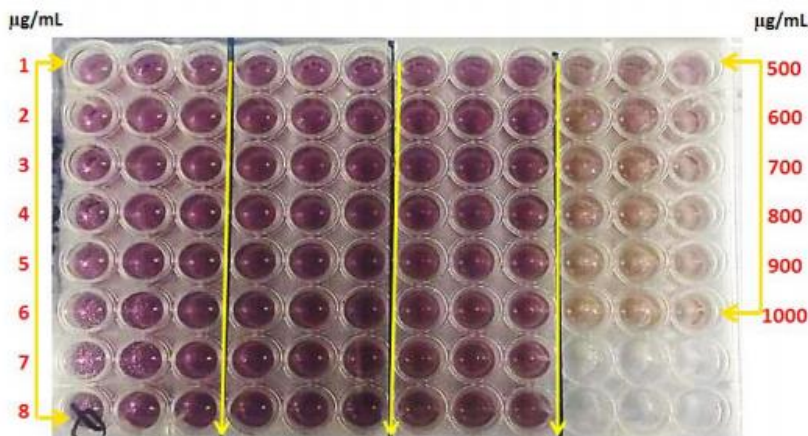


Figura 32. Reacción del DPPH con el extracto a diferentes concentraciones; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 µg/mL.. Fuente: Imagen obtenida de Moreno Guzmán, 2019.

Los resultados se reportan obteniendo el porcentaje de reducción a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{Reducción de DPPH} = (C - E / C) * 100$$

C= Absorbancia del DPPH en MeOH

E= Absorbancia experimental (solución problema con mezcla de DPPH)

Se obtiene la CA<sub>50</sub> (50% de reducción de DPPH) y se estima la capacidad de un compuesto para atrapar radicales y explica su actividad como antirradical.

## **Cromatografía**

La cromatografía fue descubierta por Ruso M. Tswett, en 1906, colocó un extracto de pigmentos vegetales en la parte superior de una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio, cuando adicionó éter, notó que la mezcla original se separaba en bandas de diferentes colores que descendían por la columna a diferentes velocidades y tiempos. La característica principal de una cromatografía es que se compone por una fase estacionaria, que permanece inmóvil, y la fase móvil, que se desplaza por la estacionaria y se va separando según las diferentes sustancias que la compongan y su afinidad por las moléculas que componen la fase estacionaria, los componentes afines o más similares a esta fase avanzan más lento, ya que establecen interacciones con los compuestos de la fase estacionaria, mientras que los que no llegan a interactuar con esas moléculas saldrán con mayor rapidez; por tanto, se puede decir que el medio cromatográfico será un regulador de la velocidad de cada sustancia.

Las cromatografías suelen clasificarse de acuerdo con el estado físico de la fase móvil:

- 1) Cromatografía líquida: la fase móvil es un disolvente o una disolución, la fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido inmiscible con la móvil depositado en la superficie de un sólido. Puede realizarse en columna, donde la fase estacionaria está relleno un tubo, capa delgada, la cual se dispersa sobre una lámina de vidrio o aluminio con un espesor uniforme, o en papel, que tiene una solución acuosa contenida en las fibras de celulosa (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007).
- 2) Cromatografía de gases: fase móvil es un gas inerte (hidrógeno o helio), la fase estacionaria puede ser sólida o líquida y siempre estará contenida en una columna, ya que sólo así se puede mantener fluyendo la móvil, las columnas se conocen como capilares y proporcionan mayor capacidad de separación (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007).

También se pueden clasificar de acuerdo con el mecanismo de retención:

- 1) Adsorción (normal, de fase reversa)
- 2) Partición de líquido-líquido
- 3) Intercambio iónico
- 4) Permeación sobre gel
- 5) De afinidad

Esta técnica de separación se emplea para el análisis de drogas y fármacos en fluidos biológicos, seguir la transformación de las sustancias responsables de la transmisión neurológica, determinar la presencia de contaminantes ambientales o la composición de los combustibles fósiles y realizar el control y calidad de los productos químicos y farmacéuticos (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007).

### ***Cromatografía en papel***

Es un proceso sencillo para realizar análisis cualitativos, a pesar de no ser una técnica potente la ventaja es que no requiere de ningún equipamiento especializado. La fase estacionaria es una tira de papel filtro, la muestra se coloca en un extremo, el disolvente empleado como fase móvil se hace ascender por capilaridad y la separación se realiza en función de la afinidad de los solutos con las dos fases, generalmente las más solubles en agua se quedan cerca del punto de aplicación y las menos solubles en agua llegarán más lejos, las sustancias separadas se identifican por procedimientos físicos o químicos. Se fundamenta en que las sustancias problema tienen diferentes coeficientes de reparto, para poder apreciar los coeficientes se utilizan reveladores que se aplican sobre el cromatograma que permiten apreciar cuanto recorrió la muestra, los reveladores son especiales para cada compuesto, el vapor de yodo sublimado es el universal, pero también encontramos otros como el reactivo de ninhidrina para aminoácidos, NaOH 5.0% en etanol y AgNO<sub>3</sub> 0.002% en acetona para carbohidratos, existen otros reveladores que necesitan de luz UV, los compuestos absorben la radiación y se ven fluorescentes, pero no se pueden usar reveladores que destruyan el papel como el ácido sulfúrico o el calor (Ramos, 2016).

### ***Cromatografía en capa fina***

Se basa en la preparación de una capa uniforme de un adsorbente, placas de vidrio, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, uno para aplicar la capa absorbente y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas. La fase móvil es líquida mientras que la estacionaria es sólida, generalmente es polar de forma que los compuestos que se desplazan con mayor velocidad son los menos polares. Es simple y precisa, la separación es mejor y el tiempo es menor que una cromatografía en columna o papel, además pueden usarse reveladores corrosivos, los resultados son fácilmente reproducibles, pero no se pueden utilizar compuestos muy volátiles y con trazas de metales, las manchas reveladas desaparecen con el tiempo por eso se deben señalar, para poder reconocer las manchas se emplean diferentes tipos de reveladores dependiendo del compuesto a estudiar, para fenoles y terpenoides se usa una solución de vainillina-ácido sulfúrico (1-5%), para complejos orgánicos se puede usar el ácido sulfúrico en solitario y se observa como manchas negras, para aldehídos y cetonas se usa 2,4 – dinitrofenilhidracina (base de Shift), para ácidos carboxílicos se emplea el verde de bromocresol, en aminas el paradimetil aminobenzaldehído, en aminoácidos la ninhidrina (igual que en cromatografía en papel) y en alcaloides se puede usar el reactivo de Dragendorff (Ramos, 2016).

Polaridad	Orden de Elución	Tipo de compuesto
Menor	Menor retención	Alcanos Alquenos
		Esteres
		Derivados halogenados
		Aldehídos y cetonas
		Esteres
		Aminas
		Alcoholes
		Fenoles
Mayor	Mayor retención	Ácidos carboxílicos

Figura 33. Elución de compuestos en cromatografía de acuerdo a polaridad. Fuente: Imagen tomada de Ramos Castro, 2016.

### ***Cromatografía de intercambio iónico***

Se lleva a cabo en empaques de columna que tienen grupos funcionales cargados unidos a una matriz polimérica, el mecanismo de retención más común es el intercambio simple de los iones de la muestra y de la fase móvil con el grupo cargado de la estacionaria. Los empaques pueden ser cargados negativamente, para intercambiar especies catiónicas, o positivamente, donde el intercambio es con especies aniónicas. Los empaques pueden ser de tipo pelicular con un recubrimiento de resina, con microesferas de sílice en el que se impregna o enlaza un intercambiador de iones. Las diferencias de retención están gobernadas por las propiedades físicas de los iones (Ramos, 2016).

### ***Cromatografía de afinidad***

En ésta se pueden separar las proteínas en función de su especificidad a los ligandos, que son moléculas poliméricas que sirven de soporte, ya que están unidas covalentemente sobre la columna cromatográfica o matriz inerte que debe tener una estructura de poro y estabilidad ante los cambios de pH, detergentes y agentes disociantes, para retener y adsorber las proteínas; la fase estacionaria es sólida y los ligandos se clasifican según su naturaleza química o selectividad para la retención de analitos, cuando se introduce una proteína no específica se eluye rápidamente; este tipo de cromatografía tiene la ventaja de ser altamente selectiva para la retención de proteínas afines a la columna, para esto se emplea poca presión, columnas cortas y un campo restringido para la separación (Ramos, 2016).

### ***Electroforesis***

Consiste en depositar sobre un medio poroso una mezcla de especies cargadas y mediante la aplicación de un campo eléctrico entre los extremos del soporte poroso las especies se separan en función de sus cargas y movilidad iónica en ese medio. Cuanto más elevado sea el voltaje y la intensidad menos tiempo tardará en separar, sin embargo, si se elevan demasiado los valores de estas variables se aumenta la temperatura, la evaporación del disolvente y la acumulación de sales del amortiguador. Para facilitar el paso de la corriente eléctrica se usan disoluciones conductoras, en las que se empapa el soporte poroso para que no formen precipitados con las especies problema. La técnica tiene un gran poder de

resolución, además se han desarrollado métodos para llevar a cabo la electroforesis en moléculas neutras no iónicas, además se pueden detectar las zonas de analitos separados como en la de columna, sin embargo, es inconveniente utilizarla ya que la muestra debe ser en microlitros y con volúmenes tan pequeños hay pocos métodos de detección de compuestos eficaces (Ríos Herrera, 2012).

Las cromatografías descritas anteriormente tienen la ventaja de que sirven muy bien para la separación de materias orgánicas complejas, no requieren grandes cantidades de muestra para su análisis e identificación de los compuestos, son sencillas y baratas a comparación de una cromatografía de gases o de líquidos de alta resolución, ya que estas emplean equipos especializados de alto costo y el manejo de la técnica demanda de personas con conocimiento en manejo de los instrumentos. Otras ventajas que ofrecen las cromatografías descritas es que los resultados pueden ser fácilmente reproducibles, en algunas se pueden usar reveladores corrosivos, la fase estacionaria suele tener una gran estabilidad y las columnas son cortas.

Por otro lado, el tiempo para conseguir la separación de los compuestos de la muestra, en algunas ocasiones, es muy largo, los disolventes tienen diferentes puntos de volatilidad dependiendo de los factores atmosféricos, obligando a modificar las técnicas y, en ocasiones, a ocupar una mayor cantidad de solventes de lo que se tenía contemplado, para lograr terminar la técnica con los resultados deseables. Además, se llegan a requerir de disolventes peligrosos para la salud o el medio ambiente, se producen muchos desechos que no pueden ser tratados o manejados con facilidad para su degradación. A pesar de que suelen ser técnicas con gran sensibilidad y eficacia para la separación de las muestras, en muchos casos se dificulta la parte de la identificación de los compuestos, ya que hay algunos que se pueden comportar de forma similar en las mismas condiciones del cromatograma, es decir pueden tener el mismo tiempo de retención o incluso pueden ser muy similares las bandas de un compuesto y otro en una electroforesis, llevando a una identificación errónea, es por esto la principal razón por la que en este trabajo se recomienda realizar una cromatografía de gases y otra de líquidos acopladas a un espectrómetro de masas y otra HPLC acoplada a detector de

diodos, que en los siguientes apéndices se describen en extenso, ya que estas técnicas mencionadas además de realizar una poderosa separación de los compuestos de una muestra, pueden identificarlos casi de manera inequívoca gracias a los detectores y la información que se guarda para poder analizarlos con ayuda de bases de datos que contienen este tipo de datos, incluso si se desea se puede comprobar la pureza de alguna muestra o si la separación ha sido completa; claro está que sólo se recomiendan esas técnicas cuando se tenga el equipo, instrumentos y materiales necesarios, igual que el personal capacitado con las habilidades y conocimientos para la realización correcta de la técnica.

## **Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas GC-MS**

La cromatografía de gases se emplea para la separación de compuestos orgánicos e inorgánicos térmicamente estables y volátiles, con ayuda de detectores versátiles y específicos para la identificación (García-Romero, 2002), que se acoplan al cromatógrafo, amplían la utilidad de esta técnica. Se compone de cinco componentes:

- 1) Fase móvil: gas transportador con flujo constante
- 2) Introducción de vapores de la muestra a la fase móvil
- 3) Fase estacionaria con longitud apropiada
- 4) Temperatura apropiada
- 5) Detector que registrara los componentes de la muestra mientras eluyen

Esta técnica permite el análisis rápido y exacto de gases o vapores, permite identificar los componentes volátiles individuales de las mezclas gaseosas de puntos de ebullición de 350°-400° C, es sensible y sencillo si se sabe manejar con cuidado, puede suministrar información cuantitativa exacta con cantidades pequeñas de muestra (Gutiérrez y Droguet, 2002), la instrumentación requerida para esta cromatografía es más sencilla y económica que la empleada en HPLC; pero se ve limitada a los siguientes casos:

- a) Compuestos poco volátiles, generalmente con peso superior a 300 u.m.a.
- b) Compuestos sensibles a una elevación de la temperatura (incluso moderada).
- c) Compuestos que se encuentran de forma iónica, generalmente son poco volátiles.

Los compuestos mencionados anteriormente se recomiendan tratar con la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La GC se emplea para confirmar la presencia o ausencia de un compuesto en una muestra, pero si se emplea con la espectrometría de masas puede servir para la cuantificación de iones generados (TIC), que detecta todos los iones, o para detectar iones con masa determinada (SIR), que se aplica para identificar 1-3 compuestos específicos de la muestra (Gutiérrez y Droguet, 2002).



La fase móvil del cromatograma es un gas inerte, generalmente helio, a esta se le inyecta la muestra, puede ser por 1) Split, que vaporiza la muestra en una cámara diseñada para ello, luego envía una pequeña fracción a la fase estacionaria (columna). 2) Split-less, que es similar al Split, la diferencia es que este método dirige toda la muestra a la columna, por lo que es adecuado para el análisis de trazas o componentes muy volátiles. 3) On column se lleva a cabo en frío, elimina la etapa de vaporización que puede descomponer los compuestos termolábiles (Gutiérrez y Droguet, 2002).

La fase móvil y la muestra se hacen pasar a través de la fase estacionaria que se encuentra en una columna, las más empleadas son las columnas capilares, se encuentran dentro de un horno con programación de temperatura y su función es la separación de los compuestos de acuerdo a la afinidad de estos a la fase estacionaria, los componentes fuertemente retenidos se moverán lentamente, mientras que los que tengan interacciones débiles se desplazarán rápidamente. La presión de vapor es clave para la separación, a mayor presión menor tiempo de retención y por tanto de separación (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Los compuestos individuales aislados pasan inmediatamente al espectrómetro de masas (MS), donde se hace una ionización a los componentes de la muestra, el más frecuente es el impacto electrónico que bombardea a las moléculas con electrones de una cierta energía, capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas. Moléculas ionizadas o iones moleculares también forman iones fragmento por el exceso de energía, el tipo y la proporción de estos es característico de cada compuesto y de las condiciones del proceso de ionización. Una vez ionizadas todas las partículas, se hacen pasar por el sistema colector mediante campos eléctricos o magnéticos, la velocidad alcanzada por cada ión depende de su masa; se va registrando el espectro de masas de la muestra, cada espectro es diferente para cada compuesto químico y constituye su identificación, si no se hiciera primero la separación se verían todos los espectros superpuestos, se puede almacenar en la memoria de algún ordenador para compararse con los espectros de una colección y hacer su identificación, averiguar su naturaleza, origen y si se ha separado completamente (Ramos, 2016).

En esta técnica, el MS puede actuar como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o TIC (total ion current), la corriente iónica generada por los iones genera un pico en el cromatograma, como una campana de Gauss, su área es proporcional a la concentración del compuesto detectado. Estos acoplamientos reúnen las ventajas de una poderosa técnica de separación con una de identificación, tiene una gran resolución y sensibilidad, demanda poco tiempo, es sencilla y se pueden obtener datos cualitativos y cuantitativos (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007).

Sin embargo, aproximadamente sólo el 20% de los compuestos conocidos se pueden analizar por GC, ya que no son lo suficientemente volátiles para pasar a la columna debido a su inestabilidad, se descomponen en las condiciones de separación, ya que es una técnica que solo manipula muestras volátiles, es por esta razón que se procede a hacer una HPLC para compensar los compuestos que no se logran identificar en esta técnica (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007).

Para esta técnica, se da un ejemplo de los datos que se deben considerar para realizar un análisis (Nava, 2017):

- 1) Cromatógrafo de gases modelo 6850.
- 2) Columna RTX 30m de largo por 0.25 mm de diámetro interno y 25 micras de película.
- 3) Temperatura de inyector 250°C.
- 4) Inyección en Split, ratio:33.5:1, purga de flujo de split:29.9 mL /mn
- 5) Flujo de corrida 35 cm/seg
- 6) Temperatura inicial: 70°C, rampa de calentamiento: 15°C por minuto hasta alcanzar 290°C se mantiene por seis minutos
- 7) Tiempo de corrida: 26.67 min.
- 8) Línea de transferencia: 290°C
- 9) Espectrómetro de masas modelo 5975 C, marca Agilent Technologies: adquisición de datos: full scan, rango de masas: 35-600 m/z, temperatura de

la fuente del cuádruplo: 150°C, temperatura de la fuente de ionización: 230°C, impacto electrónico: energía de 70 Ev.

## ESPECTROMETRÍA DE MASAS / LC

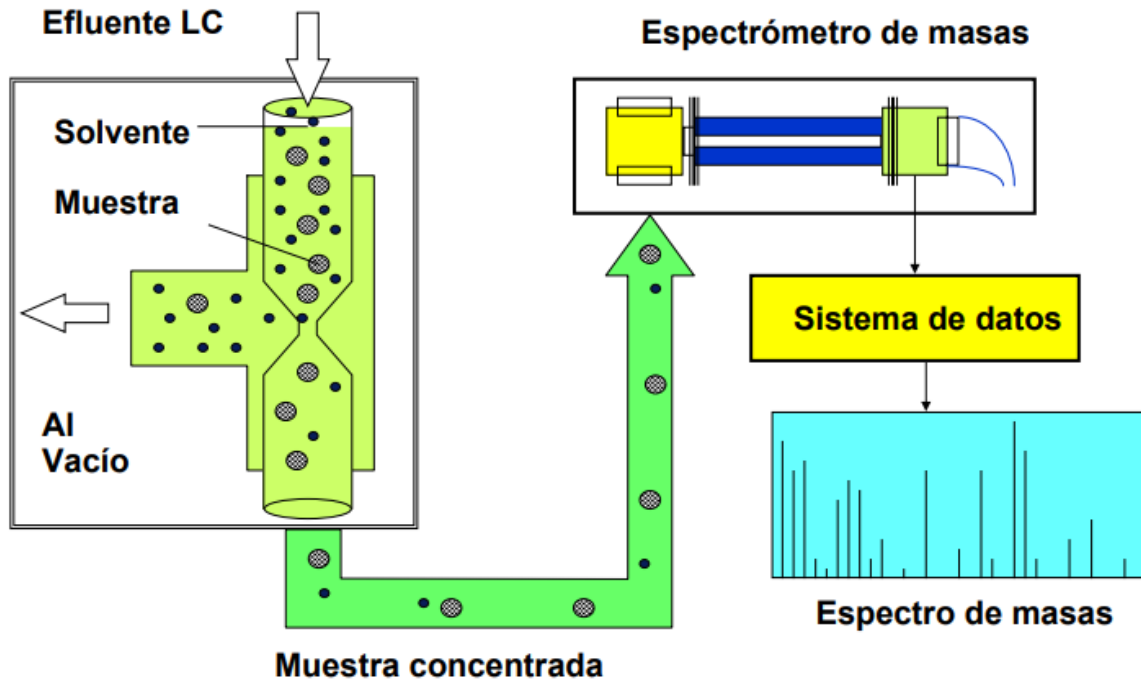


Figura 34. Componentes básicos de un sistema para de cromatografía de gases. Fuente: Imagen obtenida de Universidad Nacional Autónoma de México, 2007

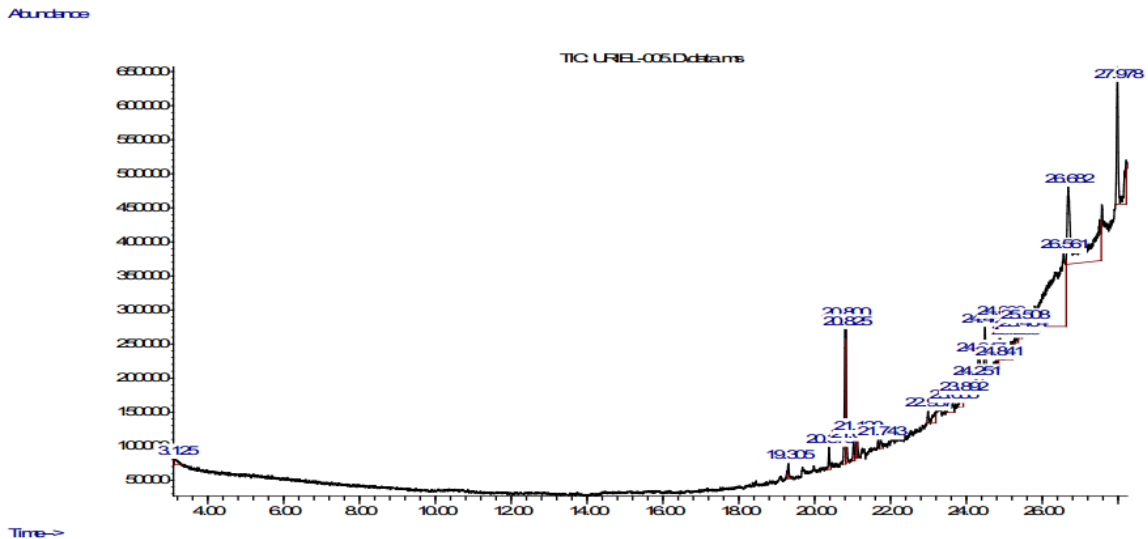


Figura 35. Cromatograma de la fracción metanólico del extracto de marzo de flores de *Prosopis laevigata*. Fuente: Imagen obtenida de: Nava, 2017.

## **Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas HPLC-MS**

Es un método físico de separación, que se basa en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles: una estacionaria y otra móvil. En la cromatografía líquida la fase móvil será un líquido que va a fluir a través de la columna de acero que va a contener la fase estacionaria, en esta técnica se aumenta la eficacia y sensibilidad por el tamaño de las partículas que pasan por la columna, ya que se reducen hasta los micrómetros. La separación se lleva a cabo por medio de una adsorción selectiva, con el disolvente utilizado como eluyente y de resultado se verá la retención de los diferentes compuestos de una solución (Nava, 2017).

La elección de la fase móvil es fundamental para el éxito de una cromatografía líquida, puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes, la importancia cae en que debe ser de grado HPLC con una pureza del 99%, dependiendo el equipo se puede programar la bomba para que tome las cantidades adecuadas de cada disolvente, se puede usar la misma concentración de disolventes durante toda la separación y a esta se le denominará de gradiente isocrático, pero también se pueden modificar las concentraciones de la fase móvil durante el análisis, ir aumentando y disminuyendo la cantidad de ciertos disolventes para mejorar la elución. Algunas fases móviles pueden ser químicamente activas como ácidos bases o líquidos corrosivos, es esencial que los componentes del sistema estén fabricados con materiales resistentes, los más usados son agua, disoluciones tampón acuosas y disolventes orgánicos (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007).

El sistema de bombeo debe generar presiones superiores a los 6000 PSI, capaces de cubrir un amplio rango de flujo entre punto 1 y 10 mL por minuto (Gross., 2011), debe ser construido por materiales inertes respecto a los disolventes empleados, existen tres tipos de bombas para HPLC:

1. Bombas recíprocas o de vaivén: son las más utilizadas y están formadas por una pequeña cámara cilíndrica que se llena y luego se vacía por oscilación

de un pistón, el bombeo produce un flujo pulsado que después de amortiguarse.

2. Bombas neumáticas o de presión constante: éstas hacen uso de la presión de un gas aplicado al recipiente contenido a la fase móvil, están limitadas para presiones relativamente bajas.
3. Bombas de desplazamiento o tipo jeringa: consisten en una cámara equipada con un mecanismo de tornillo, suministra un flujo libre de pulsaciones pero con una cantidad ilimitada.

Para una buena separación los volúmenes que se inyectan de la muestra deberán ser pequeños para evitar la sobrecarga de la columna. La bomba envía el disolvente hacia la válvula inyectora, que introduce al disolvente y la muestra en un volumen calibrado a la columna para que se produzca la separación, el papel del detector es indicar los momentos de aparición de los componentes y proporcionar datos cuantitativos y cualitativos de los mismos, por lo tanto deben tener sensibilidad elevada buena estabilidad y reproducibilidad, por medio de una señal eléctrica, proporcional cantidad de materia, se envía al registrador para ir formando un cromatograma en el cual lo ideal es obtener los picos gaussianos que corresponden a cada componente de la muestra (Nava, 2017). Posteriormente el integrador calcula el área de cada pico la cual se puede relacionar con la concentración del componente, si se tiene una curva patrón, si no se cuenta con ello sólo será un dato cualitativo; debido a que los detectores que se usan no son destructivos y por lo tanto es posible recuperar los productos que salen de esta técnica permitiendo de esta manera realizar otro tipo de separaciones. No es necesario el control estricto de la temperatura de la columna pero las separaciones resultan reproducibles cuando la temperatura se mantiene constante (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007).

Los componentes básicos para un sistema de HPLC son:

1. Depósitos para la fase móvil
2. Sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil
3. Sistema de inyección de muestras
4. Columna cromatográfica con la fase estacionaria

5. Termostatos para las
6. Detector
7. Sistema para el tratamiento de datos y registrador

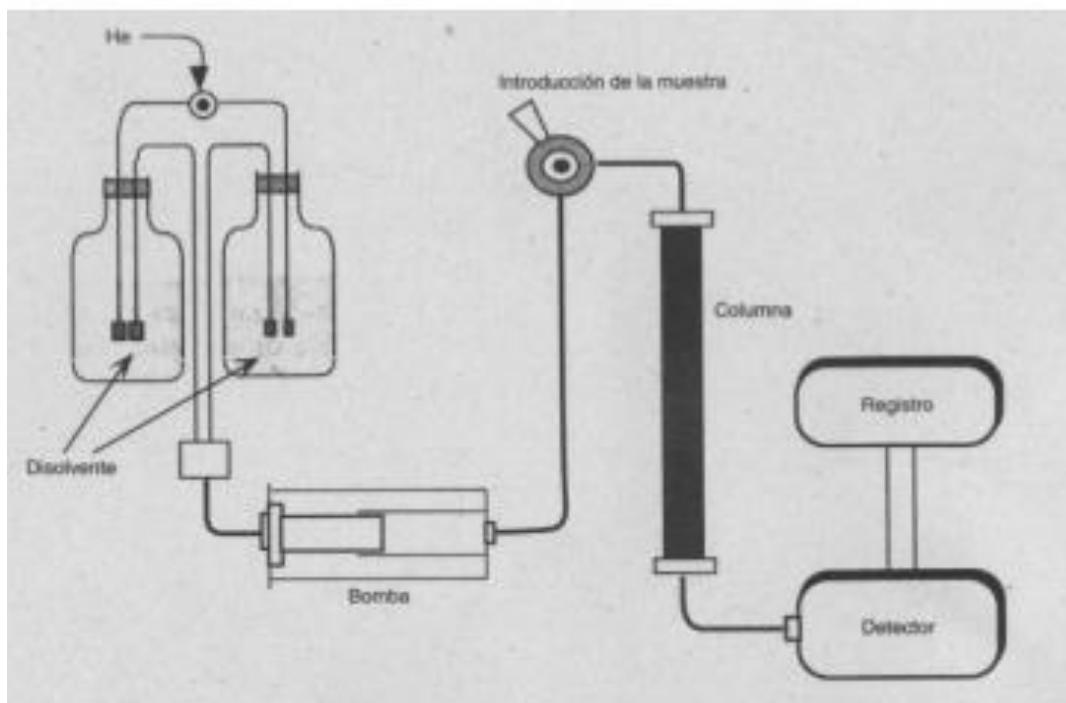


Figura 36. Componentes básicos de un sistema para HPLC. Fuente: Imagen obtenida de. *Hernández, 2002.*

Como detector se usará el espectrómetro de masas, este en solitario es una poderosa herramienta para la identificación de compuestos puros, sin embargo, la complejidad de los espectros de masas dificulta el análisis de mezclas, incluso simples, por ello se emplean acoplamientos de la técnica de cromatografía y espectrometría, ya que permiten reunir las ventajas de una técnica poderosa de separación con una de identificación, logrando registrar los espectros de masas lo largo de toda la separación cromatográfica, además de registrar casi inequívocamente los picos y comprobar su pureza, incluso se podría saber si la separación ha sido completa o si en algún momento ha habido una co-elución de dos compuestos. La desventaja de esta técnica es que los espectros dependen de la fase móvil y del potencial de ionización, el ion molecular forma fragmentos con el disolvente empleado en la fase móvil y por lo tanto no corresponde directamente al peso molecular, por lo cual es necesario inyectar soluciones patrón que contengan

los compuestos objetos del análisis en las mismas condiciones experimentales para conocer el espectro de masas característico del compuesto en cada caso (Nava, 2017).

El espectrómetro de masas recibe los compuestos separados de la cromatografía líquida y en éste se hace la ionización de los componentes recibidos mediante el impacto electrónico, que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía, causando la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y logrando ionizarlas, estas pasarán al sistema colector mediante campos eléctricos o magnéticos, donde la velocidad de cada ion va a depender de su masa y se irá registrando el espectro de masas de la muestra. El espectrómetro de masas puede funcionar como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica formando un pico en el cromatograma, también conocidos como picos gaussianos en donde el área de la curva es proporcional a la concentración del compuesto detectado, que cada espectro sea diferente para cada compuesto químico ayuda a su identificación, los datos se pueden almacenar en la memoria de algún ordenador para compararse con los espectros de una colección y averiguar su naturaleza, compararlos, conocer el origen del compuesto y si se ha separado completamente. Este método demanda de poco tiempo, las separaciones se pueden obtener en minutos y en algunos casos en segundos por lo tanto requieren de columnas de alta eficacia y sistemas de bombeo de alta presión, es sencillo y se pueden obtener datos cualitativos y cuantitativos, además la velocidad de análisis es mayor que otro tipo de cromatogramas, tiene alta resolución, permitiendo obtener y separar mezclas muy complejas como fluidos biológicos, buena sensibilidad, logran medir hasta nanogramos, se puede automatizar y posee un amplio espectro de aplicaciones, las desventajas son su alto costo para su operación e instrumentación y que no puede identificar compuestos gaseosos (Gross., 2011).

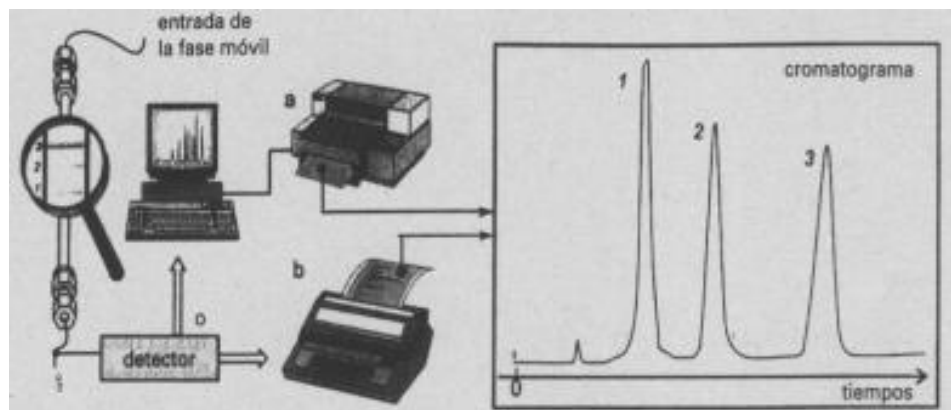


Figura 37. Montaje cromatográfico y cromatograma. Fuente: Imagen obtenida de Skoog, A. D. Et. Al, 2001.

A través del HPLC el compuesto va a entrar a la columna cromatográfica, la cual tendrá partículas químicas en su superficie con las que va interactuar la muestra, mediante el bombeo alta presión se irá moviendo a través de la fase estacionaria, algunos componentes se verán retrasados dependiendo las interacciones físicas o químicas entre el compuesto y ambas fases. El tiempo que tarda un compuesto en ser eludido de la columna se le va a denominar tiempo de retención y es considerado como una propiedad característica que ayuda a identificar cada compuesto en determinada fase móvil y estacionaria. Un ejemplo para realizar este análisis es: emplear un HPLC acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Technologies 6230 TOF, con un equipo Infinity, la columna es 1290 y el inyector es el modelo 1269. Se usa una columna Kinetex 2.6u, C1800A (150 x 2.1 mm) (Phenomenex) y una fase móvil en gradiente de dos líneas (A y B), donde A= Agua grado HPLC-Acetonitrilo (90:10) y B= Metanol grado HPLC-Acetonitrilo (90:10). A ambas se les agregó 0.1% de ácido fórmico. El cromatograma se compara con los estándares (Nava, 2017).



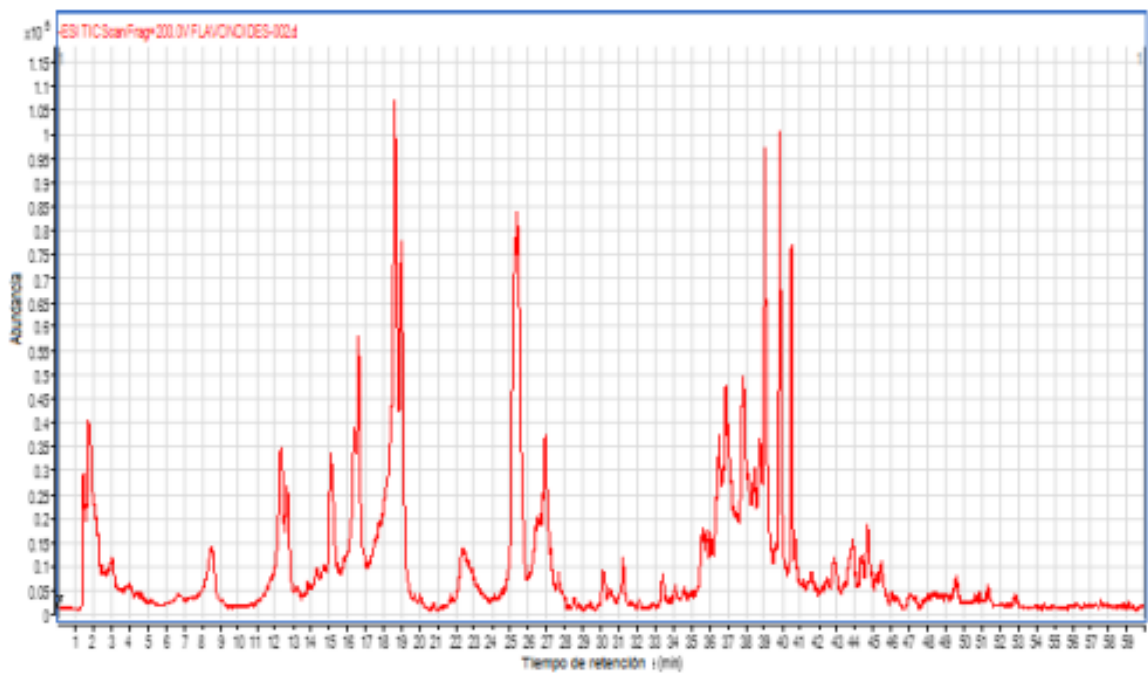


Figura 38. Cromatografía Líquida de Alta Presión acoplada a Espectrometría de Masas (HPLCMS) del extracto de la colecta de marzo. Fuente: Imagen obtenida de Nava, 2017.

## **Cromatografía líquida de alta presión acoplada a detector de diodos HPLC-DAD**

La cromatografía de líquidos alta presión, también conocida como cromatografía líquida de alta resolución y rendimiento, tiene la ventaja de que las separaciones pueden tener lugar a temperatura ambiente para muchas sustancias por lo tanto las sustancias no volátiles o térmicamente inestables pueden separarse sin la necesidad de hacer derivados volátiles (Nava, 2017).

La afinidad de la muestra por la fase estacionaria y por consiguiente el tiempo de retención en la columna se controla variando la polaridad de la fase móvil, esta (al igual que en el apéndice anterior) se puede trabajar con un flujo isocrático, donde la concentración de los disolventes será constante o se puede variar la concentración de los disolventes, realizándolo en gradiente, este se usa generalmente cuando la muestra es muy compleja o contiene sustancias que difieren mucho en su factor de capacidad. Consta de un reservorio de fase móvil, un sistema de bombeo que impulsa las cantidades exactas de la fase móvil desde el reservorio a la columna mediante tuberías y uniones aptas para soportar las altas presiones, los sistemas modernos constan de una o varias bombas dosificadoras controladas por una computadora que pueden programarse para variar la composición de la fase móvil, pueden dar origen a caudales de 10 mL por minuto y generar presiones de hasta 6000 psi, sin embargo, los caudales típicos son de 1 a 2 mililitros por minuto compresiones de 2000 a 2500 psi. Las bombas son de un material muy resistente al ataque químico y mecánico, además son capaces de entregar la fase móvil a una velocidad constante o con fluctuaciones mínimas durante periodos prolongados (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007).

La fase estacionaria para la cromatografía puede ser en fase normal o en fase reversa, en la segunda las columnas constan de una fase orgánica químicamente unida a sílice u otro material, las partículas son recubiertas con una capa delgada de fase orgánica que tiene una baja resistencia a la transferencia de masa y por lo tanto se obtiene una transferencia rápida de sustancias entre la fase estacionaria y la móvil. La polaridad de la fase estacionaria depende de sus grupos funcionales y por lo general tienen diámetros internos de 2 a 5 nanómetros, pero hay columnas

con empaques de mayor diámetro y de diferentes longitudes. Como fase estacionaria se usan partículas microporosas esféricas de sílice muy puro que son permeables al disolvente, los recipientes que contengan la fase estacionaria deben de ser inertes para que cuando entren en contacto con el disolvente no se vaya a extraer alguna especie de material con el que estén hechos, deben de estar provistos de filtros indispensables para eliminar los gases disueltos y partículas que pueda contener la fase móvil. La fase estacionaria más común es la C-18, la sílice tiene unido por modificaciones químicas compuestos de 18 carbonos generando un ambiente no polar, en esta columna van a eluir primero los compuestos polares y al final los apolares, que son los que se retienen más tiempo, es decir es una columna de fase reversa Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.

Después de la separación el eluyente se pasa un detector para proceder a la identificación y cuantificación, a continuación, se describen algunos tipos de detectores (Harris, 2001):

- Detectores de absorbancia ultravioleta: son los más utilizados su fundamento de la espectrofotometría de absorción de los visible y ultravioleta de un componente a una determinada longitud de onda, los más potentes son los que utilizan un montaje de fotodiodos para registrar el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector, los datos de absorbancia se representan en función de la longitud de onda y el tiempo.
- Detectores de fluorescencia: son muy sensibles y selectivos, el principio de operación se basa en la irradiación con la luz UV al componente de interés y la posterior medida de la luz fluorescente emitida por éste.
- Detectores electroquímicos: ofrece ventajas debido a su especificidad, sensibilidad y amplia aplicabilidad, especialmente para compuestos orgánicos. Responde a analitos que puedan oxidarse o reducirse. Es el ejemplo de fenoles, aminas, peróxidos (pueden detectarse por oxidación) y cetonas, aldehídos (detectados por reducción). Las técnicas electroquímicas más utilizadas con esta finalidad son la amperometría, voltamperometría y coulombimetría.

- Detectores de índice de refracción: está formado por una celda con dos compartimentos, en uno se introduce el disolvente puro y en el otro la muestra, se hace pasar luz visible paralela. Cuando entra en la celda soluto de distinto índice de refracción al disolvente el haz se desvía y varía la señal dada por la fotocélula. El principal inconveniente es que son muy sensibles a los cambios de temperatura y no resultan apropiados para trabajar con la modalidad de elusión con gradiente.
- Detectores de conductividad: son los más utilizados cuando los solutos eluidos son iónicos, como ácidos y bases, así como cationes y aniones inorgánicos después de su separación por cromatografía de cambio iónico. Tienen elevada sensibilidad, baratos y de larga duración.

### **Detector de Diodos**

El detector de arreglo de diodos (diode array) fue introducido a mediados de los años 1970. Es una variación de los detectores de la región ultravioleta. La base del funcionamiento de los espectrómetros de arreglo de diodos es simple: el haz de radiación que ha atravesado la columna cromatográfica, es dispersado por medio de una red de difracción fija, siendo recogidas simultáneamente todas las longitudes de onda dispersadas mediante una matriz de fotodiodos. Utilizan una óptica invertida respecto del convencional: Toda la luz de la fuente atraviesa la muestra, y luego es dispersada, en lugar de una ranura de salida, tiene en el plano focal un dispositivo que integra en un pequeño circuito varios cientos de detectores tipo fotodiodo. El número de elementos varía actualmente entre 64 y 4096, siendo los más comunes 512 y 1024 elementos. Este detector se compone de una serie de diodos fotosensibles lado a lado y aislados unos de otros en forma de capas múltiples sándwich. Cada diodo tiene un espesor muy pequeño y la salida de cada uno se puede escanear, almacenar y posteriormente procesadas por un ordenador en un número de maneras diferentes (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007).

## DETECTOR DE ARREGLO DE DIODOS: ESQUEMA

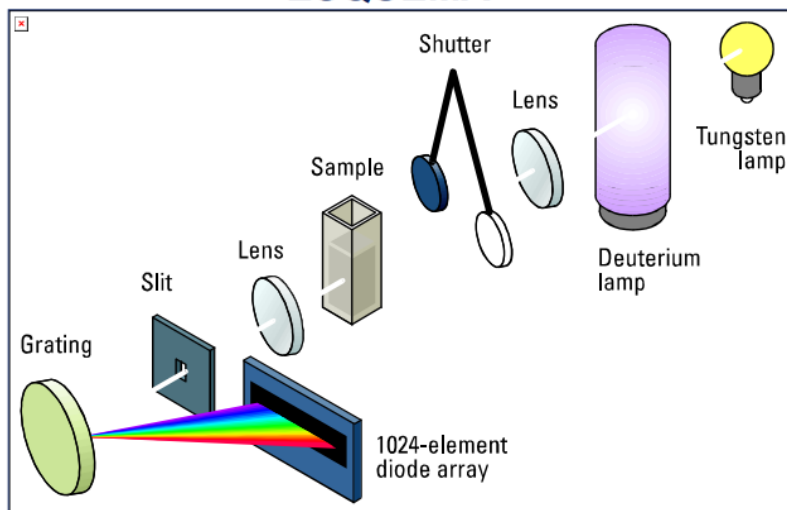


Figura 39. Componentes básicos de un detector de diodos. Fuente: Imagen obtenidas de Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.

Las longitudes de onda constitutivas que son detectadas individualmente por el arreglo de diodos, estos detectores adquieren los datos de absorbancia sobre el intervalo total de luz visible y luz UV y por lo tanto proveen al analista de varias longitudes de onda seleccionadas y espectros de los picos eluidos. Los arreglos de diodos tienen por lo general menor relación señal-ruido que los detectores de longitud de onda fija o variable y por lo tanto son menos apropiados para el análisis de sustancias presentes en bajas concentraciones. Un registrador recibe la información del detector y realiza la impresión del cromatograma los dispositivos modernos almacenan la señal de salida del detector permitiendo procesar el cromatograma luego de cambiar las variables de integración también pueden emplearse para programar el cromatógrafo controlando la mayoría de las variables y automatizando el proceso (Anmat, 2003).

La composición de la fase móvil influye significativamente en la resolución de las sustancias en la muestra al emplearse solventes de grado HPLC y reactivos de alta pureza. Se debe calibrar la columna con la fase móvil y preparar las soluciones estándar y la muestra según se especifique, se inyectan por separado las soluciones estándar y la muestra para registrar los cromatogramas y medir la respuesta de los picos, a partir de los valores obtenidos se puede calcular el contenido de la ola sustancias ensayar (Anmat, 2003).

Genera una enorme cantidad de datos: registra todos los valores de absorbancia en el intervalo de trabajo en cada microsegundo, además la matriz de datos puede ser consultada en tiempo real y después del registro del cromatograma y se pueden realizar gráficos tridimensionales, la identificación se vuelve sencilla y óptima para cada pico además se puede determinar La pureza de cada uno y debido a su rapidez son capaces de registrar la totalidad del espectro proporcionado por un cromatograma que muestra la absorbancia en función de la longitud de onda en pequeños intervalos de tiempo (Muñoz Jáuregui et al., 2014).

Un ejemplo del análisis en este tipo de cromatografía es: extracto metanólico que se analizó en el HPLC, presentan las siguientes condiciones (Nava, 2017):

- Columna Discovery C-18 de 250 x 4.6 mm con un tamaño de película de 5  $\mu\text{m}$ .
- Extracto metanólico: Se corrió de forma isocrática con una mezcla de metanol-acetonitrilo-agua (25.25:50)
- Fracciones activas: se corrió con una mezcla de MeOH-acetonitrilo-H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O (25:25:0.1:50)
- Flujo: 1 mL/min
- Detector de arreglo de diodos (DAD)
- Longitud de onda de 260nm, realizando un barrido completo de 200-400nm.

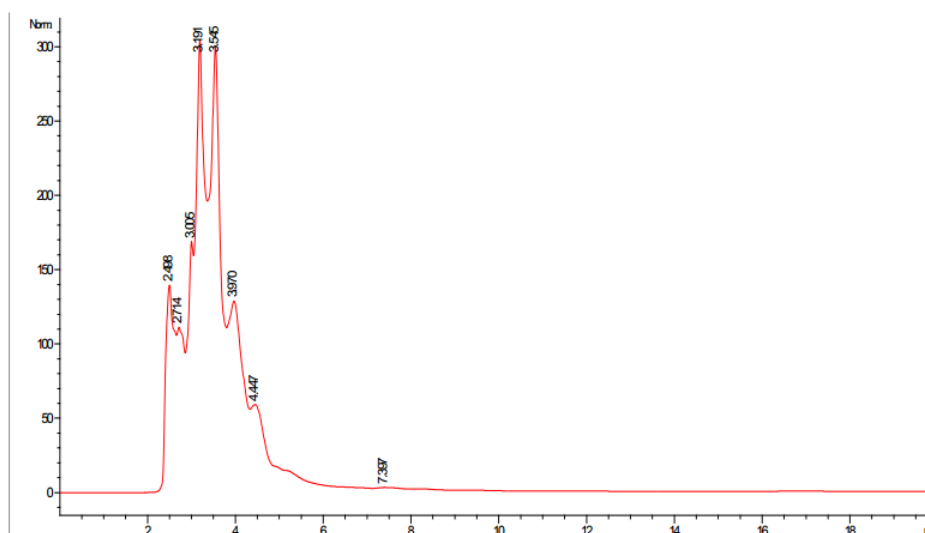


Figura 40. Cromatograma del análisis de HPLC-DAD del extracto metanólico. Fuente: Imagen obtenida de Moreno Guzmán, 2019.

## Corroboración de actividad antimicrobiana

La prueba de sensibilidad antimicrobiana es una de las tantas armas con las que se cuenta en el laboratorio para ayudar a los profesionales en medicina a controlar los procesos infecciosos que se desarrollan en los pacientes. La razón fundamental de una prueba de sensibilidad es la de realizar una predicción a través de una prueba *in vitro* para observar la respuesta del microorganismo a un determinado antimicrobiano, la evolución de la infección y detectar una si hay alguna resistencia (Nava, 2017).

Sin que importe el método a emplear, hay tres facetas o pasos que se deben considerar:

- Medio de cultivo a emplear: todos deben ser preparados de la mejor manera posible, ajustando el pH, y asegurándose de que la concentración del agar sea la correcta, cambios de pH pueden producir falsa resistencia o sensibilidad al incidir en la polaridad de los antimicrobianos. También un agar muy suave, puede producir falsa sensibilidad y, a su vez, un agar muy duro puede producir una falsa resistencia, al incidir en un cambio en la velocidad y distancia de la difusión del antimicrobiano. Otro punto de gran importancia es la profundidad del agar, la cual debe ser exactamente de 4 mm, un agar delgado permite una mejor difusión de los antimicrobianos produciendo una falsa sensibilidad, pero también un agar con más de 4 mm de profundidad puede producir una disminución en la migración del antimicrobiano, por consiguiente, falsa resistencia. Además, los medios de cultivo deben ser lo más frescos posible, con no más de 7 días de preparados y siempre deben ser guardados en bolsas plásticas selladas y a 4°C. Cada vez que se va a preparar el medio de cultivo, hay que asegurarse que el polvo esté en buenas condiciones, sin cambios de color y de consistencia y por supuesto, que sea polvo (no hidratado) (Taroco, Seija, Vignoli, 2020).
- Antimicrobiano a utilizar: podemos tener cuatro tipos de presentaciones posibles, los discos de papel impregnados con una concentración conocida

del antimicrobiano, pastillas con una concentración conocida del antimicrobiano, preparaciones farmacéuticas del antibiótico o tiras de plástico con una matriz propia y un gradiente decreciente del antimicrobiano determinado. Lo importante es que estas diferentes presentaciones estén en la mejor condición posible, que se respete la cadena de frío, no se humedezcan y que realmente contengan la concentración del antimicrobiano que dice tener. Cada antimicrobiano tiene su halo de inhibición específico y éste depende del tamaño de la molécula y su polaridad; de esta manera, un antimicrobiano con un peso molecular bajo, como la penicilina, tendrá mucha capacidad para migrar y su halo, en el caso de una cepa sensible tendrá un diámetro muy amplio. En el caso de la vancomicina, que es una molécula muy grande e hidrofóbica, su halo de inhibición será muy pequeño; no se puede afirmar que una cepa determinada es más sensible a la penicilina que a la vancomicina, sólo porque el primero tenga un halo de inhibición mucho mayor (Taroco, Seija, Vignoli, 2020).

- Cepa bacteriana: es indispensable que sea fresca, un periodo de incubación no mayor de 24 horas y que haya sido crecida en un medio de cultivo no inhibitorio. Se realiza la estandarización con el estándar de McFarland o utilizando un nefelómetro. En ambos casos, la estandarización se hace hasta el 0.5 de McFarland. Para la preparación del inóculo lo más recomendable es usar agua destilada estéril; también puede usarse solución salina al 0.4% o un caldo nutritivo. Pero para poder desarrollar todo, hay que cumplir con un requisito fundamental: es necesario lograr el aislamiento del agente productor del cuadro clínico mediante los cultivos correspondientes. Las cepas control utilizadas serán las recomendadas por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards); estas cepas son denominadas ATCC (American Type Culture Collection), de las cuales se sabe su patrón de resistencia o sensibilidad, se conocen y se han establecido los rangos de diámetros en el que debe estar la zona de inhibición de crecimiento bacteriano si las condiciones del procedimiento son las adecuadas. Estos datos se encuentran en tablas de la NCCLS. Se debe verificar que los



diámetros de inhibición del crecimiento bacteriano de los discos de antibióticos entren dentro de los establecidos en las tablas, de lo contrario podremos concluir que existe alguna variable que está cambiando las condiciones en que debe ser realizado el procedimiento (Taroco, Seija, Vignoli, 2020).

## Control de Calidad

Para proceder de la prueba de sensibilidad antimicrobiana debemos previamente asegurarnos que se cumpla un estricto control de calidad para supervisar la exactitud y fiabilidad de la metodología. Esto se realiza debido a que existe un gran número de variables que pueden afectar los resultados dentro de las que se destacan (Taroco, Seija, Vignoli, 2020):

1. Actividad de los discos, cuidar que no estén vencidos o que pierdan su carga por almacenamiento incorrecto.
2. Inadecuada composición y espesor del medio.
3. Alteraciones en el inóculo, patrón de turbidez 0.5 de la escala de McFarland.
4. Problemas con el tiempo o temperatura de incubación, etc.

## **BACTERIAS**

### **Método de difusión en agar de Kirby-Baüer**

El más conocido es el Müller-Hinton ya sea en agar o en caldo, el cual se emplea en difusión y de dilución en agar, la técnica es cualitativa y sus resultados se pueden interpretar únicamente como sensible, intermedio o resistente, y está diseñada específicamente para bacterias de crecimiento rápido como los *Staphylococcus* sp. o los integrantes de la familia Enterobacteriaceae (Herrera, 1999).

Para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los extractos se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton con una placa de espesor uniforme de 4 mm. Se disuelve 38g de medio en 1 litro de agua destilada. Se calienta hasta ebullición, agitando para su disolución y se autoclava a 121 grados durante 15 min (Nava, 2017).

Con un asa de siembra se tocan las superficies convexas de colonias de *E. coli* (Gram negativa) y *Staphylococcus aureus* (Gram positiva), se sumerge el asa en 10 mL de caldo Müller-Hinton, se enjuaga bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa, el tubo de cultivo se incuba a 37°C durante aproximadamente 18 a 24 horas. El inóculo bacteriano es llevado a una concentración igual a la del estándar 0,5 de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL). Para preparar el estándar de McFarland, se prepara mezclando 0.5 mL de cloruro de bario (0.048 M) con 99.5 mL de ácido sulfúrico 0.18 M. La absorción a 625 nm debe ser de 0.8 a 0.10. En la comparación de la turbidez del estándar y el medio de cultivo, si el caldo con los organismos es más turbio se le agrega solución salina 0.9% hasta igualarlas (Cavaliere et al., 2005).

Luego se sumerge un hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión, antes de retirarlo se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo, con este hisopo se inocula la superficie de una placa con agar de Müller-Hinton. Previamente, se deja que la placa alcance temperatura ambiente. Finalmente se siembra mediante estría en por lo menos en tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60 grados luego de cada estría. Para la aplicación de sustancias se utilizan sensidiscos de 6 mm de diámetro hechos de papel Whatman del No. 5. En todos los casos se hacen diluciones para que los sensidiscos lleven la cantidad deseada del producto. Se utilizan 80 mg del extracto disueltos en 200 µL del solvente (agua destilada, o el solvente o mezcla de solventes donde se disuelva totalmente el extracto), cada sensidisco se impregna con 10 µL de extracto. Al llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocan en la superficie del agar, en un plazo no mayor de 15 minutos, utilizando una pinza estéril, por lo menos a 22.0 mm uno del otro y a 14 mm del borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la placa. Los sensidiscos se deben presionar suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar, se colocan máximo cinco sensidiscos por placa (Moreno, 2019; Ramos, 2016).

Control positivo: se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos impregnados con 25 microgramos de cloranfenicol.

Control negativo: 10  $\mu$ L de MeOH, o del solvente utilizado.

Testigo: tiene medio de cultivo más el inóculo bacteriano.

Una vez preparadas las placas para la prueba de susceptibilidad, se colocan en una incubadora a 36° C, sin mayor tensión de CO<sub>2</sub>, por un periodo no mayor a 24 hrs.

En el caso de existir zonas de inhibición se reporta el extracto como activo. Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, esta prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio. En el caso de que no se presente un halo, se debe como no activo (na) (Nava, 2017).

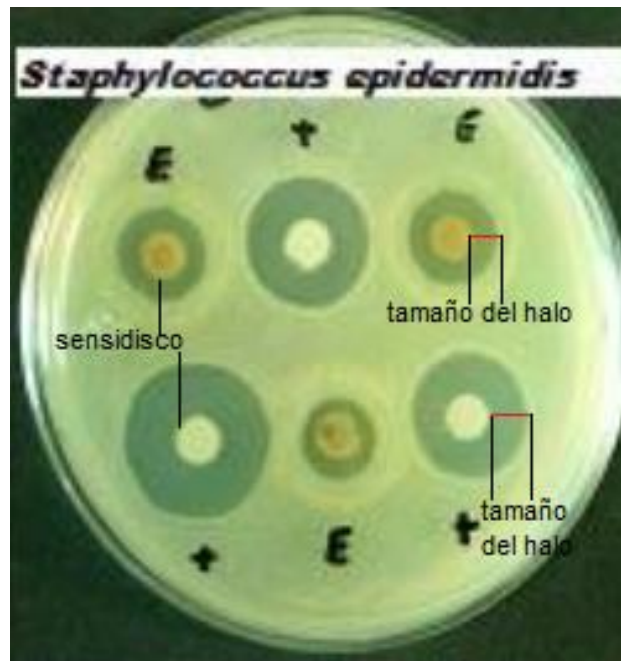


Figura 41. Determinación del tamaño del halo de inhibición. Fuente: Imagen obtenida de Nava, 2017, modificada por García Loredo Montserrat Atenea.

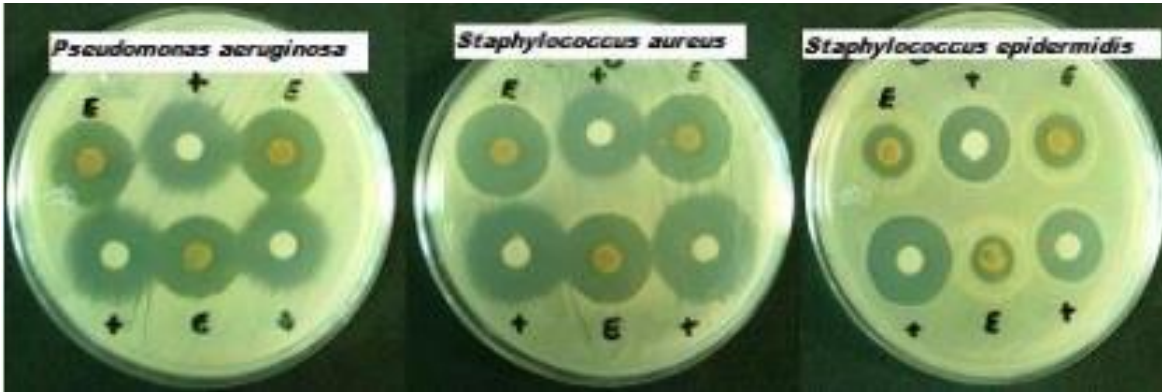


Figura 42. Halos de inhibición obtenidos con el extracto de la colecta de marzo; E= extracto y += sendiscos con cloranfenicol. Fuente: Imagen obtenida de Nava, 2017.

La técnica de difusión en agar, presenta varias ventajas: es fácil de efectuar y de gran reproducibilidad, bajo precio, no requiere equipo especial, sus resultados son fácilmente interpretados, es muy flexible a la hora de escoger las sustancias a probar. Dentro de sus desventajas está el hecho de que brinda sólo información cualitativa y debe ser modificada para poderla emplear en organismos fastidiosos o de crecimiento lento (García Rodríguez *et al.*, 2000).

### Método de dilución en agar

En la técnica de la dilución en agar se preparan tubos con la concentración definida de antibiótico y se le agrega a cada tubo una cantidad conocida del agar Müller-Hinton, este tubo se homogeniza y se chorrea en una placa de Petri vacía con el antibiótico diluido a una concentración determinada. Generalmente se inicia a una concentración de 128 ug/ml y se hacen diluciones dobles hasta obtener el gradiente decreciente en la concentración de antibiótico (64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06 µg). La elección de la concentración en la que se inicia el gradiente, depende del antibiótico y del tipo de cepa a probar (Nava, 2017).

Para inocular el medio de cultivo se toma, del inóculo estandarizado, el agente y se coloca sobre la superficie del agar con antibióticos, además se inocula una placa de Müller-Hinton sin antibiótico, que sirve como control positivo de crecimiento. La placa se incuba a 35°C por 18 a 24 horas y se revisa el crecimiento, siempre contra

el control positivo. Si la cepa logra crecer en la superficie del medio de cultivo, se reporta como resistente a esa concentración. Si, por el contrario, no crece, se reporta como sensible a esa concentración de antimicrobiano (García Rodríguez *et al.*, 2000).

Con esta técnica, se puede obtener la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la que se define como la mínima concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento de una cepa bacteriana determinada. Además, se puede observar la CMB, que es la mínima concentración de un antibiótico que mata el 99.9% de las bacterias de un inóculo inicial (Herrera, 1999; Cavalieri *et al.*, 2005).

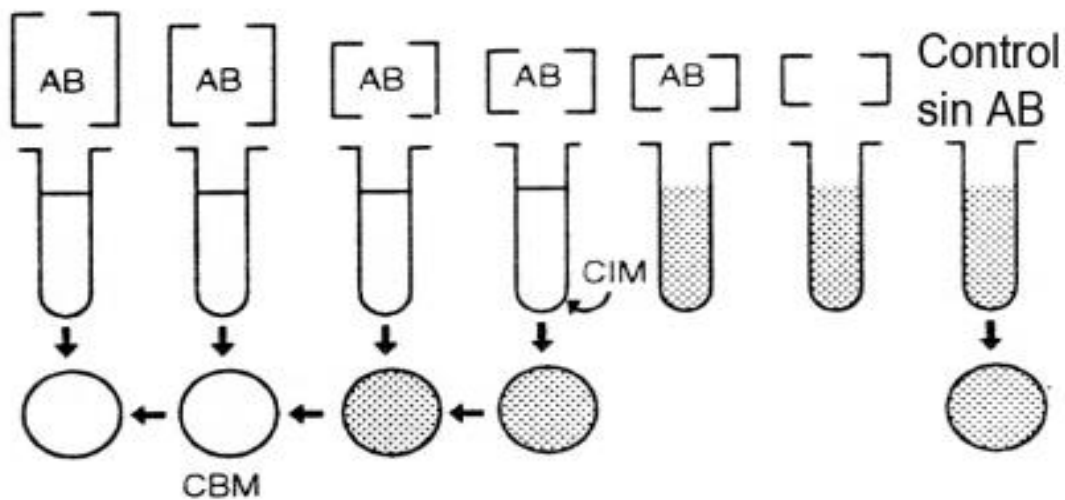


Figura 43. Determinación de la Concentración inhibitoria mínima (CIM) y de la Concentración Bactericida Mínima (CBM). Fuente: Imagen obtenida de: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>

### Macrotitulación en tubo

Esta técnica se deriva de la anterior, pero no se utiliza por la cantidad de material que emplea, y porque presenta el grave problema de la dificultad para detectar contaminaciones del medio de cultivo, lo que podría producir una falsa resistencia. Para evitar el problema antes mencionado, los tubos con medio de cultivo deben incubarse por 24 horas a 35°C previo al experimento, aquellos tubos que presenten turbidez deben ser desechados porque están contaminados. Todo el experimento

debe realizarse en condiciones de esterilidad (García Rodríguez *et al.*, 2000). Consiste en exponer a las cepas a estudiar a diferentes concentraciones de antimicrobianos, en diluciones a la mitad y observar el crecimiento de los microorganismos para luego definir la CIM.

Por cada combinación de microorganismo con antimicrobiano se emplea un juego de tubos, todos con 1ml de caldo MH, para un pequeño número de pruebas se preparan diluciones al doble directamente en los tubos, es decir, se colocan 2 ml de solución de antibiótico en el primer tubo de la serie de diluciones, con una pipeta estéril se transfiere 1 ml del primer tubo al segundo, después de mezclar el contenido del segundo tubo, se transfiere 1 ml con una pipeta diferente (en esta transferencia y en todas las sucesivas) al tercer tubo. El proceso continúa hasta el penúltimo tubo, al que se le quita 1 ml, que se descarta, el último tubo no recibe solución de antibiótico y sirve de control de crecimiento. Se añade a cada tubo 1 ml del inóculo ajustado y se incuban los tubos a 35°C entre 16 y 20 horas (Herrera, 1999).

### **Microtitulación**

Aquí se emplean unas placas plásticas, estériles, con tapa, de 96 pozos y un fondo en U, también conocidas como microtiter, cada placa permite realizar una CMI de un antibiótico a ocho cepas diferentes, o una CMI de una cepa contra ocho diferentes antibióticos. Con esa técnica se pueden determinar dos diferentes valores: la CMI y la CMB.

El primer paso es colocar 50 µL del medio de cultivo en cada uno de los pozos de la placa a emplear. Luego se colocan 50 µL de la solución madre del antibiótico, teniendo en cuenta que estamos haciendo una dilución 1: 2, si la solución madre tiene 512 ug/ml, en el primer pozo tendríamos una concentración real de 256 ug/ml, luego procedemos a realizar diluciones dobles hasta los pozos 10, dejando el 11 como control positivo de crecimiento. El control positivo tiene medio de cultivo más el inóculo bacteriano y el control negativo tiene medio de cultivo y el solvente usado para diluir el antibiótico, para un volumen final de 100 µL en ambos pozos. La placa

se incubaba a 35°C por 18 a 24 horas. La interpretación es relativamente sencilla, la CMI se determina observando en cuál pozo no hay crecimiento, usando como referencia el control positivo en el cual sí hay. La CMI será la concentración del último pozo en el cual no hay crecimiento (Herrera, 1999; Cavalieri et al., 2005; García Rodríguez *et al.*, 2000).

Para el tipo de estudio, que se propone en este escrito, se recomienda llevar a cabo la técnica de difusión en agar de Kirby-Baüer, ya que las otras técnicas van más dirigidas a la determinación de la CMI y CMB y aunque estos datos nos brindan información valiosa, no es uno de los objetivos de este proyecto, como sólo se desea corroborar si hay actividad antibacteriana por parte del extracto, el método más práctico y sencillo es la difusión en agar, dicho esto, el agar que se recomienda utilizar para este ensayo es el agar de Müller-Hinton, si bien existen una gran variedad de agares, no son utilizados por su especificidad, es decir algunos están diseñados para el crecimiento de bacterias particulares, como se quiere hacer el ensayo con dos bacterias distintas morfológicamente, una Gram positiva y otra negativa, se debe usar un agar universal, que permita el crecimiento de ambas bacterias, en vez de hacerlas crecer en dos distintos tipos de agares, ya que es menor la inversión de tiempo y recursos económicos si se emplea un agar en vez de en dos.

## **LEVADURAS**

### **Método de difusión en agar de CLSI.**

Es el mismo que para las bacterias, está basado en el estudio de la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos en función del halo de inhibición producido por la difusión del antifúngico en un medio de cultivo sólido. Los pasos a seguir son los mismos que para las bacterias, pero con algunas modificaciones.

El medio utilizado es el medio PDA (agar papa-dextrosa) colocado en cajas de Petri donde debe alcanzar un espesor de 4mm. Una vez vertido el medio las cajas se dejan incubando 24 horas con la finalidad de verificar la ausencia de contaminación en el agar. Con un asa de siembra estéril se tocan las superficies convexas, 5 colonias  $\geq 1$  mm de diámetro de *C. albicans*. Se sumerge el asa en 10 mL de caldo

Saboreaud. Se enjuaga bien el asa verificando que el material quede bien disuelto en el caldo. Una vez realizado esto, se retira el asa y el tubo con el cultivo se incuba a 35° C durante 48 hrs (Moreno, 2019).

Después de la incubación, se sacan los tubos se agitan bien y con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda: 530 nm), se ajusta a una densidad óptica 0,5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina. Esta solución tiene una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  -  $5 \times 10^6$  UFC/mL. Se sumerge un hisopo de poliéster estéril y seco en la suspensión de la cepa de *C. albicans*, antes de retirar del tubo se elimina el exceso de líquido rotando el hisopo contra las paredes internas del tubo. Se inocula la superficie de la placa con el medio PDA. Se siembra por medio de estría en por lo menos 3 direcciones, girando 60 grados al momento de cambiar de dirección (García Rodríguez *et al.*, 2000).

Se fabrican sensidiscos de 6 mm de diámetro con papel Whatman No. 5. La disolución de extracto se prepara disolviendo 80mg del mismo en 200µl de agua destilada. Es necesario aplicar 10 µl del extracto a cada sensidisco (Moreno, 2019).  
Control positivo: se impregna un sensidisco con 25 µg de Fluconazol o 25 µg de Nistatina

Control negativo: 5 µL de MeOH o del solvente usado para diluir el antibiótico.

Testigo: tiene medio de cultivo más el inóculo bacteriano

Los discos se colocan en la superficie del agar a una distancia adecuada. Una vez preparadas las placas se colocan en incubadora a 35° C sin tensión de CO<sub>2</sub>. En el caso de existir inhibición, se reporta el extracto como activo. Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración y en mm; la prueba se hace por triplicado y se reportan los promedios de la cepa utilizada. En el caso de existir inhibición, se reporta el extracto o fracción como activa (Lacasa *et al.*, 2007).





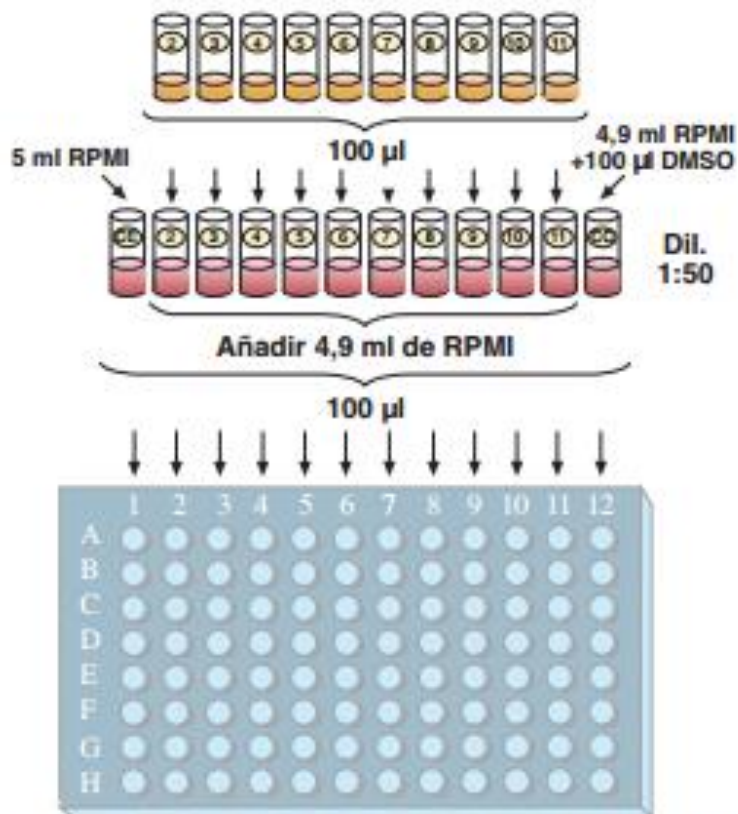
Figura 44. Ejemplo de halos de inhibición de crecimiento de hongos levaduriformes obtenidos con el extracto de la colecta de marzo. E= Extracto; +=nistatina. Fuente: Imagen obtenida de Nava, 2017.

### Método de microdilución para levaduras

El medio de cultivo que ha dado mejor concordancia, tanto intra como interlaboratorio, es el medio sintético RPMI 1640 (10.40 g) con glutamina y sin bicarbonato sódico, tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS, 34.53 g) 0.164 M (ICN, Sigma), ajustado a pH  $7\pm 0.1$  y con 0.2% de glucosa, todo esto en 1 000 ml de agua destilada y se mantiene refrigerado hasta su uso (4-8 °C, máximo 6 meses) (Cantón Lacasa et al., 2007).

Para antifúngicos solubles en agua (fluconazol, 5-fluorocitosina, caspofungina, micafungina) se prepara una solución, pesando la cantidad suficiente de polvo para obtener una concentración al menos 10 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar y disolverla en agua destilada estéril. Se recomienda repartirlas en alícuotas de 1.1 ml y congelar a  $-70$  °C hasta su utilización (máximo 6 meses), o a  $-40$  °C (máximo 2 meses). A partir de la solución madre se prepara la serie de diluciones a una concentración 10 veces superior a la concentración final deseada, utilizando como diluyente RPMI 1640. Posteriormente, se realiza una dilución 1/5 añadiendo a todos los tubos 4 mL de RPMI, con lo que la concentración del antifúngico en los tubos es 2 veces mayor que la concentración final deseada (de 128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25  $\mu\text{g/ml}$ ) (Moreno, 2019).

Antifúngicos insolubles en agua (anfotericina B, anidulafungina, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, ravuconazol, voriconazol), se prepara una solución, pesando la cantidad suficiente de polvo para obtener una concentración de 1.600  $\mu\text{g/ml}$  (100 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar) y



**Concentración final después de inocular: 16-0,03 µg/ml**

**Figura 45. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos.**  
Fuente: Imagen obtenida de Cantón Lacasa et al., 2007.

disolverla en dimetil sulfóxido (DMSO). Se reparten en alícuotas de 1,1 ml y congelar a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización (máximo 6 meses), o a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (máximo 2 meses). A partir de la solución madre se prepara la serie de diluciones a una concentración 100 veces superior a la concentración final deseada, utilizando como diluyente DMSO. Se realiza una dilución 1/50 tomando 100 µl de cada tubo y se transfieren a otro tubo que contiene 4,9 ml de RPMI, con lo que la concentración de antifúngico es dos veces

mayor que la concentración final deseada ( $32\text{ }\mu\text{g/ml}$  -  $0,06\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) y la de DMSO 2% (Cantón Lacasa et al., 2007).

Las placas de microtiter se rellenan con 100 µl de solución de antifúngico, el contenido del tubo nº 2 se vierte en una cubeta o en una placa de Petri estéril y con ayuda de una pipeta multicanal (8 canales) se toman 100 µl y se llenan los pocillos de la columna nº 2 (2A - 2H). Con el contenido del tubo nº 3 se llenan los pocillos de la columna nº 3 (3A - 3H) y así sucesivamente con los demás tubos y pozos. Hasta llegar a los pocillos de la columna nº 12 se llenan con 100 µl de RPMI (control de crecimiento), es el control de crecimiento. Cuando se trata de antifúngicos insolubles en agua, la columna nº 12 se rellena con 100 µl de RPMI con un 2% de DMSO, o el disolvente que se haya utilizado (García Rodríguez *et al.*, 2000).

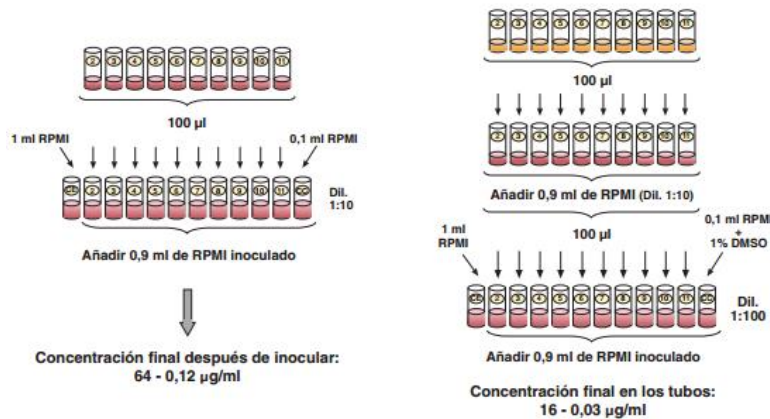
Los pocillos de la columna nº 1 se llenan con 200 µl de RPMI (control de esterilidad), sirve para leer la absorbancia del medio. Una vez llenas las placas se cierran y envuelven convenientemente con una bolsa para evitar la evaporación. El inóculo se prepara tocando con el asa de cultivo 5 colonias  $\geq 1$  mm y de 24 h de crecimiento en placa de SDA que se resuspenden en un tubo de solución salina (NaCl 0,85%). Se agita bien y, con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda: 530 nm), se ajusta a una densidad óptica 0,5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina. Esta solución tiene una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  -  $5 \times 10^6$  UFC/mL. Posteriormente se realiza una dilución 1:1000 con medio RPMI (concentración de  $1 \times 10^3$  -  $5 \times 10^3$ ). Esta última dilución es la que se utiliza para inocular las placas de antifúngico. La concentración final de levaduras en las placas será de  $0,5 \times 10^3$  –  $2,5 \times 10^3$  (Nava, 2017).

Se inoculan con 100 µl de la suspensión de levadura desde el pocillo 2 hasta el 12, se incuban a 35 °C con especies del género *Candida* durante 48 h. La lectura visual debe realizarse con ayuda de un espejo invertido, en esta técnica se puede medir la CMI, que es la concentración más baja de antifúngico que inhibe el crecimiento de la levadura, o lo que es lo mismo, que produce una reducción del 100% del crecimiento. Aunque no es la recomendada por el CLSI, puede hacerse una lectura espectrofotométrica a 405 nm, también puede leerse a 490 y 530 nm ya que, prácticamente, la CMI no varía (Herrera, 1999).

### **Método de macrodilución para levaduras (M27-A3)**

En este método se utilizan tubos estériles de 11x70 mm y el volumen final en cada tubo es de 1 ml. El medio de cultivo, la preparación del mismo y de la solución madre de antifúngico es igual al método de microdilución. Antifúngicos solubles en agua se preparan las diluciones del antifúngico, las diluciones se reparten en alícuotas de 0.1 ml, en tubos de 11x70 y se congelan -70 °C hasta su utilización completamente cerrados. El día del ensayo se descongelan los tubos y se diluyen 1/10 añadiendo a cada tubo 0,9 ml de RPMI inoculado. Antifúngicos insolubles en agua se diluyen 1/10 en RPMI y se reparten en alícuotas de 0.1 ml en tubos de 11x70 y se congelan a -70 °C, completamente cerrados, hasta su utilización. El día del ensayo se descongelan los tubos y se diluyen 1/10 añadiendo a cada tubo 0,9 ml de RPMI

inoculado Preparación del inóculo se siguen las mismas recomendaciones que para el método de microdilución. A partir de la suspensión ajustada a la escala 0,5 de McFarland se diluye 1/2000 en medio RPMI (concentración  $0.5-2.5 \times 10^3$  UFC/mL) (Cantón Lacasa et al., 2007).



**Figura 46. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos solubles en agua (izquierda) y Segundo paso de las diluciones de antifúngicos insolubles en agua (derecha). Fuente: Imagen obtenida de Cantón Lacasa, et al., 2007.**

La lectura se hace visualmente a las 48 h de incubación comparando la turbidez de los tubos con la del control diluido 1/20 (0.2 ml del tubo control más 0.8 ml de RPMI) y se obtiene la CMI (García Rodríguez *et al.*, 2000).

Para este estudio se recomienda llevar a cabo la técnica de difusión en agar, ya que tiene las ventajas de ser fácil de efectuar y de gran reproducibilidad, bajo precio, no requiere equipo especial, sus resultados son fácilmente interpretados, es muy flexible a la hora de escoger las sustancias a probar. Por otro lado, las técnicas de micro y macrodilución tienen técnicas un poco engorrosas, que llegan a ser complicadas si no se tiene experiencia en el área, además van más dirigidas hacia la obtención CMI, lo cual no es uno de los objetivos de este proyecto, como se busca corroborar la actividad antifúngica la técnica más adecuada es difusión en agar del CLSI.

## **HONGOS FILAMENTOSOS**

### **Inhibición del crecimiento radial: Método de difusión en agar**

Para el ensayo con hongos filamentosos, el medio utilizado es el medio PDA (agar papa-dextrosa), ya que éste medio promueve con eficacia el crecimiento de la mayoría de las cepas fúngicas de interés médico. Se realiza en cajas de Petri, donde el medio debe alcanzar un espesor uniforme de 4 mm; de ser más fino, los compuestos analizados tenderán a difundir más en dirección lateral, aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; si es más grueso, el medio provoca que la disolución se precipite, disminuyendo en diámetro del halo de inhibición. Una vez vertido el medio de cultivo, las cajas se dejan incubando durante 24 horas, esto con la finalidad de verificar la ausencia de contaminación en el agar (Nava 2017).

Para la obtención del inóculo de hongos filamentosos, se utiliza un cultivo previamente preparado, se realiza una perforación en el cultivo con la boca de una pipeta Pasteur, obteniendo un botón de siembra de 5 mm de diámetro. Posteriormente, con una aguja de disección o pinzas estériles, se extrae el botón y se coloca en la placa donde se realizará el ensayo, cuidando que la parte con el hongo quede directamente sobre el medio de cultivo. Con excepción de géneros como *Aspergillus*, que tienen a soltar una gran cantidad de esporas, se toma con la punta de una aguja de disección estéril las esporas del cultivo y se pasan al medio del ensayo, procurando dejarlas en el centro de la placa (Cavaliere et al., 2005).

Para la preparación de sensidiscos se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos con papel Whatman del No. 5, en los cuales se aplicará la sustancia a evaluar. Del extracto se preparan las diluciones necesarias utilizando como vehículo metanol, en el caso de hongos filamentosos y levaduras, la concentración mínima requerida es de 4 mg. Los discos se deben realizar 12 horas antes del ensayo con la finalidad de que se evapore el solvente (Nava, 2017).

Control positivo: sensidiscos con 25 µg de Ketoconazol

Control negativo: 5 µL de MeOH

Testigo: tiene medio de cultivo más el inóculo del hongo filamentoso.

Los discos son colocados manualmente en la superficie del agar utilizando pinzas estériles. Se deben dejar a una distancia adecuada unos de otros y abarcando la

totalidad de la placa. Una vez preparadas todas las placas para la prueba de susceptibilidad, se colocan en incubadora a 36°C sin mayor tensión de CO<sub>2</sub>, esto último, para evitar la acidificación del medio y la obtención de falsos positivos o negativos en la prueba. La inhibición se considerará de acuerdo al grado de distorsión de la circularidad del crecimiento del micelio y solamente se reportará como alto (++), bajo (+) y nulo (/) (García Rodríguez *et al.*, 2000).

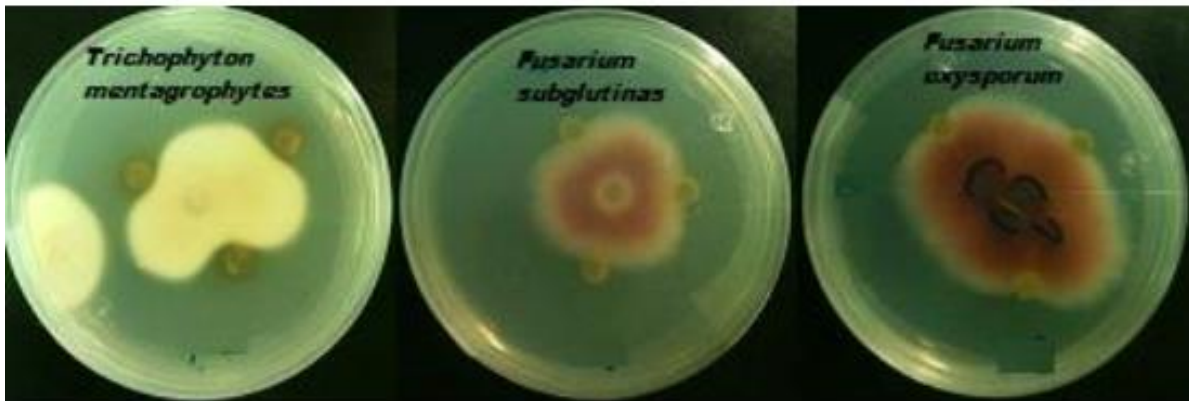


Figura 47. Ejemplo de inhibición del crecimiento radial del micelio de hongos filamentosos con el extracto de la colecta de marzo. Fuente: Imagen obtenida de Nava, 2017.

### **Método de microdilución en caldo M38-A para hongos filamentosos**

Las características del medio de cultivo, pH, preparación de la solución madre de antifúngico y diluciones son iguales a las del método M27-A3. En la Preparación del inóculo en el género *Aspergillus* y en las especies *P. boydii*, *R. arrhizus* y *S. schenckii* el inóculo se prepara a partir de un cultivo de 7 días de crecimiento a 35 °C en agar glucosado de patata (PDA), medio que induce la formación de conidias o esporangiosporas. Para las especies del género *Fusarium* se parte de un cultivo de 48 a 72 h a 35 °C y posteriormente a 25-28 °C hasta completar siete días, en PDA. Para facilitar la recogida de conidias, introducir el asa de cultivo en Tween 20 y pasarla por encima de las conidias; después resuspender en solución salina. Dejar sedimentar las partículas durante 3-5 min, transferir el sobrenadante a otro tubo y agitar vigorosamente durante 15 segundos. Debido a que el tamaño de las conidias es distinto para cada especie, la densidad óptica (DO) para obtener una concentración de  $1-5 \times 10^6$  variará con la especie. Para *Aspergillus* spp. y *S. schenckii* se ajusta a una DO de 0.09-0.17 (80-82% transmitancia): 0.41-0.56 McFarland. Para *Fusarium*, *P. boydii* y *R. arrhizus* a 0.15- 0.17 (68-70% de

transmitancia): 0.68-0.77 McFarland. No obstante, es aconsejable confirmar las UFC/mL de estas DO en cada espectrofotómetro particular (Cantón Lacasa et al.,

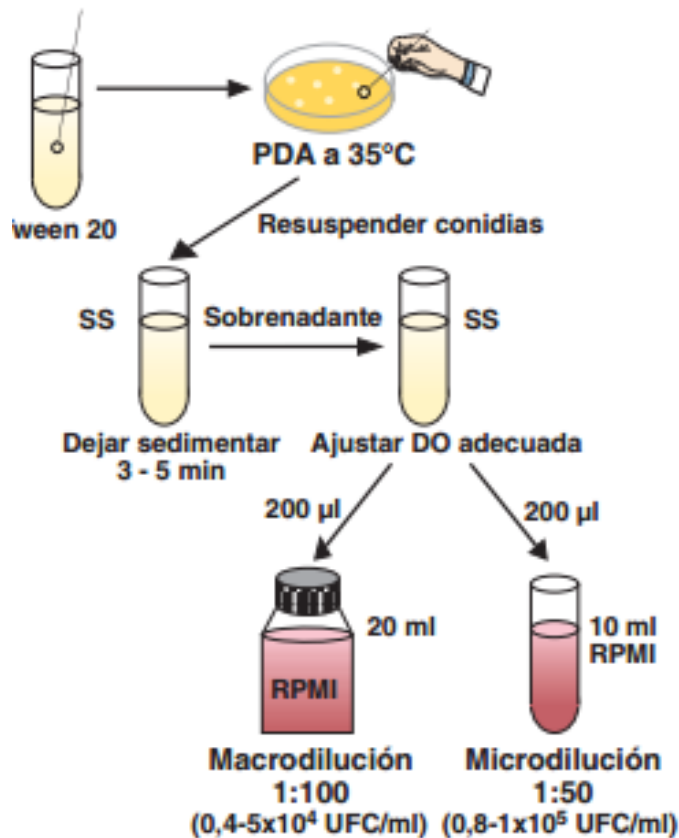


Figura 48. Preparación del inóculo para hongos filamentosos. Fuente: Imagen obtenida de Cantón Lacasa et al., 2007.

2007).

Se debe diluir 1/50 en RPMI 1640. Es posible que *P. boydii* requiera una dilución menor. En cada ensayo debe controlarse el inóculo, para ello se siembran 100 µL de una dilución 1/100 del inóculo en SDA y se incuba a 28-30 °C hasta que se observa la presencia de colonias (24-26 hrs) para *Rhizopus* spp., 40-50 h para la mayoría de los hongos y >5 días para *P. boydii*). En la inoculación de las placas, cada pocillo se inocula con 100 µl de la suspensión de conidias o esporangiosporas. En este paso, tanto la concentración de

antifúngico como el inóculo se diluyen. El pocillo control de crecimiento debe tener la misma concentración final (1%) del diluyente del antifúngico (García Rodríguez et al., 2000).

Las placas se incuban a 35 °C sin agitación hasta que se observa crecimiento en el pocillo control. Dependiendo de la especie el tiempo de incubación varía; así, para *Rhizopus* spp. el tiempo de incubación oscila entre 21-26 h. Sin embargo, las especies de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, así como *S. schenckii* se incuban durante 46-50 h y *P. boydii*, durante 70-74 hrs. Lectura de los resultados: Fluconazol. Los hongos filamentosos no son sensibles a este antifúngico, la mayoría de las CMI son >64 µg/ml, con la excepción de algunos hongos dimórficos y dermatofitos.

Ketoconazol, las CMI suelen estar comprendidas entre 0.03 y 16 µg/mL (Cantón Lacasa et al., 2007).

#### **Método de macrodilución en caldo M38-A**

Se utilizan tubos estériles de 11x70 mm. Volumen final: 1 ml. El medio de cultivo y preparación del mismo, la solución madre y diluciones del antifúngico igual al método de microdilución. Para el inóculo se siguen las mismas recomendaciones que para el método de microdilución, a partir de la suspensión ajustada a la escala 0,5 de MacFarland se diluye 1/100 en medio RPMI (concentración 0,4-5x10<sup>4</sup> UFC/mL) y se inoculan los tubos que contienen las concentraciones de antifúngico con 0,9 ml del inóculo diluido lo cual diluye estas concentraciones 1/10. La temperatura y tiempo de incubación es igual que para el método de microdilución. En la lectura de los resultados se hace visualmente a las 48 h de incubación comparando la turbidez de los tubos con la del control. Debe leerse a las 24 h en *Aspergillus* spp. y a las 48 h en *Scedosporium* spp (Cantón Lacasa et al., 2007).

Para hongos filamentosos, igual que en los casos anteriores se recomienda hacer la técnica de difusión en agar, ya que las otras técnicas van más dirigidas a la identificación de la CMI y como sólo se desea corroborar si hay actividad antibacteriana por parte del extracto, el método más práctico y sencillo es la difusión en agar, además de que el ensayo es más sencillo, fácil de efectuar, de gran reproducibilidad, bajo precio, no requiere equipo especial, sus resultados son fácilmente interpretados.

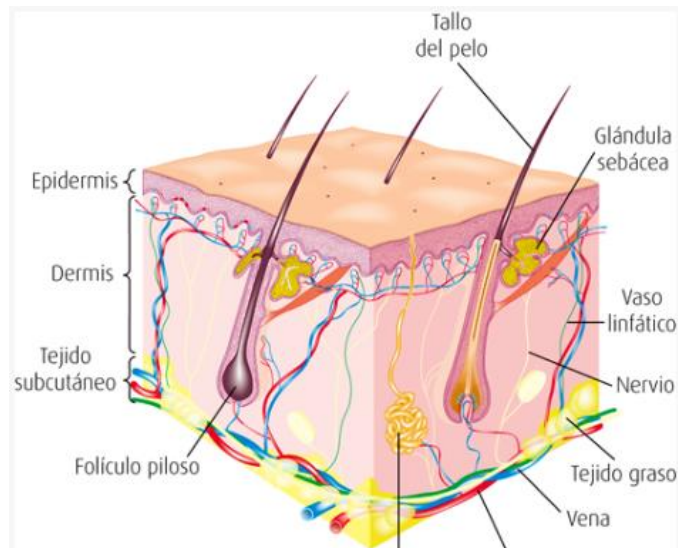


## PIEL Y ANEXOS

La piel es el órgano de mayor extensión y representa el 15% del peso total del cuerpo, es por esta razón que posee un sinnúmero de funciones en el cuerpo humano, la más importante y evidente es como cubierta externa que protege al ambiente interno del externo, resguarda los tejidos y órganos situados debajo de ella para no ser expuestos a sustancias tóxicas y factores ambientales (aire, agua y radiaciones solares), actúa como barrera contra los microorganismos patógenos (animales, parásitos, bacterias, hongos y virus), además permite interacciones entre los ambientes gracias a su capacidad sensorial que se encarga de registrar el dolor, temperatura y presión ejercida sobre ella. La piel, también conocida como sistema tegumentario, se divide en tres estratos: epidermis, dermis (cutis) e hipodermis (subcutis), que a continuación se describen a detalle (Navarrete Franco, 2003).

### A) Epidermis

Es la primera capa y la más externa, su origen procede del ectodermo superficial del embrión, la epidermis es un epitelio plano estratificado queratinizado y en ella se encuentran melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel (15%), pero en su mayoría queratinocitos (85%) que se especializan en sintetizar filamentos de queratina, proteína que proporciona rigidez, dureza y semiimpermeabilidad, esto con el fin de generar una membrana endurecida que funciona como escudo



**Figura 49. Esquema que muestra las capas de la piel y sus anexos. Referencias: Obtenido de Atlas de Histología celular y tisular, Sepúlveda Saavedra Julio; 2014.**

ante agentes agresores, de tal forma que se produce una capa superficial de células que son las que albergan la queratina y los lípidos; estas células continuamente se descaman y por tanto se deben renovar de forma regular (Montalvo, 2018).

La epidermis se divide en estratos que a continuación se describen:

- Estrato córneo

Es el estrato más superficial, compuesto por células anucleadas y sin organelos, pero con abundantes filamentos de queratina. Son células aplanadas y asemejan pequeñas escamas que se pueden desprender con facilidad y regularidad, este estrato se compone de 3-4 capas de células en piel delgada (carece de estrato lúcido) y de 40-50 en piel gruesa (palma de la mano y planta del pie) (Gartner y Hiatt, 2008).

- Estrato lúcido

Sólo se presenta en la epidermis de la piel gruesa y está formado por 2-3 capas de células (queratinocitos) planas carentes de núcleos, tienen un citoplasma claro y transparente que tiene afinidad con los colorantes ácidos (eosina), poseen un producto de la transformación de la queratohialina: la eleidina, que está impregnada de colesterol y mediante exocitosis, los lípidos se vierten al espacio intercelular del estrato córneo, proporcionando una capa impermeable y resistente (Gartner y Hiatt, 2008).

- Estrato granuloso

Está conformado por 3-5 capas de queratinocitos aplanados que contienen en el citoplasma gránulos de queratohialina que es precursora de la queratina y contiene profilagrina que en el estrato córneo se transforma en filagrina para ayudar a condensar los filamentos de queratina. Además, es la capa más externa con células nucleadas y tienen gránulos de recubrimiento de membrana, que se tiñen de azul oscuro con la hematoxilina o colorantes básicos y liberan una sustancia rica en lípidos que se vierten al espacio intercelular y ayudan a generar una barrera impermeable (Gartner y Hiatt, 2008).

- Estrato espinoso

Se constituye por células poliédricas o romboidales con actividad mitótica, puede estar integrado por 4-6 capas de células ( en piel gruesa) ó 2-3 capas (en piel delgada), los núcleos son redondeados/ovalados y se disponen en sentido horizontal, en el citoplasma de los queratinocitos (células espinosas) de esta zona hay filamentos intermedios de citoqueratina (queratina K1 y K10) en pequeños

haces que se pueden conectar con desmosomas, estructuras encargadas de relacionar a queratinocitos adyacentes formando puentes intercelulares, que se pueden observar al microscopio como espinas diminutas unidas. En este estrato se pueden encontrar células de Langerhans y tonofilamento que se agrupa en haces (tonofibrillas) y junto con el estrato germinativo o basal se conocen como el conjunto/ capa/ estrato/ red de Malpighi (Gartner y Hiatt, 2008).

- Estrato basal o germinativo

Es el estrato responsable de la regeneración continua de la epidermis por medio de la mitosis que sucede usualmente cuando es noche, se compone por células cilíndricas o cúbicas con citoplasma ligeramente basófilo y núcleo redondeado u ovalado, se pueden observar haces de tonofibrillas de queratina K5 y K14 (Gartner y Hiatt, 2008).

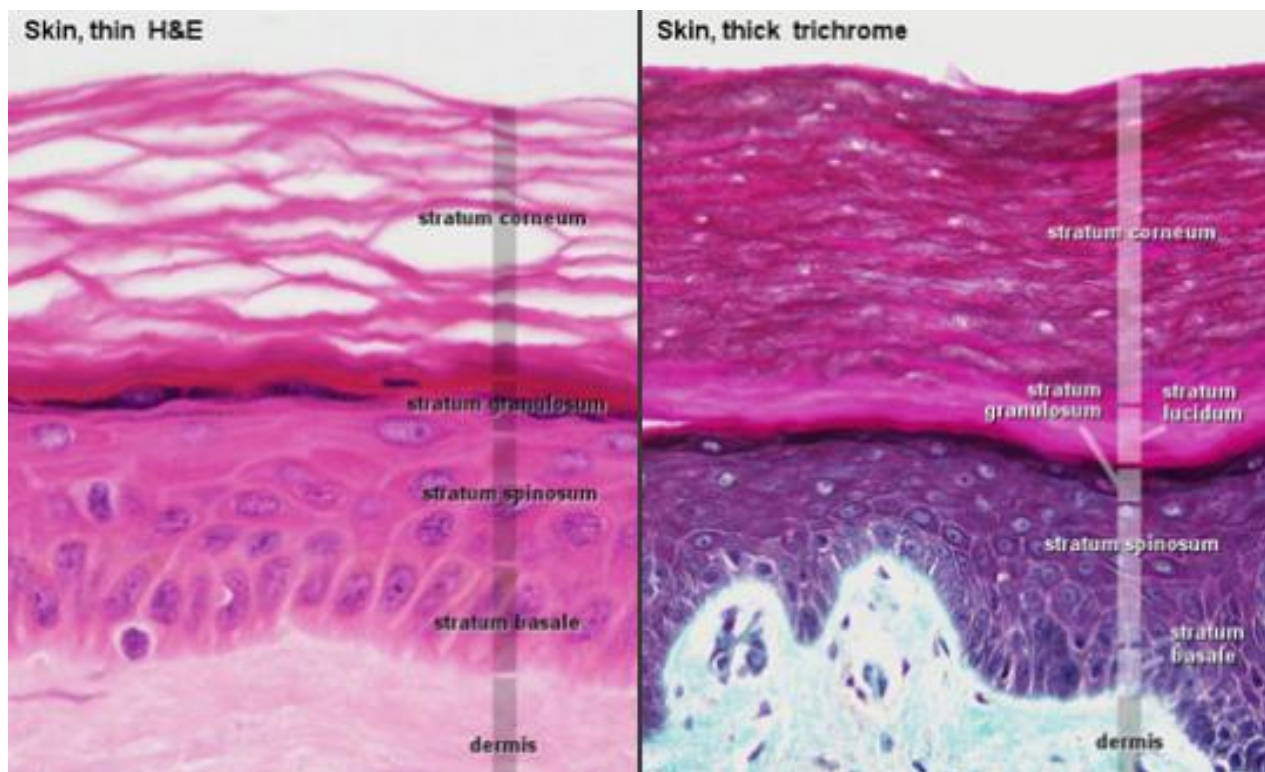


Figura 50. Estrato corneo, lucido, granuloso, espinoso y basal de epidermis en tinción H-E. Referencias: Obtenido de <https://www.auladeanatomia.com/novosite/es/sistemas/sistema-tegumentar/>

En la epidermis se encuentran células no epiteliales, que ayudan a mantener las funciones previamente mencionadas de la piel, algunos ejemplos son:

- Melanocitos: están en contacto con el estrato germinativo y la porción más superficial de la dermis, de este se extienden prolongaciones citoplasmáticas que se sitúan entre los queratinocitos, sintetizan y transfieren melanosomas (granulocitos de melanina) a los queratinocitos, produciendo de esta forma la pigmentación de la piel (Molist y Pombal, 2019).
- Células de Merkel: se localizan en la capa germinativa y la espinosa, son redondeadas un poco aplanadas, también se conocen como discos de Merkel, poseen un citoplasma claro, de la superficie de estas células se emiten prolongaciones citoplasmáticas que atraviesan la membrana basal y penetran entre los queratinocitos para establecer contactos muy estrechos por medio de desmosomas, además los discos intervienen en la captación de estímulos mecánicos (mecanoreceptoras), perciben el tacto fino y se encuentran en abundancia en los labios, fosas nasales, palma, yema y planta del pie (Molist y Pombal, 2019).

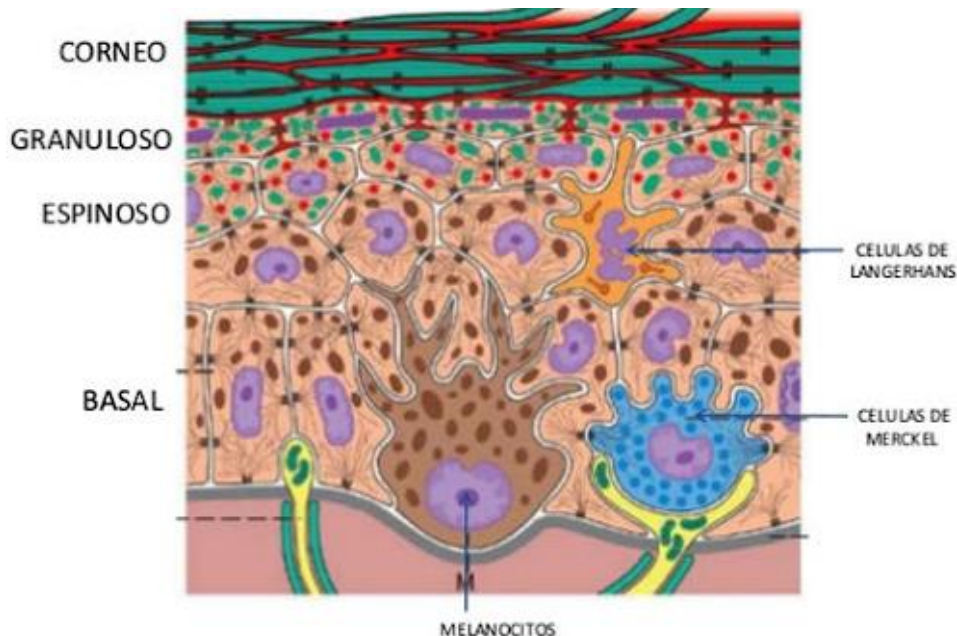


Figura 51. Representación esquemática de los componentes celulares de la epidermis y los estratos que la constituyen. Se distinguen los queratinocitos en varios estratos y las células colonizadoras: Melanocito, célula de Merkel y de Langerhans. Referencia: Obtenido de <http://bct.facmed.unam.mx/wp-content/uploads/2018/08/Sistema-tegumentario.pdf>

- Células de Langerhans: se ubican en la zona basal de la epidermis y ocasionalmente en la dermis. Presentan un núcleo plegado y un citoplasma donde destaca el gránulo de Langerhans, que es una invaginación de la membrana, su concentración en la epidermis es de 800-1000 mm<sup>2</sup>, constituyen del 2-4% de las células epidérmicas totales, su función es la presentación de antígenos, expresan anticuerpos IgA y receptores de superficie HLADR, FC y C3 asociados a respuestas inmunes. Se sitúan en el estrato germinativo y espinoso, su soma tiene forma poliédrica del cual emergen prolongaciones llamadas dendritas; forman parte del sistema celular que responde con autonomía a retos antigénicos llamado SALT (Molist y Pombal, 2019).
- Linfocitos: arriban a la epidermis para la intervención en las etapas iniciales de la respuesta inmunológica del organismo (Molist y Pombal, 2019).

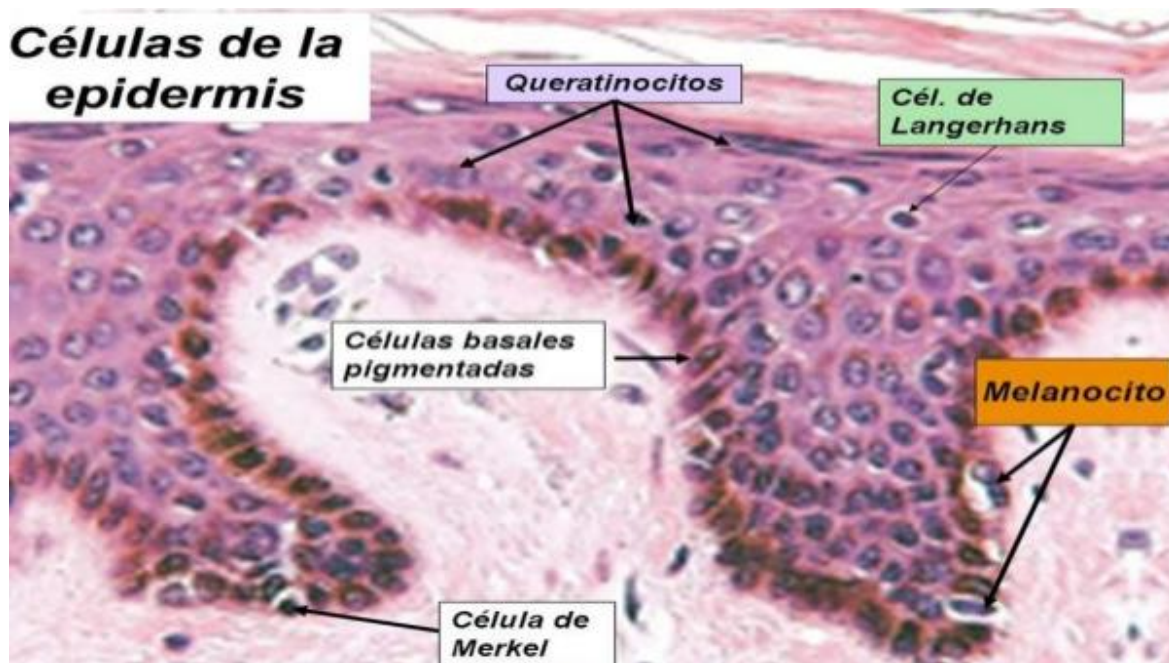


Figura 52. Componentes celulares de la epidermis, se distinguen los queratinocitos en varios estratos y las células colonizadoras: Melanocito, célula de Merkel y de Langerhans. Referencia: Obtenido de <https://www.slideshare.net/remaflosa6189/histologia-de-la-piel-61895173>

El estrato basal se apoya en una membrana que está en contacto directo con la dermis y es conocida como línea o superficie dermoepidérmica, se observa como una línea ondulada irregular producto de la emisión de crestas epiteliales de la epidermis hacia la dermis, específicamente hacia las papilas dérmicas que se encuentran vascularizadas (Montalvo, 2018).

#### B) Dermis

Se sitúa debajo de la epidermis, está integrada por tejido conectivo denso donde predominan haces de fibras de colágenas, reticulares y fibras elásticas, las primeras son las más numerosas y en el estrato papilar se ven como fibras delgadas, mientras que en el estrato reticular se observan más gruesas y se disponen en haces paralelos a la epidermis. Las fibras elásticas miden de 1-3 micras y se ven en tinción de resorcina-fucsina y su grosor también depende del estrato en el que se encuentren; las fibras reticulares miden de 0.2-1 micra de diámetro y son un tipo especial de colágena (III) (Navarrete Franco, 2003). La dermis alberga glucosaminoglicanos, mucopolisacáridos ácidos y abundantes vasos sanguíneos y linfáticos, el color sonrosado que se observa en personas con piel poco pigmentada se debe a la transparencia de la epidermis que deja translucir el lecho vascular. La dermis se compone de dos estratos:

- Estrato papilar

Es un estrato delgado de tejido conjuntivo laxo, su nombre se debe a las elevaciones llamadas papilas conjuntivas que se introducen en la epidermis y le dan un aspecto irregular a la línea dermoepidérmica, en ciertos casos generan surcos y concavidades que se hacen evidentes en las yemas de los dedos, conforman las huellas dactilares. Este estrato está integrado por haces finos y entrelazados de fibras de colágena (tipo I y III) y algunas elásticas, hay vasos sanguíneos y linfáticos, se encuentra muy vascularizado por las asas capilares e innervado por terminaciones nerviosas desnudas (mecanoreceptoras y nociceptoras) por los discos de Merkel y corpúsculos de Meissner; los capilares penetran por medio de las papilas conjuntivas hasta el la línea dermoepidérmica, donde liberan sustancias nutritivas necesarias para el metabolismo de las capas profundas de la epidermis (Montalvo, 2018).

- Estrato reticular

Es el estrato más grueso y profundo de la dermis, está conformado de una malla densa y resistente de tejido conjuntivo denso, también hay más fibras elásticas y más gruesas que en el papilar, se localizan fibroblastos, fibrocitos, macrófagos, linfocitos y entre los haces de fibras de colágena se encuentran arteriolas y vénulas de diámetro pequeño y en mayor cantidad que en el reticular, en este se sitúan terminaciones nerviosas que captan estímulos del tacto fino (discos de Merkel y corpúsculos de Meissner) y tacto profundo (corpúsculos de Paccini), que establece una relación muy estrecha con el sistema nervioso central (Montalvo, 2018).

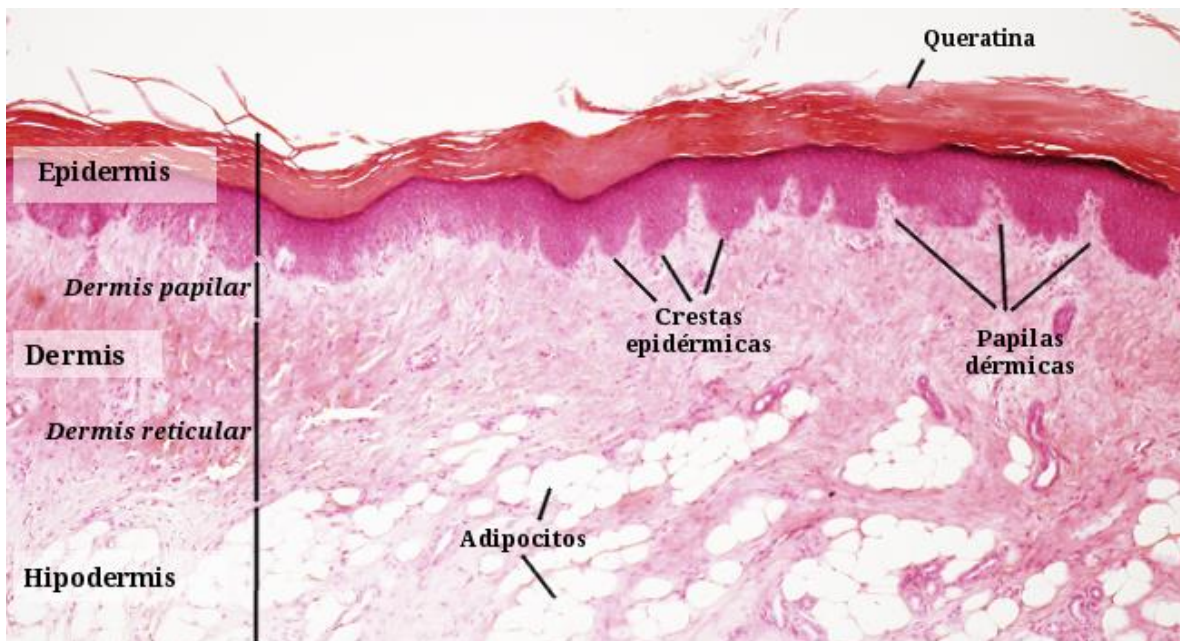


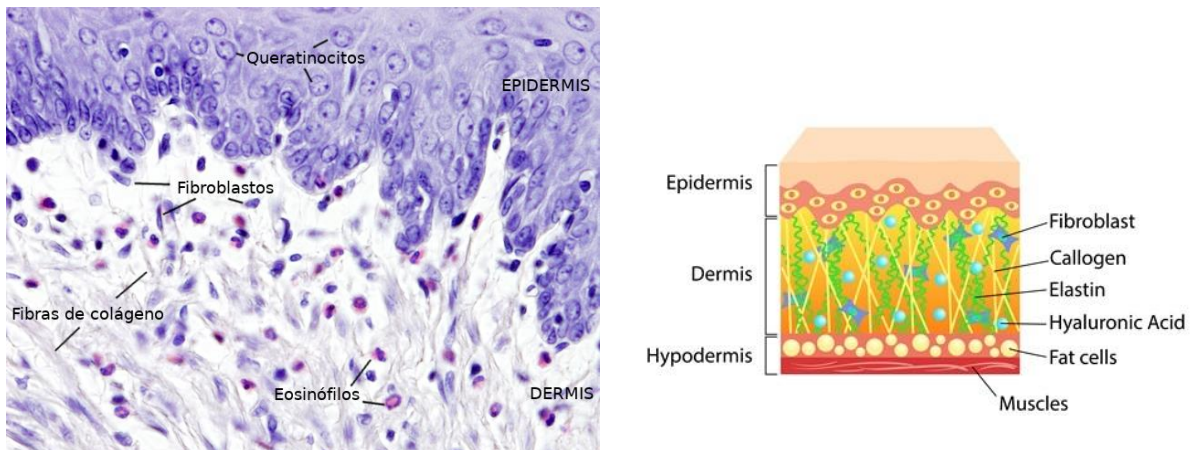
Figura 53. Estratos de la dermis, se distinguen las crestas epidérmicas y papilas dérmicas.  
Referencia: Obtenido de <https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/tegumento-piel-gruesa.php>

En la dermis se encuentra un tipo celular muy importante: el fibroblasto (fibrocito en estado de menor actividad) proporciona un conjunto de sustancias para la creación de un nuevo tejido, estas células sintetizan y liberan precursores de colágeno, elastina y proteoglicanos, los cuales maduran fuera de la célula hasta convertirse en fibras de colágena y elastina y la sustancia básica o fundamental de la matriz extracelular, que es gelatinosa y se compone de glicosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas; los compuestos que sintetizan los fibroblastos ayudan al mantenimiento de la homeostasis de la piel y pueden intervenir en la

cicatrización de heridas, acumulándose en los extremos y secretando matriz que servirá para reparar el tejido y formar cicatrices (Gartner y Hiatt, 2008).

El colágeno es un material biológico con alta capacidad de resistencia y es el 60-80% del peso del tejido en estado seco, hay cuatro tipos de este compuesto, pero en la dermis se encuentra en su mayoría el colágeno tipo I. Las fibras de colágena se desarrollan en dos etapas, la primera es intracelular donde se combinan los aminoácidos glicina, prolina/hidroxiprolina y un tercer aminoácido para formar una triple hélice, son secretados al espacio extracelular y con ayuda de algunas enzimas son transformados a fibras de colágeno (Gartner y Hiatt, 2008).

La elastina también es abundante en la dermis y es sintetizada por los fibroblastos y liberada al espacio extracelular para madurar con ayuda de las enzimas, elaboran un compuesto con zonas onduladas que hace que sea una cadena de polipéptidos de gran elasticidad y flexibilidad, gracias a estas características de las fibras de elastina la piel no se desgarrar con facilidad (Gartner y Hiatt, 2008).



**Figura 54. Fibras de colágena, elatina y fibroblastos en la dermis.**

Referencia: Obtenido de <https://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/fibroblasto.php>

Un dato interesante es que los fibroblastos tienen diferentes orígenes embrionarios según donde se ubique, los de la dermis de la cara provienen del ectodermo, los de la piel del dorso del mesodermo somático y los de la piel ventral del mesodermo lateral, además su origen y posición en el cuerpo y dermis va a condicionar su función y morfología. Los fibroblastos del estrato papilar producen fibras de colágeno más finas y de tipo I y II, además se ven más afectados por la edad que los del estrato reticular (Megías, Molist y Pombal, 2019).



Su morfología general se ve como células fusiformes con un abundante citoplasma basófilo que se verá morado en una tinción H-E, en fibrocitos el citoplasma es levemente acidófilo y se verá rosado en H-E, los fibroblastos se observan con prolongaciones citoplasmáticas que pueden ser cortas y anchas o largas, delgadas y ramificados, en este último caso, pueden interactuar con otros fibroblastos o neuronas, células musculares, endoteliales, leucocitos por medio de la matriz extracelular como intermediaria en la secreción de sustancias (Navarrete Franco, 2003).

### C) Hipodermis

También conocido como tejido subcutáneo, es similar a la dermis a diferencia que predomina el tejido conjuntivo laxo, sirve de unión flexible de la piel con los tejidos subyacentes, además dependiendo del organismo puede tener mayor o menor cantidad de tejido adiposo, en esta zona son abundantes los vasos sanguíneos de mayor calibre que en la dermis y epidermis, es la capa encargada de relacionar la piel con los tejidos más profundos como las fascias de los músculos (Montalvo, 2018).

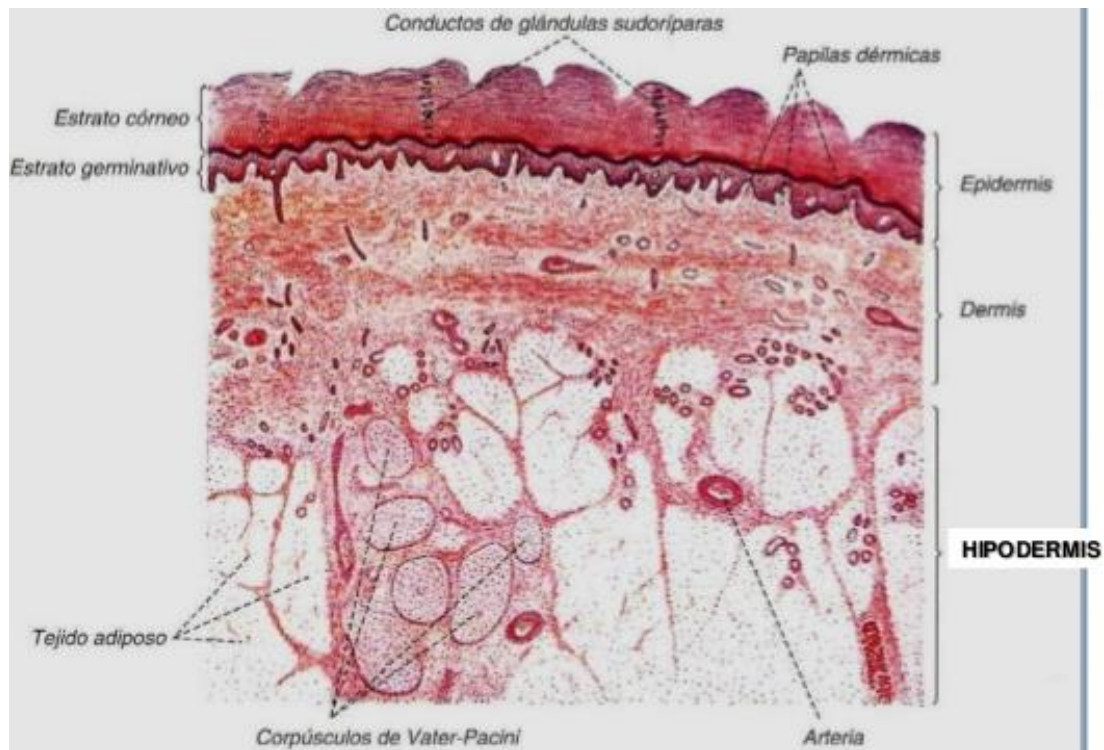
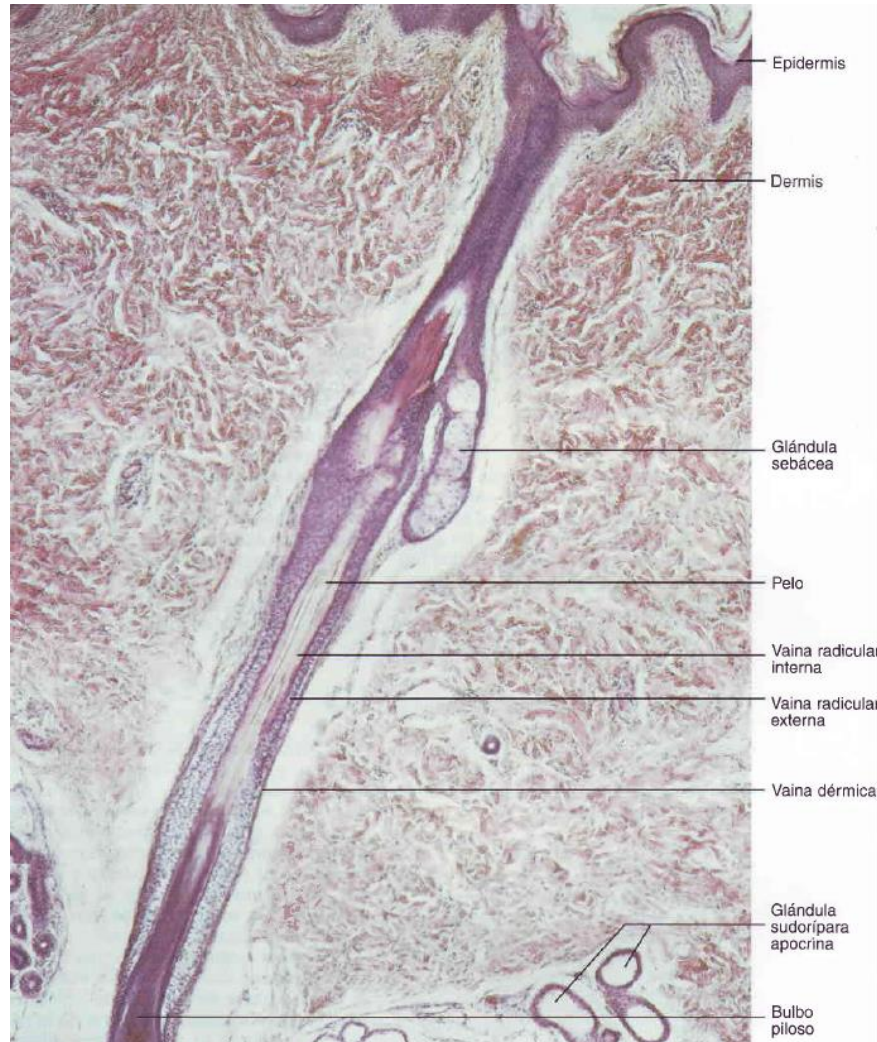


Figura 55. Componentes celulares de la hipodermis, se distinguen las arterias, corpúsculos de Paccini y tejido adiposo. Referencia: Obtenido de <https://pt.slideshare.net/iramaparra14/piel-y-glandula-mamaria/25>

## D) Anexos de la piel

### • Pelo

Están formados por células altamente queratinizadas y por esta razón son filamentos duros, cada pelo se encuentra en una invaginación de la epidermis, conocido como folículo piloso introducido en la dermis y en ocasiones llega hasta la hipodermis, es una estructura epitelial que está rodeada de una capa de dermis denominada vaina conjuntiva del pelo; la parte más



**Figura 56. Folículo piloso y glándula sebácea visto en microscopio en tinción H-E. Referencia: Obtenido de <http://histologia-uaeh.blogspot.com/2011/10/practica-15-piel-cuero-cabelludo-pelo.html>**

profunda del folículo es el bulbo piloso, que se compone de varias estructuras (Gartner y Hiatt, 2008):

-Papila dérmica: es tejido conectivo laxo, vascularizado e innervado, que proporcionan nutrientes y la sensibilidad al pelo, es la responsable del crecimiento del pelo.

-Matriz capilar: da origen al pelo y la vaina radicular interna, las células tienen un citoplasma basófilo y entre ellos están los melanocitos que transferirán sus gránulos de melanina a las células epiteliales para darle el color al pelo.

-Pelo: microscópicamente está integrado por la médula, corteza y cutícula, las últimas dos son las más queratinizadas, la primera sufre una queratinización gradual debido a la pérdida de los núcleos produciendo una queratina dura, la cutícula se sitúa por fuera de la corteza.

-Vainas radicales: Se dividen en interna y externa, la primera se constituye por tres capas: cutícula, capa de Huxley y Henle, las cuales se queratinizan y después se desintegran cuando llegan al istmo (zona que se encuentra después del bulbo piloso). La externa se extiende desde el bulbo hasta la desembocadura del conducto sebáceo, sus células son de citoplasma claro y al nivel del istmo se queratiniza.

El istmo es una estructura que se encuentra sobre el bulbo piloso y comprende desde la desembocadura del conducto sebáceo hasta la inserción con el músculo erector del pelo y es la porción más corta del folículo. El infundíbulo va desde la desembocadura del conducto sebáceo hasta el orificio folicular y se queratiniza por medio de gránulos queratohialinos (Montalvo, 2018).

- Glándulas sebáceas

Tienen la forma de un saco pequeño o un conducto corto que se incorpora al conducto del pelo, es decir, crecen y se desarrollan estrechamente con los folículos pilosos, aunque hay algunas que son independientes al folículo. Las glándulas sebáceas secretan sebo, que lubrica la superficie de la epidermis y forma una ligera capa impermeable al agua, su secreción es holocrina (la célula es parte del producto secretorio) por tanto se necesita una constante reposición de células, las glándulas sebáceas son grupos de acinos que se componen de células basales pequeñas que rodean a otras más grandes (Navarrete Franco, 2003).

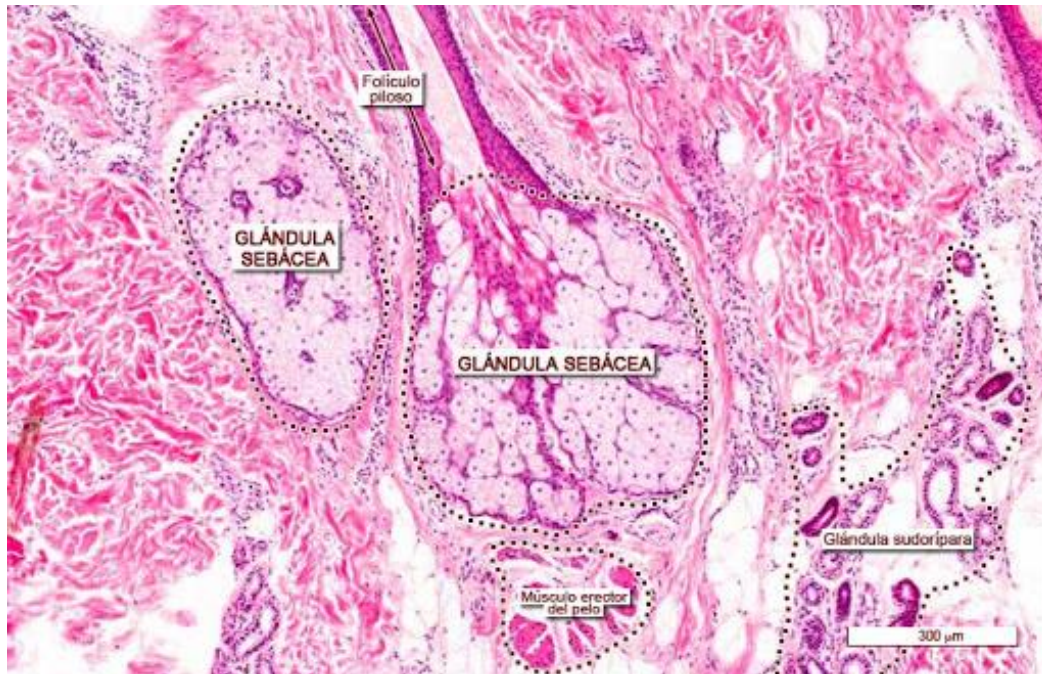


Figura 57. Corte a 300 μm, glándula sebácea asociada a folículo piloso y músculo erector del pelo, a la derecha se encuentra la glándula sudorípara. Referencia: Obtenido de [http://wzar.unizar.es/acad/histologia/paginas\\_he/](http://wzar.unizar.es/acad/histologia/paginas_he/)

- Glándulas sudoríparas

Se denominan atricas o ecrinas debido a que no están relacionadas con los folículos pilosos, son productoras de una secreción acuosa, abundante, trasparente y con alto contenido de cloruro de sodio, cuando la temperatura del cuerpo o del ambiente se incrementa la secreción también lo hace, por lo tanto, es una glándula cuya secreción regula la temperatura corporal y el equilibrio químico, además son merocrinas debido a que sólo excretan sin afectar a las células secretoras. Estas glándulas se caracterizan porque la zona secretora forma un glomérulo u ovillo situado generalmente en el estrato reticular y en la hipodermis, es decir, la zona está en unión dermohipodérmica, está compuesta por estructuras con una sola capa de células claras y oscuras, las células mioepiteliales recubren a las secretoras y son las responsables de la contracción para que el sudor sea producido. La porción conductora o excretora está constituida por dos hileras de células epiteliales cuboidales basófilas, esta porción se forma por a) células oscuras que tienen forma cónica con el ápice hacia el interior del epitelio y la base orientadas hacia la glándula, b) células claras adoptan forma cúbica piramidal, la base tiene abundantes

pliegues y su citoplasma carece de gránulos de secreción. Atraviesa todos los estrados de la dermis y epidermis para dirigir la secreción al exterior, sin embargo, en la epidermis cambia su morfología a una disposición en espiral, denominada acrosiringio que se forma por una capa de células internas y dos o tres capas de externas, para desembocar en la superficie de la piel (Montalvo, 2018).

- Glándula sudorípara aromática o de olor

Secretan sudor denso, escaso, opaco con sustancias aromáticas que cuando entran en contacto con oxígeno y algunas bacterias le confieren un olor característico a esa zona. También son conocidas como glándulas apocrinas porque en el momento de la secreción se desprende la porción apical de la célula con el producto de excreción, son 10 veces más grandes que las ecrinas hasta 200 micras de diámetro, también se consideran epitricas debido a que su conducto de secreción termina en el folículo piloso y glándulas sebáceas formando las unidades polisebáceas; las células del conducto tienen más queratina que las secretoras. La sección secretora está formada por una hilera de células secretoras y otra externa que son las mioepiteliales, la sección excretora es igual a de las glándulas ecrinas, comprende un conducto que atraviesa la dermis y se constituye por dos capas de células y termina en el infundíbulo y desemboca sobre el conducto sebáceo (Gartner y Hiatt, 2008).



Figura 58. A la izquierda se ven las glándulas sudoríparas y a la derecha las glándulas sudoríparas del olor. Referencia: Obtenido de <https://es.slideshare.net/FabricaCorporea/piel-exposicion>.

- Glándulas mamarias

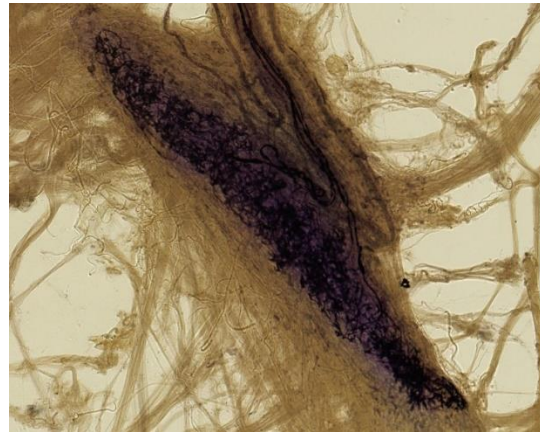
Son el resultado de la interacción entre la epidermis y el tejido mesenquimatoso, primero se establece como un engrosamiento epidérmico llamado cresta mamaria presente en ambos sexos, pero durante la pubertad y el proceso de gestación la glándula sufre cambios en tamaño, desarrollo tisular y función a causa del crecimiento de yemas mamarias que se proyectan hacia al mesénquima subyacente induciendo la proliferación, crecimiento y desarrollo de células epidérmicas de la cresta mamaria (Montalvo, 2018).

- Uñas

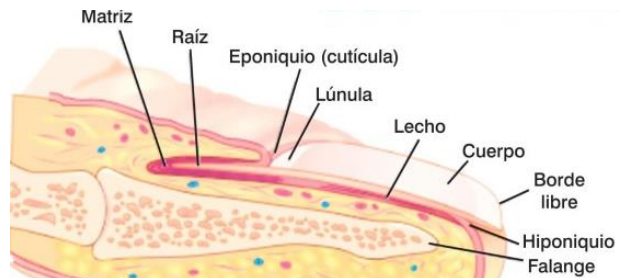
Se ubican en la superficie dorsal de las falanges de los dedos, presenta un ligero color rosa por la vascularización abundante que hay en la dermis, se compone de varias capas de células epiteliales queratinizadas aplanadas provenientes del estrato córneo, debajo de las uñas se encuentra el estrato granuloso, espinoso y basal; por encima de la uña se encuentra la lúnula, una banda blanca semicircular en la base y sobre esta se encuentra un pliegue que es la cutícula (Montalvo, 2018).

- Corpúsculos de Ruffini

Tienen la capacidad de captar estímulos de tacto y presión, son fibras nerviosas que se ramifican y adoptan una forma alargada, están rodeadas de finas capas de tejido conectivo, fibroblastos y células de Shwann, se localizan en la dermis e hipodermis (Montalvo, 2018).



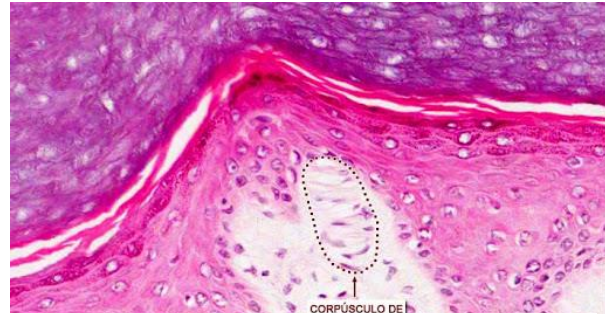
**Figura 59. Componentes de la uña.** Referencia: Obtenido de <https://anLaura.pb.studio/ua>



**Figura 60. Imagen del corpúsculo de Ruffini.** Referencia: Obtenido de [https://es.wikipedia.org/wiki/Corp%C3%BAsculos\\_de\\_Ruffini](https://es.wikipedia.org/wiki/Corp%C3%BAsculos_de_Ruffini)

- Corpúsculos de Meissner

Son fibras nerviosas sin vaina de mielina y ramificadas en zigzag, rodean una capa fina de tejido conectivo y entre ellas se encuentran células de Schwann, pueden captar estímulos del tacto superficial, abundan en las yemas de los dedos, palmas y pezones, estos corpúsculos tienen forma ovoide y están en el estrato papilar de la dermis (Montalvo, 2018).



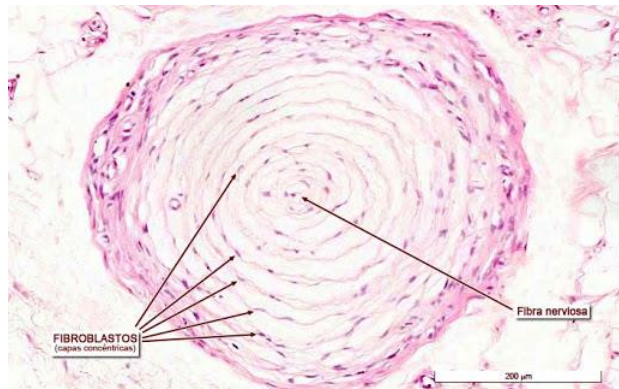
**Figura 61. Imagen del corpúsculo de Meissner.**  
 Referencia: Obtenido de [http://wzar.unizar.es/acad/histologia/paginas\\_hg/10\\_TejNerv/CorpMeis\\_40etq.htm](http://wzar.unizar.es/acad/histologia/paginas_hg/10_TejNerv/CorpMeis_40etq.htm)

- Corpúsculos bulbosos

Son capaces de percibir sensaciones del tacto profundo o presión y son ramificaciones de la fibra nerviosa que es envuelta por una fina cápsula de tejido conjuntivo ovoide y llena de líquido denso, se encuentran en la hipodermis, en la piel de los genitales externos, fosas nasales y abertura bucal (Montalvo, 2018).

- Corpúsculos de Paccini

Es una fibra nerviosa que se desprende de su vaina de mielina y rodea láminas conjuntivas concéntricas y de fibroblastos, se localizan en el estrato reticular de la dermis y en la hipodermis, estos pueden captar estímulos de presión (tacto profundo) (Montalvo, 2018).



**Figura 62. Imagen de los corpúsculos de Paccini.**  
 Referencias: Obtenido de [http://wzar.unizar.es/acad/histologia/paginas\\_hg/10\\_TejNerv/CorpMeis\\_40etq.htm](http://wzar.unizar.es/acad/histologia/paginas_hg/10_TejNerv/CorpMeis_40etq.htm)

- Vasos sanguíneos

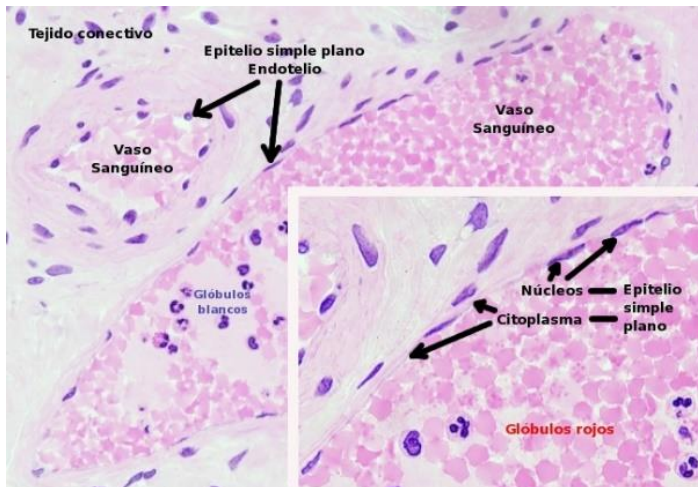


Figura 63. . Imagen de vasos sanguíneos. Referencia: Obtenido de <https://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/endotelial.php>

Son arteriolas y vénulas que se distribuyen en un plexo subpapilar y dos plexos rodeando los folículos pilosos y glándulas ecrinas, estos plexos originan capilares que invaden toda la dermis, estos se forman por una hilera de células endoteliales (Molist y Pombal, 2019).

Las arteriolas y venas poseen tres capas a) íntima de células endoteliales y lámina elástica interna, b) media de células musculares y c) adventicia de tejido conectivo. Las venas son más delgadas y por tanto es más difícil apreciar todas las capas (Molist y Pombal, 2019).

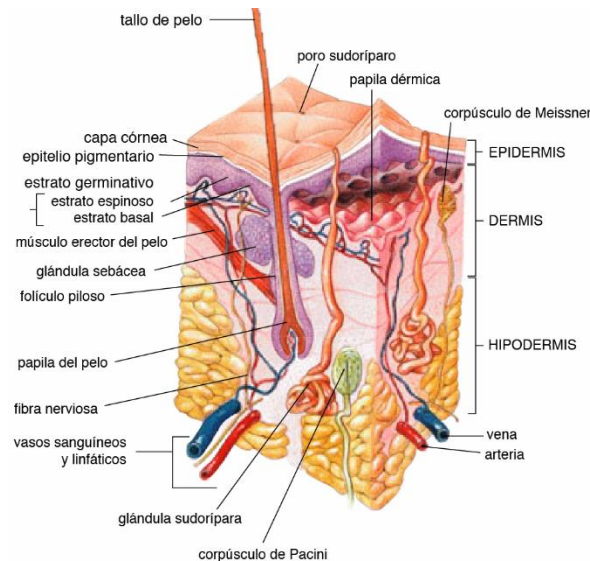


Figura 64. Capas de la piel y sus anexos. Referencia: Obtenido de [https://www.wikiwand.com/es/Papila\\_d%C3%A9rmica](https://www.wikiwand.com/es/Papila_d%C3%A9rmica)



## PROCESO DE CICATRIZACIÓN

El proceso de cicatrización es una secuencia de eventos que depende de la dinámica celular del tejido lesionado y el circundante. Algunos agentes patógenos pueden entorpecer el proceso de cicatrización, como lo son los estafilococos, enterococos y estreptococos, también pueden hacerlo algunos hongos y parásitos, las infecciones por microorganismos se dividen en tres fases, las primeras dos fases: contaminación y colonización son la proliferación en la superficie de la herida y no interfieren con la cicatrización, pero la fase de infección sí obstaculiza el proceso debido a la invasión de los tejidos sanos que se encuentran en la periferia y los subyacentes que provocan reacciones como fiebre, eritema, pus y retraso de la reparación del tejido. De acuerdo con los estudios de Robson, se considera como herida infectada cuando hay más de 10<sup>5</sup> microorganismos/g de tejido y se considera un signo clínico de infección el retraso de la cicatrización. Existen 4 etapas para la cicatrización, las cuales son: fase vascular, fase inflamatoria, fase proliferativa y por último la fase de maduración, a continuación, se describe cada una (Ramírez-Hernández, 2010).

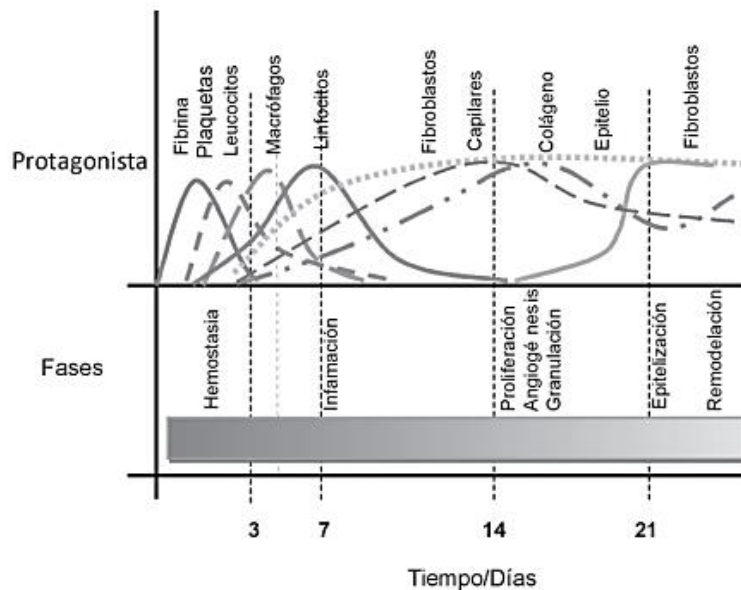


Figura 65. Fases de la cicatrización y su respectivo protagonista. Referencia: Obtenido de <https://core.ac.uk/download/pdf/229704582.pdf>

## 1. Fase vascular

Cuando se genera una herida en la piel hay ruptura vascular, la sangre penetra en la herida por los vasos sanguíneos dañados y retira por arrastre los cuerpos extraños para prevenir una infección, unos segundos después se contraen los vasos para reducir el sangrado y se activan los mecanismos de coagulación y la agregación plaquetaria (Flores-Rivera et al., 2014).

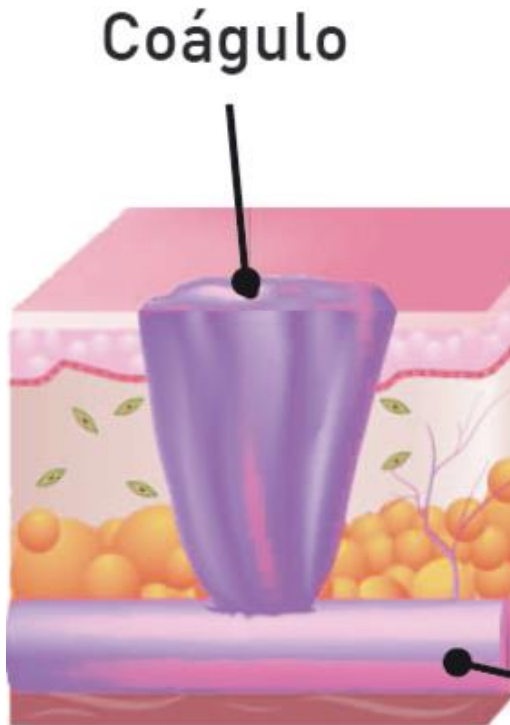
El primer evento que ocurre en la coagulación es la hemostasia primaria, que son fenómenos que combaten y detienen el sangrado de una lesión vascular, aquí la extravasación sanguínea aporta, por medio de la vasoconstricción, el fibrinógeno, fibronectina, trombospondina, vitronectina, trombina y factor de Von Willebrand, que junto con el colágeno extravascular contribuyen a la formación de coágulos de fibrina, producto final de las vías intrínseca y extrínseca de la coagulación. Luego las plaquetas se adhieren unas con otras para formar un tapón y detener la hemorragia, para continuar con el proceso de coagulación y estabilizar el coágulo, las plaquetas liberan gránulos de lisosomas y cuerpos densos de proteínas como la trombospondina, fibronectina, factor plaquetario, proteasas y ácido araquidónico (Senet, 2007; Zárate et al., 2018).

Para que suceda la vasoconstricción, las células endoteliales producen endotelina, bradicidina y fibrinopéptidos que inducen la contracción del músculo liso, además las plaquetas liberan serotonina y tromboxano A<sub>3</sub> que se unen a los receptores de las células endoteliales ayudando a la vasoconstricción, también se produce el factor Von Willebrand que sirve para entrelazar las plaquetas y las proteínas de la cascada de coagulación, por otro lado, las células lesionadas producen tromboplastina tisular, factor III tisular o de contacto para activar los factores de la cascada de coagulación (Ramírez-Hernández, 2010; Flores-Rivera et al., 2014).

El segundo evento es la hemostasia secundaria, donde van a participar proteínas, lípidos y iones de calcio para formar un gel insoluble de fibrina en el vaso sanguíneo roto, para esto es necesario que las plaquetas estén congregadas para iniciar las reacciones enzimáticas. De la interacción de los vasos lesionados y plaquetas se forma un tapón hemostático primario, que sirve de matriz provisional que permite la migración de células inflamatorias, dérmicas y epidérmicas en la herida con ayuda

de la fibronectina, trombina y trombospondina (Arenas, 2003; Flores-Rivera et al., 2014).

La hemostasia secundaria se divide en tres etapas, la primera es la actividad trombotástica donde interactúa el sistema extrínseco (calcio + factor tisular + proconvertina) y el sistema intrínseco, que incluye factor de contacto que activa factor antecedente de la trombotástica plasmática y con ayuda del calcio se



## Coágulo

## Coagulación

Figura 66. Primera fase del proceso de cicatrización. Referencia: Obtenido de <https://www.douglaslabs.es/blog/terapia-enzimatica-sistemica-en-el-proceso-de-cicatrizacion/>

produce trombotástica plasmática que activa al factor antihemofílico por medio de calcio y fosfolípidos; los dos sistemas contribuyen a la activación de la tromboquinasa, que actuará en conjunto con la proacelerina y el calcio para que encienda la actividad de la trombotástica, es aquí donde inicia la segunda fase, y produzca trombina mediante la unión de calcio a la protrombina; una vez sintetizada la trombina, da pie a que comience la tercera y última fase de la hemostasia secundaria: el fibrinógeno sufre hidrólisis por acción de la trombina y como producto se generan monómeros de fibrina que formarán un polímero de fibrina que es el coágulo, este con ayuda del factor estabilizador de fibrina (activado por la trombina) y el calcio formarán, como producto final de esta etapa, un polímero fisiológico de fibrina con enlaces cruzados (Balderas et al., 2019; Lucha-Fernández et al., 2008).

En la red de fibrina-fibronectina se encuentra el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDFG), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y factor de crecimiento transformante  $\alpha$  y  $\beta$  ( $\alpha/\beta$ TGF), los cuales son los responsables de la emigración y activación de los neutrófilos polimorfonucleares y macrófagos que son

parte del sistema inmune que combatirán las infecciones mediante las enzimas y los radicales libres que producen, junto con las plaquetas son la fuente principal de citocinas y factores quimiotácticos. Esta fase tiene una duración de quince minutos. La coagulación termina cuando el coagulo es eliminado mediante el sistema de fibrinólisis fisiológica, cuando la cicatrización del vaso es estable, pero esto ocurre hasta la fase de proliferación del proceso de cicatrización (Guarín-Corredor et al., 2013; Balderas, C. D., 2020).

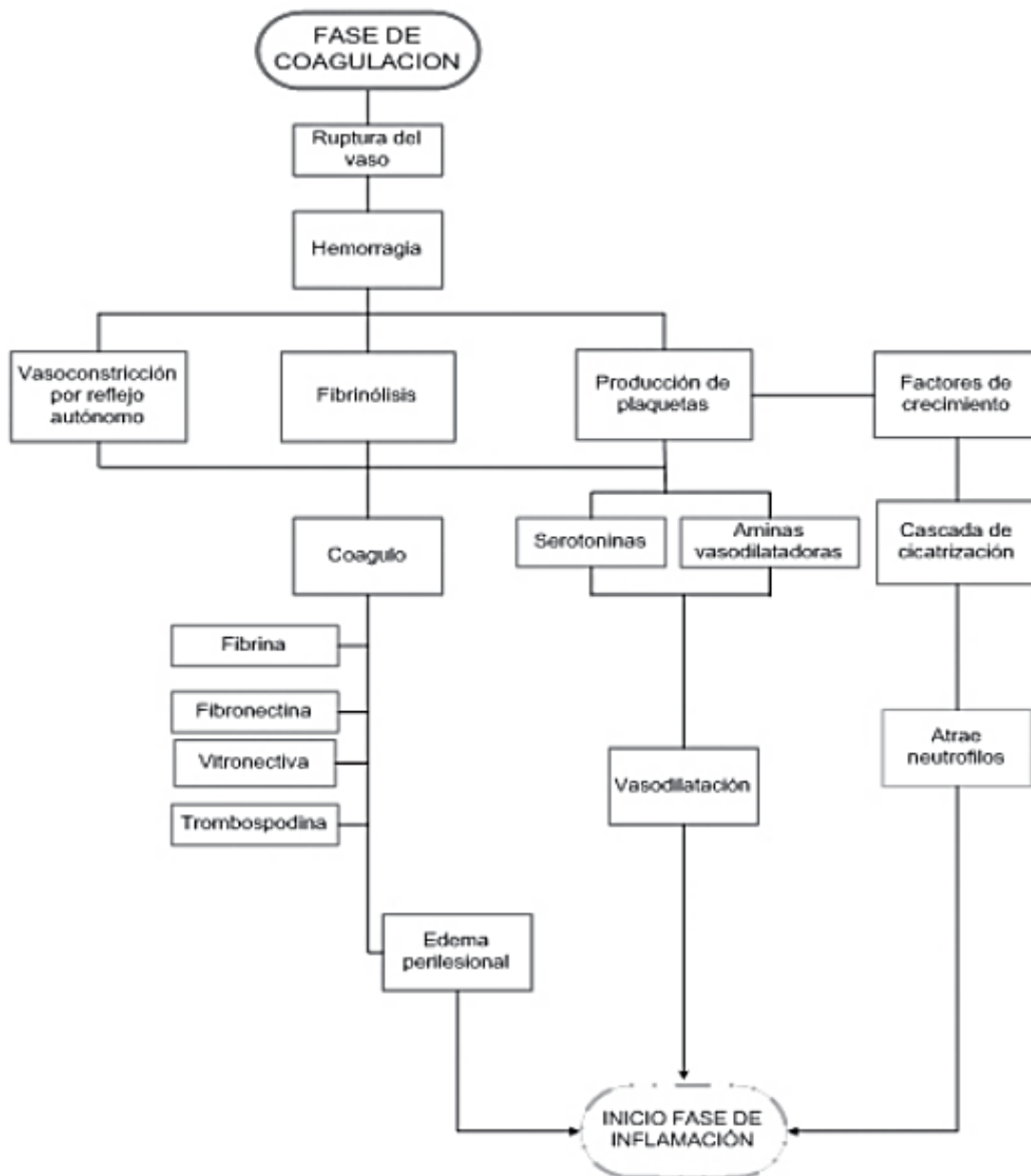


Figura 67. Fase de coagulación. Referencia: Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v61n4/v61n4a14.pdf>

## 2. Fase inflamatoria

Inicia en el minuto 16 y puede durar hasta seis días; la inflamación se caracteriza por la formación de un exudado y enrojecimiento de la piel circundante que se presenta como una respuesta protectora para destruir o aislar agentes que sean un peligro o comprometan la cicatrización, después de la fase vascular donde el tejido sufrió una vasoconstricción rápida, la zona de la lesión pasa a una vasodilatación que depende de numerosos factores (histamina, derivados del complemento C3a y C5a y prostaglandinas) y permite que las células circundantes lleguen al foco de la herida, como los polimorfonucleares y monocitos que también se ven atraídos a la herida por la presencia de bacterias, factores del complemento y productos de degradación de fibrina. Los neutrófilos son captados y reducen su velocidad debido a las selectinas y moléculas de adherencia que expresan las células endoteliales (Arenas, 2003; Wang et al., 2018).

Los leucocitos expresan integrinas B2, lo que permite que se refuercen las interacciones con las células endoteliales y aumente su diapédesis hacia la herida; los neutrófilos son los primeros en llegar a la zona lesionada debido a que son las células de defensa que más abundan en la sangre (son del 45-65% de la fórmula blanca), los neutrófilos son atraídos por las células de Langerhans, factores de agregación plaquetaria e interleucina segregados durante la coagulación y liberan proteasas como elastasa y colagenasas para abrirse paso y penetrar a través de las células hasta la herida, donde se dan las interacciones célula-célula y célula-matriz favorecidas por las integrinas, los polimorfonucleares ejercen una actividad antimicrobiana local mediante hidrolasas, proteasas, lisozimas y radicales libres, además ayudan a limpiar la zona de células muertas y producen citocinas proinflamatorias que intervienen en la producción y atracción de fibroblastos y queratinocitos. Finalmente, los neutrófilos quedan atrapados en el coágulo y se desecan junto con él y los que permanecen en un tejido viable mueren por apoptosis y luego son removidos por los macrófagos o los fibroblastos (Balderas et al., 2019; García; Ramírez-Hernández, 2010; Valencia, 2010).

Por su parte, los monocitos se fijan a las células endoteliales, migran a la herida y cuando llegan al área dañada se diferencian a macrófagos, reemplazan a los

neutrófilos, estimulados por factores quimiotácticos (fragmentos de colágeno, elastina, fibronectina, trombina, TGF-1 y productos de degradación de la matriz), ahí se adhieren a las proteínas de la matriz extracelular por medio de las integrinas, estas células también tienen función antimicrobiana debido a su capacidad de fagocitosis, habrá macrófagos cuya función será el desbridamiento del tejido dañado, pero otro sufrirá un cambio genético en su RNAm y su función será participar en la remodelación de la matriz como fuente de citocinas proinflamatorias: interleucina (IL 1), factor de necrosis tumoral A (TNF- $\alpha$ ) y de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1), factor de crecimiento transformado b (TGF- $\beta$ ) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), estos compuestos pueden amplificar la inflamación, estimular la proliferación de fibroblastos y producción de colágeno, angiogénesis y, por ende, la formación del tejido. Las plaquetas, las células endoteliales y las células inflamatorias liberan mediadores como interleucinas y los factores de crecimiento para pasar a la fase de proliferación. En la siguiente figura se muestran algunos factores de crecimiento, las células que los producen, las células blanco y su acción (Senet, 2007; Guarín-Corredor et al., 2013).

Factor	Fuente	Blanco	Acción
TGF $\beta$	Todas las células	Todas las células	Fibrosis Fibrosis
TGF $\alpha$	Plaquetas Queratinocitos Macrófagos	Cel. epiteliales Fibroblastos Cel. endoteliales	Proliferación
PDGF	Plaqueta Macrófagos Fibroblastos Endoteliales Músculo liso	Neutrófilo Macrófagos Fibroblastos Músculo liso	Quimiotaxis Proliferación Síntesis de colagenasa
FGF	Macrófagos Fibroblastos Endoteliales	Endoteliales Epiteliales Fibroblastos Condrioblastos	Proliferación Quimiotaxis Angiogénesis
EGF	Plaquetas Macrófagos Queratinocitos	Epiteliales Endoteliales Fibroblastos	Proliferación Quimiotaxis
IGF-I/Sm-c	Fibroblastos	Fibroblastos Endoteliales	Mitosis Síntesis de colágeno
IL-1 Quimiotaxis	Macrófagos	Fibroblastos Neutrófilos	Proliferación Síntesis de colagenasa
<small>Abreviaturas: TGF<math>\beta</math>, factor de crecimiento transformador<math>\beta</math>; TGF<math>\alpha</math>, factor de crecimiento transformador-<math>\alpha</math>, PDGF, factor de crecimiento derivado de las plaquetas; FGF, factor de crecimiento de fibroblastos; EGF, factor de crecimiento epidérmico; IGF-I/Smc, factor de crecimiento similar a la insulina-I/Somatomedina-C; IL-1, interleucina-1.</small>			

**Figura 68. Factores de crecimiento en cicatrización. EGF es factor de crecimiento epidérmico (error en la imagen). Referencia: Obtenido de <http://www.actamedicacolombiana.com/anexo/articulos/pdf>.**

Las endotoxinas bacterianas activan la liberación de interleucina 1, que junto con el TNF- $\alpha$  son producidos por los macrófagos y neutrófilos, a su vez se estimula la producción de óxido de nitrógeno (NO) que contribuye a la actividad antimicrobiana, ejerce una función inmunomoduladora y estimula la proliferación y migración de los queratinocitos. Por su parte, los factores de crecimiento que producen los macrófagos son los encargados de iniciar y estimular la proliferación de las células endoteliales y los fibroblastos, el PDGF es un factor potente que induce la multiplicación de estas últimas células. Esta fase no sólo ayuda a defenderse de agentes agresores externos, si no que atrae a las células inmunitarias que van a dirigir los procesos de síntesis para producir la cicatriz (Senet, 2007; Kumar et al.,

2008; Zhao et al., 2016).

Se debe resaltar la importancia de los macrófagos, ya que son los responsables de segregar la mayoría de las sustancias que favorecen la cicatrización, por tanto, son indispensables en la transición de la fase inflamatoria a la de proliferación. Después de 48-72 de la lesión en la piel, las células que predominan son los macrófagos, superando en número a los neutrófilos, al quinto y séptimo día estas células son escasas y son los fibroblastos los que se ven en abundancia (Zárate et al.,

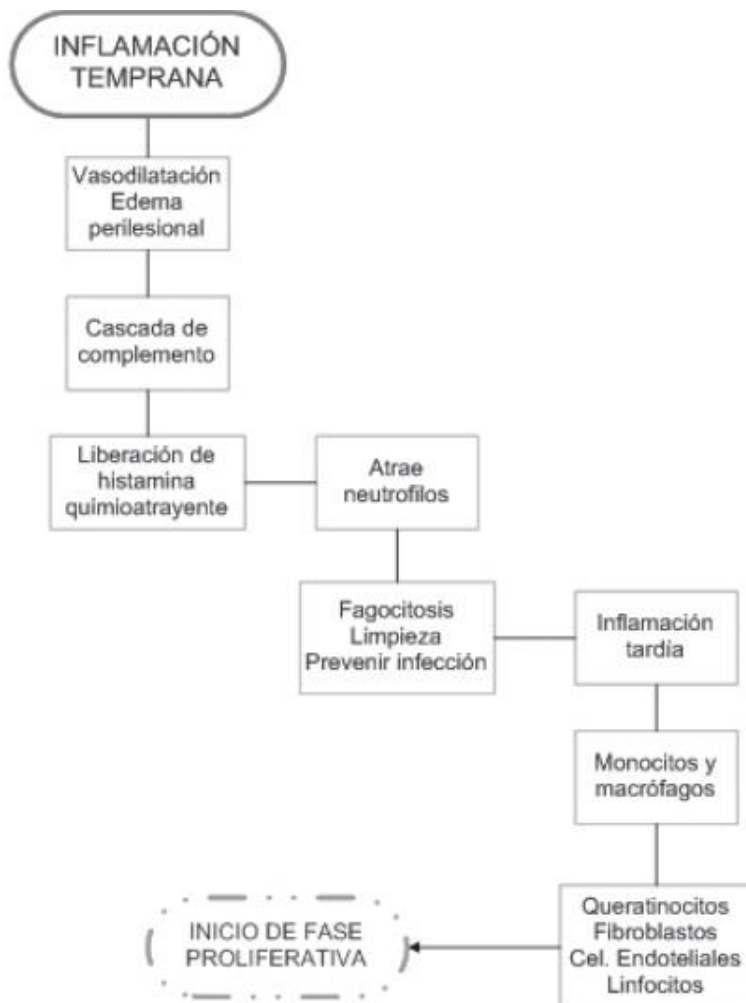


Figura 69. Fase de inflamación. Referencia: Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v61n4/v61n4a14.pdf>.

2018; Lucha-Fernández et al., 2008).

### 3. Fase de proliferación

Esta comienza entre los 3-5 días después de la lesión y dura de 10-20 días según la profundidad y el tamaño de la herida, comprende la angiogénesis, síntesis de matriz extracelular y proliferación de fibroblastos. La migración de las células endoteliales es posible a través de los vasos sanos más cercanos que las liberan como células con pseudópodos, permitiendo que se formen capilares nuevos (angiogénesis) que se diferenciarán en vénulas y arteriolas que lleven el oxígeno y los nutrientes necesarios a las células que repararan el tejido, las células endoteliales deben van a invadir la matriz provisional rica en fibronectina y fibrina, componentes necesarios para la migración además de las interacciones de las células endoteliales con las citocinas angiogénicas (FGF- $\beta$  sintetizado por fibroblastos, macrófagos y células endoteliales y TGF- $\beta$ , angiopoyetinas y el factor de crecimiento del endotelio vascular VEGF) y la organización tridimensional (Wang et al., 2018).

Las angiopoyetinas 2 interactúan con un receptor de las células endoteliales haciéndolas más laxas y disminuyendo su contacto con la matriz, el FGF- $\beta$  estimula la síntesis de matriz provisional, lo que facilita la migración e induce el fenotipo adecuado para la motilidad, el VEGF liberado por los macrófagos estimula a las células endoteliales de los capilares vecinos a migrar a la zona dañada; por otro lado, la proteína ácida, trombospondina, tenascina favorecen la angiogénesis y ayudan a la migración. También son indispensables los receptores de integrinas, fibrina y fibronectina en las células endoteliales, así como la hipoxia tisular para estimular la angiogénesis, a la cual también contribuyen algunas proteasas que degradan la matriz extracelular; estas células expresan receptores a todos los factores y compuestos previamente dichos lo que permite que la respuesta se vea en la zona precisa; entonces se forma una red capilar que disminuye progresivamente en el tejido a medida que se va sintetizando más colágeno, los macrófagos serán los encargados de reabsorber el coágulo y dar paso al tejido de granulación para que se forme la cicatriz (Kumar et al., 2008).

La migración y multiplicación de los fibroblastos dependen de las citocinas producidas por las plaquetas y macrófagos, en especial del factor de crecimiento



epidérmico (FGF), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-1), factor de crecimiento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), así como los propios fibroblastos por estimulación autocrina. La interleucina secretada por los leucocitos activa la síntesis de las moléculas de la matriz extracelular por los fibroblastos, TGF- $\beta$  induce el aumento de la síntesis de matriz y la disminución de la degradación misma (Senet, 2007; Balderas et al., 2019).

Los fibroblastos van a moverse desde la dermis hacia el tejido lesionado o provienen de células mesenquimales poco diferenciadas ubicadas en los vasos sanguíneos y conforme los nuevos capilares penetran la herida estas se desplazan y a la par se dividen para aumentar su número, cuando llegan al área se reproducen y comienzan a secretar una nueva matriz. Para abrirse paso en una zona ocupada por un coagulo de fibrina polimerizada se requiere de proteasas séricas y colagenasas que van a ser reguladas por el PDGF para controlar la degradación de la matriz, que es un tejido conectivo que reemplaza al perdido o dañado y recibe nombre de tejido de granulación debido a su aspecto granular, está compuesta principalmente por colágeno III y I, fibronectina y proteoglicanos, como el ácido hialurónico, condroitina etc., estos componentes van a ayudar a la migración de las células responsables de la reparación del tejido y su proliferación, además la matriz puede actuar como un reservorio de factores de crecimiento que van a mediar las acciones de los fibroblastos (García, 2002; Guarín-Corredor et al., 2013).

El colágeno es una proteína capaz de organizarse en una estructura muy resistente, está constituido por tres cadenas polipeptídicas entrelazadas helicoidalmente y cada cadena está enrollada en sí misma lo que aumenta su fuerza. En la síntesis de colágeno intercelular se produce un proto-colágeno, el cual tiene extremos libres que impiden su unión para formar las fibras, cuando este sale del fibroblasto, en el espacio intersticial se encuentra la enzima procolageno peptidasa que es producida por los mismos fibroblastos y secciona los extremos de las cadenas permitiendo que se acoplen unas con otras y se formen las fibras de colágeno, ricas en prolina y lisina; los proteoglicanos ayudan a facilitar la organización de la fibras de colágeno.

Mientras se reabsorbe el coagulo a la par se va formando una matriz intermedia compuesta por fibroblastos que sintetizan colágeno I, II, III, ácido hialurónico y proteoglicanos. Después se forma una matriz secundaria/ madura más estable inducida por el TGR- $\beta$ , disminuye el ácido hialurónico y se produce un cambio en la estructura de los fibroblastos, aumenta en tamaño el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico para sintetizar más proteoglicanos y proteínas (colágeno I, III, V y elastina). El poder de estimulación de los fibroblastos se relaciona a dos polisacáridos: por una parte, al glucomanano y por otra al acemanano (poseedores de manosa-6-fosfato) (Radha y Laxmipriya, 2015). Éstos interactúan con los receptores de los factores de crecimiento de los fibroblastos. Secundariamente, se incrementa la síntesis de colágeno y proteoglicanos, además, las fibras de colágeno realizan un entrecruzamiento más estable gracias a los proteoglicanos, sustancias que permiten la inserción de las fibras (Sahu *et al.*, 2013; Lucha-Fernández *et al.*, 2008).

Cuando se forma la matriz, la herida comienza a contraerse y eso se debe a que algunos fibroblastos sufren una transformación a miofibroblastos, estos tienen la capacidad de contraerse y transmitir su actividad contráctil al tejido adyacente mediante la interacción entre las proteínas de su citoesqueleto (miofibrillas) y las de la matriz. La contracción de la herida puede ser de 0.6-0.7mm/día. Las fibras de colágeno se unen a los bordes de la herida, de esta manera se forma una red por la cual se podrá iniciar la epitelización de la lesión (Arenas, 2003).

Para la epitelización y la reconstrucción de la línea dermoepidérmica son necesarios el NO, TGF  $\alpha$  y  $\beta$ , factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) que son producidos por los fibroblastos y queratinocitos de forma autocrina o paracrina. La renovación el epitelio consta de tres etapas:

A) Migración de células epiteliales: los queratinocitos emigran sobre los componentes de la matriz como células con pseudópodos, orientándose sobre las fibras de colágeno por el fenómeno guía de contacto, durante esta etapa dejan de expresar integrinas y en su lugar se expresan receptores para integrinas, colágeno y fibronectina que se conectan al citoesqueleto interno de los queratinocitos para permitir la movilización. Este ciclo de activación del queratinocito comienza con la

IL-1, que lo transforma en célula hiperproliferativa y migratoria para moverse en un primer momento sobre una matriz rica en fibronectina y luego en una rica de colágeno, para que los queratinocitos puedan transitar debe haber un tejido de granulación maduro y para ello los macrófagos deben degradar la fibrina (Zárate et al., 2018).

B) Multiplicación: durante toda la cicatrización aumentan la expresión de los receptores nucleares que controlan la transcripción de los genes implicados en la apoptosis (PPAR), interviniendo en la resistencia de los queratinocitos hacia la apoptosis e induciendo su proliferación; además durante la migración los queratinocitos son estimulados por el factor de crecimiento queratocítico (KGF), EGF, TGF- $\alpha$ , PDGF y FGF para su multiplicación en los márgenes de la herida hacia el centro. Cuando han proliferado los queratinocitos se expresa citoqueratina que lo convierte en contráctil, el TGF- $\beta$  estimula que también se produzcan queratinas transformándolo en una célula basal que ya está preparada para iniciar su diferenciación (Valencia, 2010).

C) Diferenciación a una epidermis: cuando la herida se cierra queda una monocapa de queratinocitos que comienzan a diferenciarse a su fenotipo habitual y a sintetizar queratina, involucrina, etc. Sólo cuando acaba esta fase, los melanocitos y las células de Langerhans colonizan la epidermis (Ramírez-Hernández, 2010).

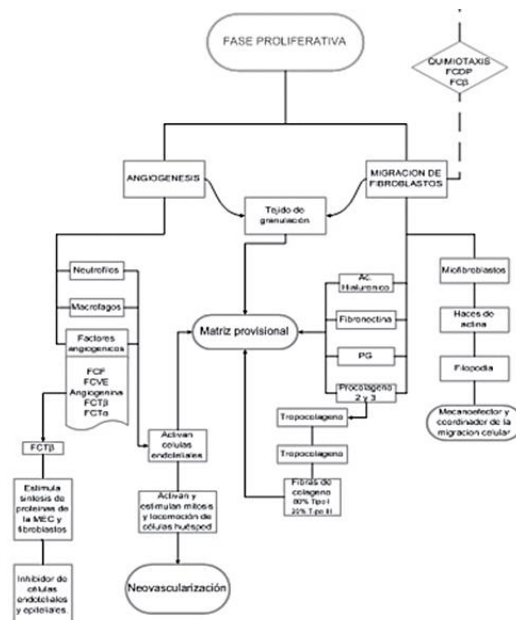


Figura 70. Fase de proliferación. Referencia: Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v61n4/v61n4a14.pdf>.

#### **4. Fase de maduración**

Esta fase se puede prolongar semanas, meses y hasta dos años después de la lesión, se caracteriza porque el tejido de granulación pierde fibroblastos por medio de la apoptosis y en su lugar aparece una estructura de colágeno más densa y se reorganiza la red vascular (Balderas et al., 2019; García, 2002). En el día 21 concluye la contracción de la herida con la ayuda de los miofibroblastos y esa fecha es cuando se encuentra al colágeno en su máxima abundancia, pero la cicatriz tiene el 15% de resistencia que la piel normal, con la remodelación de la matriz se incrementará y alcanzará del 80-90% de su fuerza final, esto se consigue cuando se degrada la fibronectina y el ácido hialurónico que fueron producidos por los fibroblastos y son sustituidos por fibras de colágeno, fibras elásticas y glucosaminoglucanos con ayuda de proteasas e hialuronidasas, que le darán más resistencia a la matriz, también las colagenasas, gelatinasas y proteasas ayudarán a sintetizar y orientar mejor los componentes de la matriz (Senet, 2007; Valencia, 2010). Posteriormente, se reemplazará el colágeno III por el I, por ser más estable y similar al original, esto se lleva a cabo con ayuda de metaloproteinasas de la matriz que son estimuladas por factores de crecimiento y necesitan iones de zinc para poder degradar el colágeno III y luego reabsorberlo (Guarín-Corredor et al., 2013; Zárate et al., 2018). Por su parte, el colágeno neoformado se une a través de enlaces covalentes con los haces del borde de la herida y los de la dermis adyacente, creando una red que hace que los miofibroblastos transmitan su tracción a toda el área, consiguiendo una contracción coordinada que se estimula por el TGF, angiotensina, prostaglandinas y endotelina (Ramírez-Hernández, 2010; Wang et al., 2018). Al final del proceso la actividad celular disminuye, se consigue un tejido conjuntivo cicatricial rico en colágeno, pobre en agua, células y vasos, debido a que los capilares sufrieron necrosis, luego fueron reabsorbidos por los macrófagos y su espacio se ocupó por fibras de colágeno, tampoco se encuentran folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas, por lo que se torna más denso y pálido el tejido (Kumar et al., 2008; Arenas, 2003). La dermis se recupera y alcanza una resistencia máxima del

70%, entonces se considera finalizada la reparación de la herida (Lucha-Fernández et al., 2008).

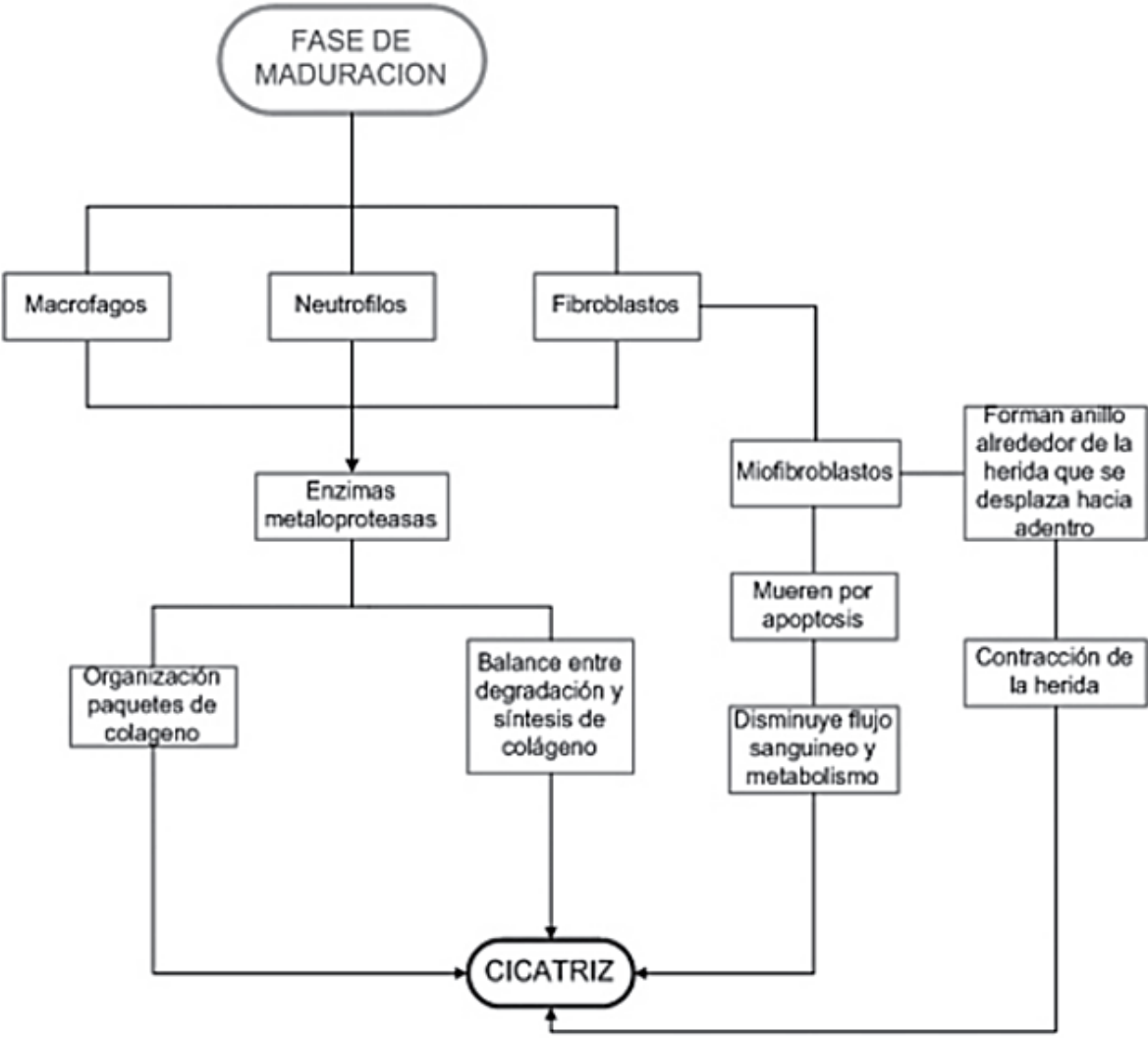


Figura 71. Fase de maduración. Referencia: Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v61n4/v61n4a14.pdf>.

## **TOXICIDAD CUTÁNEA AGUDA PROCEDIMIENTO DE DOSIS FIJA: PRUEBA DE IRRITACIÓN**

Para este tipo de ensayos, como para las pruebas de cicatrización, se deben tomar en cuenta las directrices de la OCDE en la prueba de sustancias químicas, debido a que estas orientan hacia el bienestar animal; además los procedimientos que se proponen son fácilmente reproducibles, utilizan pocos animales y se pueden clasificar las sustancias a través de la toxicidad aguda, que es de particular valor para evaluar los peligros probables. Por tanto, el desarrollo de este apartado se hizo con base en la información proporcionada en OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, con el fin de proponer una metodología fundamentada en el anterior texto mencionado.

Como consideraciones iniciales se debe tener información acerca de la sustancia que se someterá a prueba, como la identidad, estructura química, propiedades fisicoquímicas, datos de otro ensayo de toxicidad *in vitro* o *in vivo* o diseños moleculares computacionales (Q SAR), datos toxicológicos sobre estructuras de sustancias relacionadas, usos previstos que se le quieran dar, potencial de exposición humana pertinente y uso esperado de los datos generados. Esto con el propósito de poder justificar el estudio, donde se explique detalladamente el valor y la relevancia del estudio y los datos generados

Así mismo la investigación previa ayudará a seleccionar una dosis inicial adecuada, ya que el método dicta que sólo se manipulen dosis moderadamente tóxicas para evitar la letalidad. Las sustancias problema no se pueden suministrar en dosis que causan un dolor intenso y angustia, que se pueden atribuir a posibles acciones corrosivas o severamente irritantes, el pH de la solución nos da un indicio sobre tales efectos, si los animales llegan a mostrar signos de sufrimiento deberán de ser sacrificados humanitariamente y se consideran para la interpretación de resultados, los criterios para la decisión de matar a los animales moribundos se pueden consultar en Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation de la OCDE publicado en el 2000.

El principio de la prueba *in vivo* consiste en exponer a grupos de animales del mismo sexo a un procedimiento escalonado con dosis fijas, la dosis inicial se selecciona a la concentración que se espera que produzca signos claros de toxicidad, para esto se prueban diferentes dosis dependiendo si hay presencia o ausencia de signos de toxicidad o mortalidad. La sustancia problema se aplica en la piel a cierta dosis por grupo, se realizan observaciones de los efectos y muertes, después se hace la clasificación de la sustancia en función de los resultados obtenidos.

#### A) Selección de especies animales

Se recomienda utilizar ratas o ratones hembras, ya que generalmente son más sensibles y las peleas son menores que con machos, además es necesario que sean adultos jóvenes (8-10 semanas) de cepas de laboratorio comúnmente utilizadas, deben ser nulípara, no estar embarazada, con piel sana e intacta, con un tamaño que facilite la prueba y un peso que este en un intervalo entre  $\pm 20\%$  del peso medio de la especie, se registran los pesos inmediatamente antes de la administración de la sustancia y luego cada semana a lo largo de la duración de la prueba y al final cuando son sacrificados. Deben estar en jaulas, la temperatura ambiente a la que deben permanecer es de  $22^{\circ}\text{C} (\pm 3^{\circ}\text{C})$ , con una humedad del 50-60% sin rebasar el 70%, en la iluminación se debe cumplir 12 hrs de luz y 12 hrs de oscuridad, se pueden utilizar dietas de laboratorio convencionales con un suministro ilimitado de agua potable.

Los animales se deben aclimatar a las condiciones previamente mencionadas cinco días antes del inicio del estudio (mínimo), se seleccionan al azar para formar los grupos experimentales y se marcan para su identificación individual. Un día antes de la administración de la sustancia se retira el pelaje del área dorsal, al menos 10% de la superficie corporal total, se debe cuidar no irritar la piel ya que esto puede alterar su permeabilidad, para el manejo de los animales se puede recurrir a la aplicación de un anestésico.

#### B) Administración de dosis

La sustancia problema se aplica uniformemente en el área expuesta, que previamente se depiló, en al menos el 10% de la superficie corporal total con ayuda de una gasa porosa y una cinta no irritante por un período de 24 horas, se debe

asegurar que los animales no puedan ingerir la sustancia, se pueden hacer restricciones para que lo anterior se cumpla, pero no se debe inmovilizar al animal. Cuando se utiliza un vehículo para la aplicación de la sustancia problema, este se debe tomar en cuenta en la penetración de la piel, generalmente es suficiente de 0.5-1 mL. Al término del periodo de exposición se debe eliminar el residuo de la sustancia y los animales se vuelven a albergar en sus jaulas, se aíslan si se encuentran extremadamente estresados o con signos graves de toxicidad, sin embargo, el tiempo de aislación debe reducirse al mínimo.

La sustancia problema se administra de forma individual a cada animal dependiendo la dosis correspondiente, si la toxicidad dérmica aguda esperada es desconocida o alta se puede hacer un estudio de determinación de rango de dosis, en el cual se le aplica al animal una dosis inicial de 200 mg/kg de peso corporal, minimizando el número de animales para la prueba, si muere el animal se procede a hacer una segunda prueba de determinación de dosis con una concentración de 50 mg/ kg de peso corporal, pero por el contrario, si el animal no muestra signos de toxicidad o muere se procede a elevar las concentraciones a 1000 o 2000 mg/ kg de peso corporal hasta que se produzca la toxicidad o muerte,

Usando el rango dosis de hallazgo, se requerirá de tres acciones en el estudio principal; 1) prueba al mismo nivel de dosis para confirmar los resultados, 2) probar al nivel de dosis más alto ó 3) probar al nivel de dosis más bajo, para confirmar la clasificación del resultado se utilizan dos animales para este ensayo. Los resultados del estudio principal con los 2 animales adicionales por dosis confirmarán la clasificación de peligro adecuada y no será necesario realizar más pruebas

Se permitirá un período de al menos 48 horas entre cada prueba, por lo que se recomienda hacer observaciones a las 24, 32 y 48 hrs después de la eliminación de la sustancia problema, puede ser mayor este plazo dependiendo de la gravedad de los signos tóxicos, el tratamiento de animales al siguiente nivel de dosis debe retrasarse hasta que se tenga confianza en la supervivencia de los animales que recibieron la dosis anterior.

Después de la administración se observan los animales una vez durante los primeros 30 minutos y periódicamente las siguientes 24 horas, con especial



atención en las primeras 2 a 6 horas después del comienzo del período de exposición y todos los animales deben observarse por lo menos durante 14 días para registrar los signos de toxicidad, este período puede disminuirse o ampliarse dependiendo de la aparición de estos signos hasta el periodo de recuperación. Se hacen observaciones individuales que se registran sistemáticamente, en estas se deben incluir cambios en la piel, pelaje, ojos, membranas mucosas y si es relevante a nivel sistema respiratorio, circulatorio, nervioso y comportamiento, con especial atención a temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma, todos los cambios patológicos macroscópicos y microscópicos graves deben registrarse para cada animal. Los animales encontrados en estado moribundo y los que muestren dolor severo y/o signos angustia severa deben ser humanamente asesinados sin demora y el momento de la muerte debe ser registrada con la mayor precisión posible.

#### C) Datos

Los datos deben resumirse en tablas y formularios mostrando a que grupo pertenece, cuantos se utilizaron, el número de animales que mostró signos de toxicidad/ muertos/ sacrificados con una descripción de los efectos tóxicos, debe determinarse la categoría de clasificación de la sustancia problema.

El informe de prueba debe incluir la descripción de los datos relevantes disponibles de pruebas anteriores, datos derivados de cada paso de la estrategia, justificación del uso del vehículo, solubilidad y estabilidad de la sustancia problema en el vehículo, apariencia física, detalles de la formulación de la sustancia problema, pureza, en la medida de lo posible identidad química y propiedades fisicoquímicas relevantes de los componentes y la mezcla, especie y cepa utilizada, estado microbiológico de los animales, número, edad y sexo de los animales, fuente, condiciones de vivienda, dieta, detalles de la calidad del agua y los alimentos, método de asignación al azar en la selección de animales, detalles sobre la administración de la sustancia problema y el lugar de tratamiento, incluidos los volúmenes de dosificación, área de aplicación y duración de la exposición, justificación de la selección de la dosis inicial, tabulación de los datos de respuesta y nivel de dosis para cada animal, tabulación de peso corporal y cambios de peso

corporal, peso individual de los animales el día de la exposición, en intervalos semanales a partir de entonces y en el momento de la exposición muerte o eutanasia, fecha y hora de la muerte si es anterior al sacrificio programado, evolución temporal de la aparición de los signos de toxicidad y si estos fueron reversibles para cada animal, hallazgos histopatológicos de cada animal, si están disponibles y procedimiento de interpretación de datos.

**METODOLOGÍA SUGERIDA** (modificada de Balderas et al., 2019)

Para el ensayo se utilizan 13 ratones adultos jóvenes hembras de la especie *Mus musculus* de la cepa CD-1, que tienen como medidas promedio de 20-40 g de peso corporal y 130-198 mm de longitud total, de la punta de la nariz hasta la punta de la cola, la cual llega a medir de 63-120 mm, es larga con poco pelo y escamosa. Son animales comensales, es decir que obtienen alimentos o protección a expensas de otros sin producirles daño ni beneficio. La comida se les presenta en forma de pellets o nutricubos de 3 a 5 gramos y el agua se administra acidulada o clorada.

<i>Reino</i>	<i>Animalia</i>
<i>Filo</i>	Chordata
<i>Clase</i>	Mammalia
<i>Orden</i>	Rodentia
<i>Familia</i>	Muridae
<i>Subfamilia</i>	Murinae
<i>Género</i>	<i>Mus</i>
<i>Especie</i>	<i>M. musculus domesticus</i> (Linnaes, 1758).

**Cuadro 1. Taxonomía de *Mus musculus*.**

Los ratones se aclimatan durante cinco días al ambiente de estudio y al quinto día se procede a depilar el área dorsal, mínimo el 10% de la superficie corporal total,



Figura 73. Xilazina inyectable, frasco de 10 mL. Fuente: Imagen obtenida de [https://www.sani.com.ar/producto.php?id\\_producto=4165](https://www.sani.com.ar/producto.php?id_producto=4165)

Se utiliza en la presentación Lisorane del laboratorio Baxter para esto se introduce un pedazo de algodón a un tubo de 15 mL y se impregna con 40 µL de isoflurano por ratón, la dosis es para ratones que cuenten con un peso corporal de 25 a 40 g y que sean cepas Balb/c o CD-1, el tubo se coloca en el hocico del ratón por 12-15 segundos, consiguiendo un efecto

cuidando que no se irrite la piel. Para el manejo de los animales se puede recurrir al uso de un anestésico, como el isoflurano (5%), que es un éter halogenado usado para la anestesia general por inhalación, este inhibe la conducción de los potenciales de acción y su transmisión sináptica, induciendo al animal a un estado de letargo corto y la recuperación es rápida.



Figura 72. Ketamina inyectable, frasco de 50 mL. Fuente: Imagen obtenida de <https://mil mascotas.hiperarticulos.com/ketamina-en-perros/>

inmediato con una duración de 40-50 segundos; este método es viable cuando se hace una depilación con rasuradora.

Si no se tiene acceso a isoflurano, también se puede anestesiarse al animal por medio de una inyección subcutánea de xilacina (10 mg/kg) y ketamina (80 mg/kg), se hace



Figura 74. Isoflurano y aplicador estandarizado foto tomada en octubre, 2016. Fuente: Imagen obtenida de Canales, 2017.

la depilación con rasuradora y/o crema para depilar. Para esta técnica se deben tener conocimientos acerca del manejo del animal, ya que es



Figura 75. Medetomidina inyectable frasco de 10 mL. Fuente: imagen obtenida de <http://provesa.com/catalogo/ecuphar/domtor-solucion-inyectable-para-perros-y-gatos-134.html>

necesario sujetar al ratón firmemente sin lastimarlo, de tal forma que se levante la piel a la altura del cuello, se desinfecta la zona y se introduce una aguja de calibre 22 en dirección paralela hacia el dorso del animal para introducir el anestésico, al finalizar se coloca un algodón con alcohol y se ejerce presión, la ventaja es que la duración de la anestesia es de 30-45 minutos, mayor que con isoflurano, se obtiene el mismo efecto si se utiliza ketamina (80 mg/kg) y medetomidina (0.5-1 mg/kg). La desventaja está en que se debe inyectar correctamente para lograr una anestesia en lugar de una sedación, se debe tomar en cuenta que son necesarios dos fármacos en lugar de uno, por tanto, es un mayor gasto económico, pero también se puede comprar la presentación que ya incluye ambos fármacos.

Un día después de que todos los ratones son depilados se revisa que la piel se vea normal sin irritaciones y se procede a comenzar la prueba de toxicidad con base en el método modificado de la OECD; los trece ratones se dividen en tres grupos al azar, dos grupos con cinco ratones y un grupo de tres ratones. El último grupo, compuesto por tres ratones, servirá como control y no se le aplicará nada.

Todos los organismos se pesan y se les aplica una dosis de 2000 mg del extracto de *P. laevigata* por kg de peso corporal, a un grupo se le aplica a una concentración del 10% y al otro a una del 50%, dos veces diariamente por 14 días, después de la administración se observan los animales una vez durante los primeros 30 minutos y periódicamente las siguientes 24 horas, con especial atención en las primeras 2 a 6 horas después del comienzo del período de exposición, durante este periodo de tiempo se lleva un registro escrito y fotográfico con todas las observaciones individuales para identificar un posible desarrollo de reacciones cutáneas, cómo aparición de eritemas, escara, edema, piloerección, cambios en el pelaje, ojos, membranas mucosas, sistema respiratorio, circulatorio, nervioso, autónomo, en el comportamiento como agresividad, pasividad, irritabilidad, si presenta temblores, salivación, diarrea, sangrado, convulsiones, letargo, sueño y coma.

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

Figura 76. Registro fotográfico de una prueba de toxicidad dérmica de un propóleo de Chihuahua al 10% y 50%. Fuente: Imagen obtenida de Nava, 2018.

Al finalizar el lapso de tiempo se elimina el residuo del extracto de la piel, los ratones se sacrifican humanitariamente y se recupera la piel, para darle un tratamiento histológico, someterla a un análisis histopatológico y evaluar las observaciones de acuerdo con las guías de la OECD, las cuales orientan acerca de los cambios que se observan en la piel, comportamiento y salud en general del animal para determinar la clasificación de toxicidad de la sustancia.

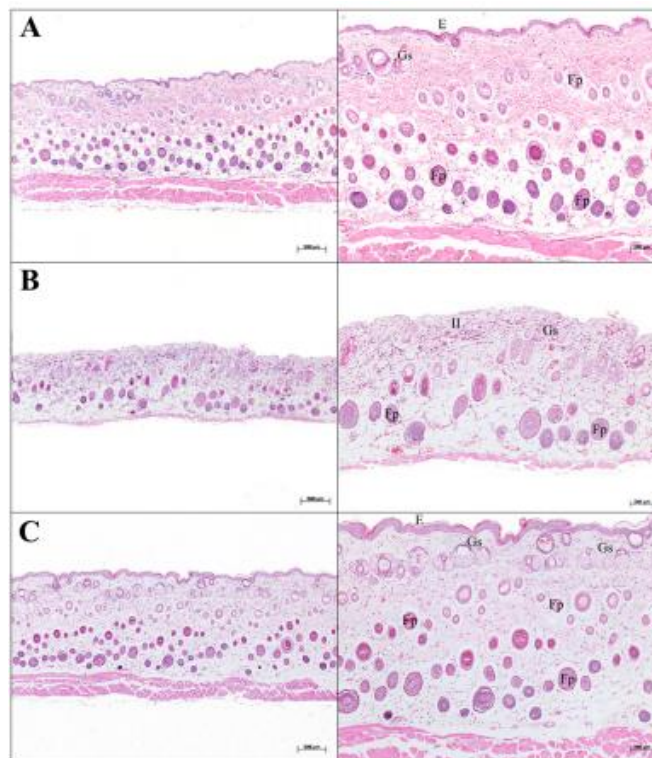


Figura 77. Fotomicrografías de piel de ratón en un ensayo de toxicidad dérmica aguda de un extracto etanólico del propóleo de Chihuahua, el grupo B y C se observan sin daños a la piel en comparación con el control (A). Fuente: Imagen obtenida de Balderas, 2020.

También se extrae el hígado y riñones de cada organismo para pesarlos y compararlos estadísticamente con el grupo control, con un nivel de significancia de  $P < 0.05$ .

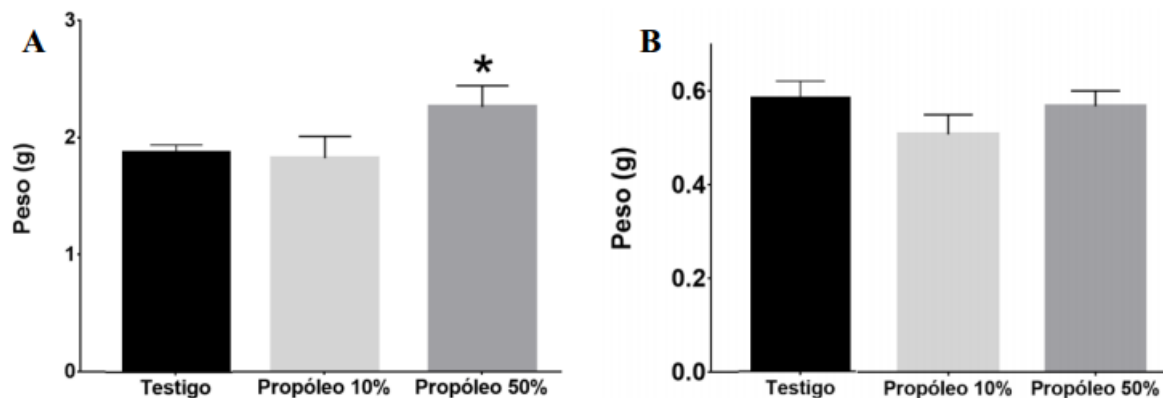
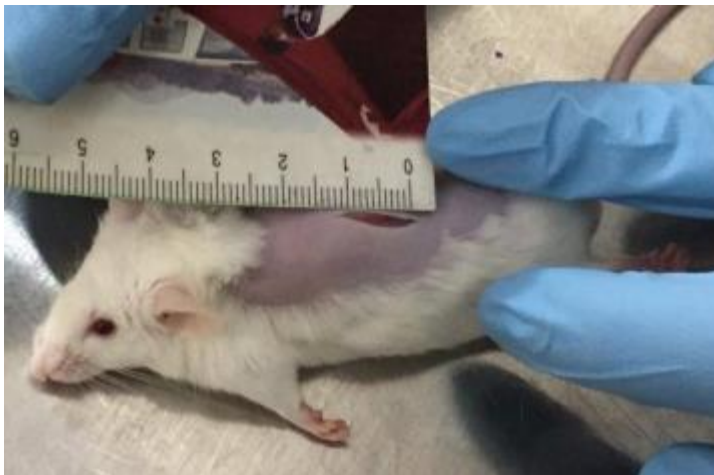


Figura 78. Gráficas de peso en gramos de hígados (A) y riñones (B) de una prueba de toxicidad dérmica aguda de un propóleo de Chihuahua al 10% y 50%; \* Muestra con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Fuente: Imagen obtenida de Nava, 2018.

Todos los procedimientos experimentales con animales se efectuaron de acuerdo con las sugerencias y procedimientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, referente al uso y manejo de animales de laboratorio usados en investigaciones científicas.

## FUERZA DE CIERRE: MÉTODO TENSIOMÉTRICO

Este método se basa en la medición de la fuerza que se requiere para abrir una cicatriz que ha pasado por el proceso de reparación de la piel. Para este ensayo se necesitan 23 ratones hembra, con las mismas características que se mencionaron para los ratones de la prueba de toxicidad; se aclimatan durante cinco días al ambiente de estudio y al quinto día se depila el área dorsal del ratón, procurando cubrir mínimo el 10% de la superficie corporal total; para no estresar excesivamente a los animales se les anestesia con isoflurano (5%) inhalado o por medio de una inyección subcutánea se administra xilacina (10 mg/kg) y ketamina (80 mg/kg) o ketamina (80 mg/kg) y medetomidina (0.5-1 mg/kg). Cuando el ratón se encuentre anestesiado se procede a depilar la zona con una rasuradora y/o una crema depiladora (crema Veet para piel sensible) y durante las siguientes 24 horas se observa si no aparecen signos de irritación en la piel (Canales, 2017; Nava, 2018). Un día después de la depilación, si los ratones no presentaron irritación, a 20 ratones se les realiza una herida paravertebral y para dicha acción se vuelven a



**Figura 79. Realización de las heridas paravertebrales de 1 cm de longitud. Fuente: Imagen obtenida de Nava, 2018.**

anestesiarse con alguna de las opciones de fármacos previamente ya mencionadas, en la zona depilada se hace una herida con ayuda de un bisturí estéril del #4, la incisión debe de ser de un centímetro de longitud y a una profundidad de 0.8 mm aproximadamente para cubrir todas las capas de la piel

(epidermis, dermis e hipodermis) (Centro Nacional de Información Biotecnológica, 2020; Balderas, 2020).

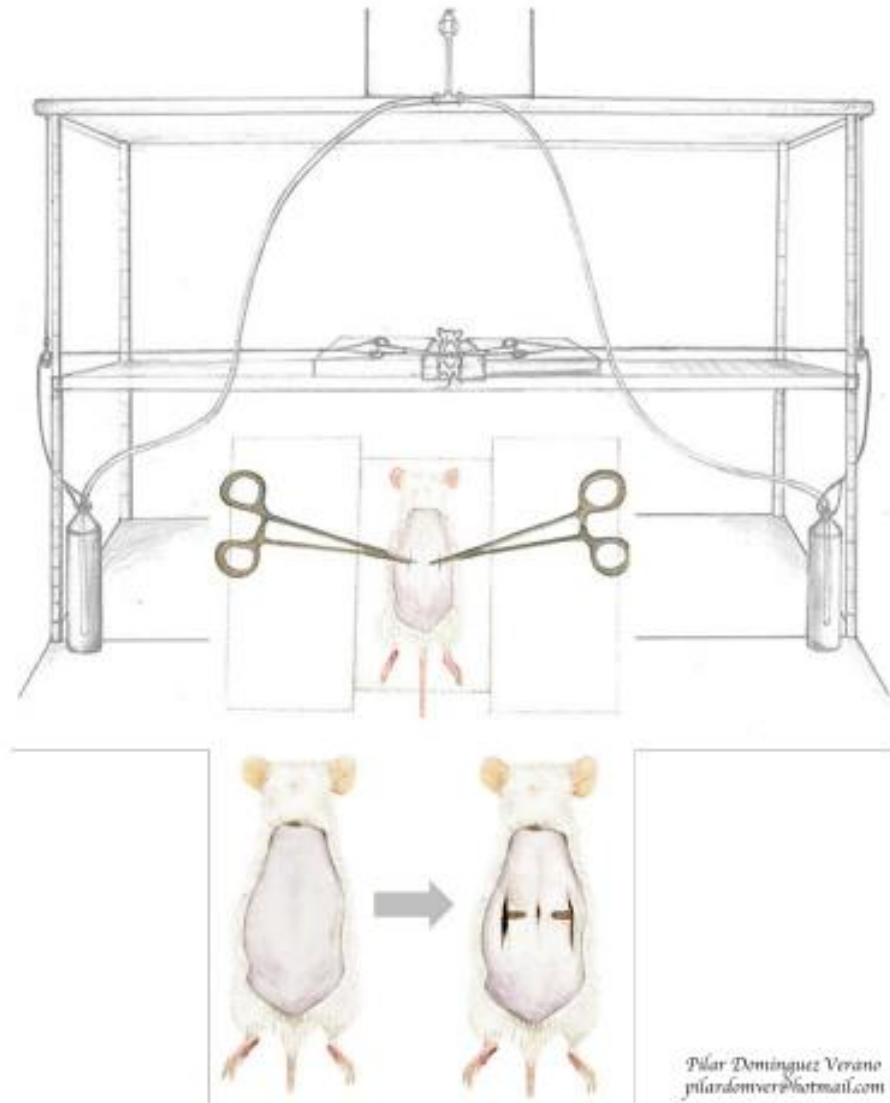
Una vez generada la lesión, los ratones se dividen en tres grupos, cada uno con cinco ratones, y se procede a aplicar tópicamente los tratamientos según al grupo que correspondan:

<i>Grupo</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>No. de ratones</i>
<i>Control</i>	Lesión de 1 cm	5
<i>Control positivo</i>	Lesión + recoverón	5
<i>P. laevigata</i>	Lesión + extracto 10%	5
<i>P. laevigata</i>	Lesión + extracto 50%	5
<i>Testigo</i>	Ninguno (piel sana sin lesión)	3

**Cuadro 2. Grupos experimentales para evaluar la fuerza de cierre.**

Durante 14 días se aplican los tratamientos a las heridas cada 12 horas, en decimoquinto día se sacrifican los ratones utilizando una cámara de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se procede a realizar la metodología para medir la fuerza que se necesita para abrir una cicatriz con la técnica de flujo de agua, para esto se utilizan pinzas Halsted sujetadas a la piel del ratón a 3 mm de la cicatriz, la pinzas a su vez están sujetadas a una piola que está atada a dos recipientes de agua, de la misma capacidad, que están a los lados; el agua fluye y cae en los recipientes, con ayuda de mangueras conectadas a un dispensador de agua con una conexión en T, para permitir el flujo hacia los dos contenedores. Cuando cae el agua, el sistema de poleas ejerce presión, lo cual genera como consecuencia que las pinzas jalen la piel del ratón hacia los extremos hasta que finalmente se abre la herida, en el momento que la piel comienza a abrirse se registra el volumen de agua que se recauda en cada recipiente; esto se realiza para evaluar qué tan efectivo es el proceso de cicatrización (Balderas, 2020; Serrano, 2013).





**Figura 80. Esquema representativo del método tensiométrico, base metálica a la que se sujeta el ratón de la cintura pélvica y torácica, se sujeta la piel con pinzas atadas a recipientes que se llenan con agua. Fuente: Pilar Domínguez Verano, pilardomver@hotmail.com.**

Una vez recuperada el agua, se hace la conversión de mililitros a gramos y con los datos obtenidos se calcula la eficacia de cicatrización en porcentaje, de la siguiente forma:

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

GC= gramos en que abre la piel cicatrizada

GS= gramos en que abre la piel sana

Se calcula la media de cada grupo y el error estándar, para determinar la significancia entre los tratamientos aplicados y para esto se aplica la prueba ANOVA de una vía (de un factor) con una  $P < 0.05$  (Nava, 2018).

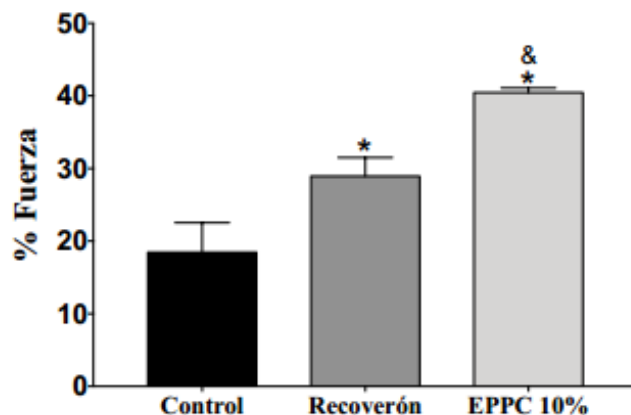


Figura 81. Porcentaje de fuerza obtenida del ensayo tensiométrico para un extracto etanólico de propóleo de Chihuahua al 10%. \* Diferencias significativas. Fuente: Imagen obtenida de Balderas, 2020.

Se hace la comparación con el RECOVERÓN, ya que es un medicamento dirigido hacia la cicatrización, tiene como base el ácido acexámico, de nombre IUPAC: Ácido 6-acetamidohexanoico y fórmula  $C_8H_{15}NO_3$ , acelera el proceso de cicatrización en heridas estériles, participa en la acción protéica del colágeno, regulando la producción de fibroblastos y la disposición de las fibras. Se puede encontrar adicionado con neomicina 5%, que funciona como antibiótico, se une permanentemente al ARNr 16S y a la proteína S12 de la subunidad ribosómica bacteriana 30S, inhibiendo así el inicio de la síntesis de proteínas, también provoca que se lea incompleto el ARNm, conduciendo a la muerte de las bacterias. El RECOVERÓN no ha mostrado reacciones secundarias o adversas, pero se debe tener precaución si se es hipersensible al ácido acexámico o al excipiente, en el mercado su precio ronda entre \$298-320 pesos mexicanos, siendo accesible (Vademécum Actuamed, 2020).

## **EFICACIA DE CICATRIZACIÓN: VELOCIDAD DE CIERRE**

En esta prueba, al igual que en la anterior, son necesarios 23 ratones hembras, con las especificaciones que se mencionan en el apartado de Toxicidad Aguda; los animales se aclimatan al ambiente durante cinco días, en el quinto día se anestesian con alguna de las opciones de fármacos previamente ya mencionadas y se depila el área dorsal del ratón (mínimo el 10% de la superficie corporal total) con ayuda de una rasuradora y/o crema depiladora Veet para piel sensible, por las siguientes 24 horas se examina la piel en busca de signos de irritación (Serrano, 2013; Diario Oficial de la Federación, 2020).

Si no se presenta irritación en la zona depilada, se procede a anestesiarse de nuevo a los animales con la misma técnica y fármaco(s) a la que se haya recurrido días antes para la depilación, cabe mencionar que se aplicará la anestesia sólo a 20 ratones, a los cuales se les hace una incisión paravertebral con ayuda del Biopsy punch, que genera una herida de 5 mm aproximadamente si se estira correctamente la piel del ratón, o bien se puede llevar a cabo la lesión con ayuda de un bisturí estéril del #4, la incisión debe de ser de un centímetro de longitud y a una profundidad de 0.8 mm aproximadamente para cubrir todas las capas de la piel (epidermis, dermis e hipodermis) (Canales, 2017; Nava, 2017).

Para realizar la lesión con ayuda del Biopsy punch, se coloca al ratón boca abajo y se estira la piel para que el dispositivo pueda hacer un buen corte, se ejerce presión sobre la piel con Biopsy punch y se genera una herida que puede variar de 4.50-5.50 mm dependiendo de cuánto se ha estirado la piel, se retira el círculo de piel cortada y si no se desprende totalmente, se puede recurrir al uso de tijeras de cutícula para retirarla completamente (Balderas, 2020).



Figura 82. Biopsy punch, foto tomada en octubre 2016. Fuente: Imagen obtenida de Canales, 2017.

Una vez generada la lesión, los ratones se dividen en tres grupos, cada uno y se procede a aplicar tópicamente los tratamientos dos veces diariamente durante 14 días, según al grupo que correspondan:

Grupo	Tratamiento	No. de ratones
Control	Lesión de 1 cm	5
Control positivo	Lesión + recoverón	5
<i>P. laevigata</i>	Lesión + extracto 10%	5
<i>P. laevigata</i>	Lesión + extracto 50%	5
Testigo	Ninguno (piel sana sin lesión)	3

Cuadro 3. Grupos experimentales para la prueba de velocidad de cierre.

Inmediatamente después de generar la herida se mide con ayuda de un Vernier electrónico marca Mitutoyo y se lleva un seguimiento diario del diámetro o longitud de la lesión, para esto se debe identificar a cada organismo de cada grupo, se reportan los resultados en porcentaje de cierre, que se obtiene de la siguiente forma (Nava, 2017):

$$\% \text{ de cierre} = 100 - (Dd \cdot 100) / Di$$

Dd= diámetro del día

Di= diámetro inicial

Se calcula la media de cada grupo y el error estándar, para determinar la significancia entre los tratamientos aplicados y para esto se aplica ANOVA de una vía (de un factor) con una  $P < 0.05$  (Balderas, 2020).

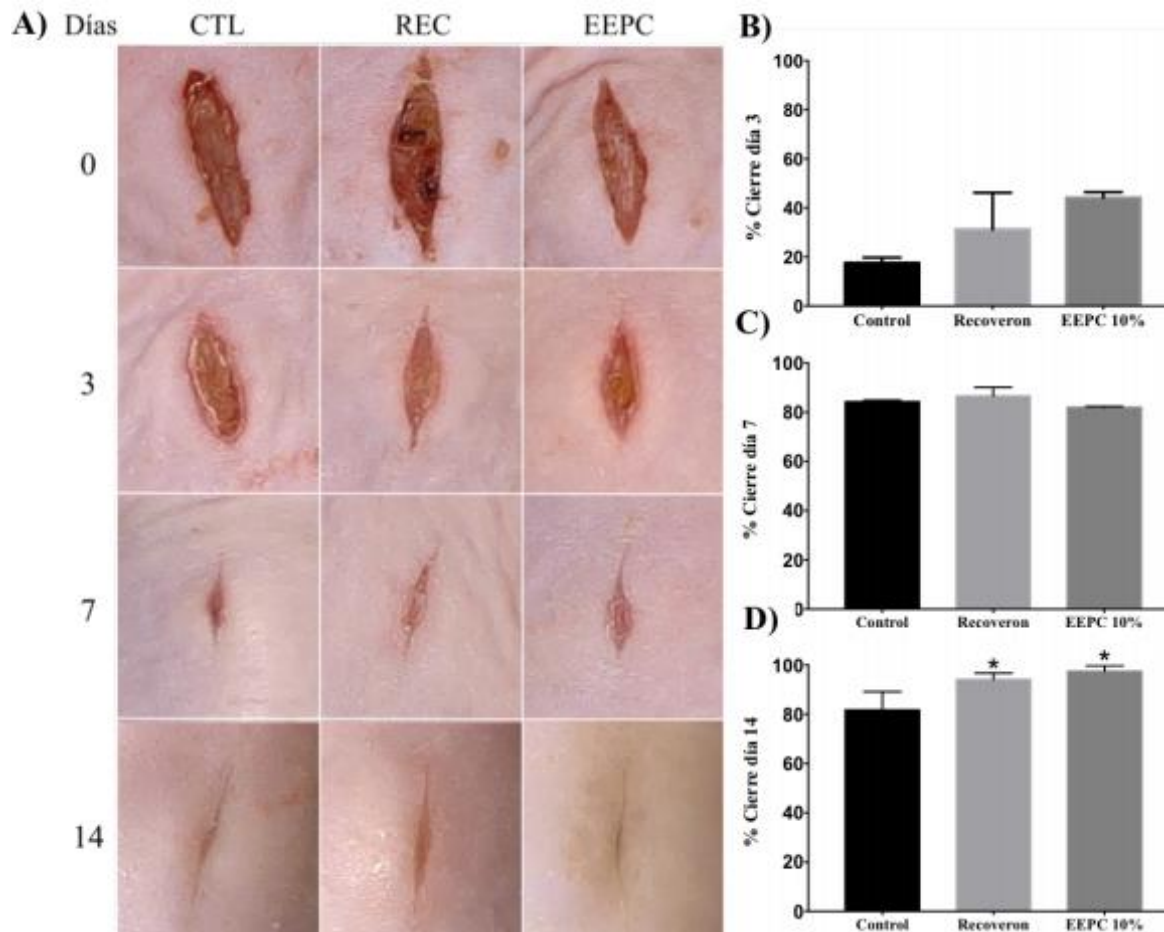
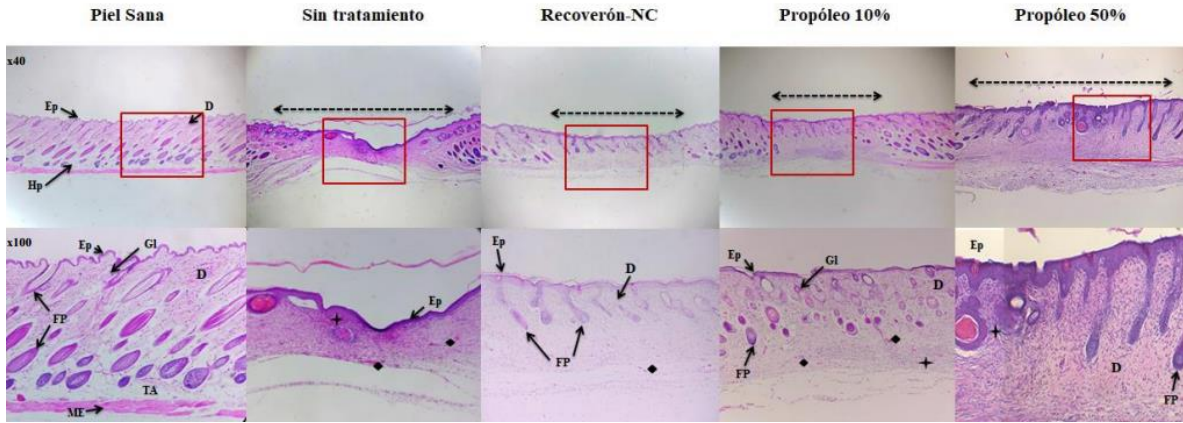


Figura 83. Secuencia fotográfica de heridas y porcentaje de cierre en tres tiempos diferentes. Fuente: Imagen obtenida de Balderas, 2020

Al término del periodo, los ratones son sacrificados humanitariamente utilizando una cámara de CO<sub>2</sub>, debido a su rápido efecto depresivo y anestésico que conduce a la muerte por hipoxia en pocos minutos, está fácilmente disponible en cilindros de gas comprimido, es barato, no inflamable, no explosivo, seguro de operación para el personal, no se acumula en los tejidos y no deforma la arquitectura celular. Y en seguida de la muerte de cada organismo se obtiene una muestra de piel para su tratamiento histológico, con el fin de observar y comparar la arquitectura histológica de las muestras (Serrano, 2013).



**Figura 84. Cortes histológicos de la zona de la herida después de 14 días en tinción H-E. Fuente: Imagen obtenida de Nava, 2018.**

También se puede llevar un registro fotográfico con ayuda de un microscopio digital manual Celestron, que con ayuda del programa ImageJ se puede evaluar la velocidad de cicatrización, presentando los resultados como porcentaje de cierre con base en la diferencia de tamaño de las lesiones de los grupos experimentales y el control (Serrano, 2013).

## **TECNICA HISTOLOGICA**

La técnica histológica consiste en una serie de procedimientos que son aplicados a material biológico (vegetal/animal) con el propósito de prepararlo y darle ciertas características y condiciones óptimas para lograr observarlo, examinarlo y analizar sus componentes a través de un microscopio; en términos generales, la técnica histológica da soporte y endurece las muestras para obtener cortes delgados que se puedan teñir y ver en el microscopio (Montalvo, 2010). Los pasos universales de la técnica son:

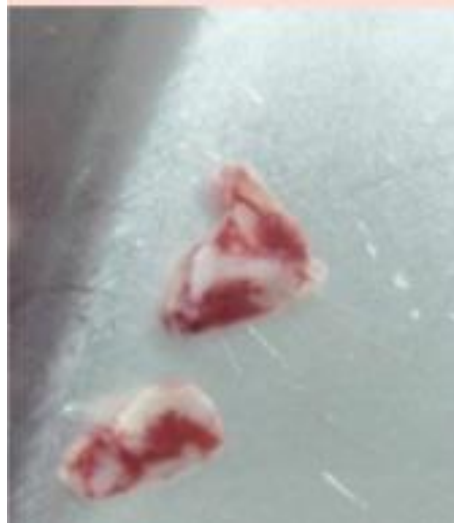
1. Obtención de la muestra
2. Fijación
3. Inclusión
4. Corte
5. Tinción
6. Montaje

### 1) TOMA DE MUESTRA

La muestra que se tome debe ser representativa y pequeña del órgano o del objeto de estudio y para obtener una sección de ellos se debe contar con un instrumento muy afilado para evitar deformar sus elementos y cualquier maltrato durante la manipulación; cada muestra debe estar identificada desde el inicio, para esto el recipiente que la contenga debe ser etiquetado con una referencia adecuada, se recomienda etiquetas de papel marcadas con lápiz y de preferencia dentro del frasco, ya que los alcoholes pueden borrar o despegar las etiquetas (Canales, 2017; Nava, 2018).

La calidad y fidelidad con la que se observa al microscopio un tejido o célula con las características morfológicas, que poseían cuando estaban con vida, dependen esencialmente de la prontitud y el cuidado que se tuvo al momento de obtener la muestra. La biopsia es la que mayormente se utiliza para extraer pequeños fragmentos de un tejido, puede ser 1) Incisional, que se realiza seccionando la piel con instrumentos cortantes como el bisturí o navajas de afeitar, estos deben ser nuevos y no se debe ejercer demasiada presión sobre ellos. 2) Por punch, que es

un instrumento filoso que hace el corte en la piel en forma de circulo. No se recomienda el uso de tijeras para cortar los tejidos, porque pueden ocasionar compresiones y jalones en los tejidos y órganos causando que se distorsionen las estructuras microscópicas (Canales, 2017; Nava, 2018).



**Figura 85. Ejemplo de tamaño de muestra. Fuente: Imagen obtenida de Verdín Terán et al., 2013.**

## 2) FIJACIÓN

La función de la acción de fijar una muestra es preservar la estructura, ultraestructura y composición química de las células, para que en la observación al microscopio se observe fielmente la morfología y localización de los componentes de la muestra. Esto se logra impidiendo los procesos de autólisis celulares, deteniendo el metabolismo celular y evitando la acción de los microorganismos que destruyen la muestra (Balderas, 2020).

Para que se ejerza una eficiente y adecuada fijación, el fijador debe cumplir con las siguientes condiciones (Chávez, 2017):

- Matar a las células, para evitar la aparición de procesos autolíticos
- Buen poder de penetración, que se introduzca con rapidez en la muestra, empezando de la periferia hasta el centro, esto garantiza la integridad del tejido.
- Buen poder de difusión, que no se fije solamente la superficie, sino que alcance las zonas más profundas.



- Producir cierta dureza a los tejidos, sin excesiva retracción, si la dureza del tejido es mayor a la del medio de inclusión puede volverse quebradizo, pero si no se fijó lo suficiente, la muestra puede deshacerse cuando se pretenda hacer la inclusión.
- Barato, de fácil manipulación y acceso.
- No debería extraer o agregar elementos a los componentes celulares
- pH que se aproxime al neutro y una osmolaridad similar a la del tejido para evitar que las estructuras celulares colapsen, para esto se utilizan buffers o amortiguadores de fosfato 0.1 M y pH 7.4.

Se recomienda que la relación del volumen del fijador con respecto al volumen de la muestra sea al menos de 10:1, el tiempo en que las muestras deben estar sumergidas en el fijador varía dependiendo al tipo de fijador que se utiliza, el tamaño y naturaleza de la muestra y la temperatura de fijación; En cualquier circunstancia se deben respetar los tiempos recomendados para cada tipo de fijador para garantizar la conservación. Existen diferentes tipos de fijadores (Ross y Pawlina, 2012):

#### A) Químicos

- Simples

Generalmente es un compuesto, el más usado es el formaldehído/formol para la microscopia óptica y el glutaraldehído para la microscopia electrónica, los grupos aldehídos de ambos compuestos tienen la capacidad de formar enlaces covalentes entre el grupo amino (-NH<sub>2</sub>) y el carboxilo (-COOH) de las proteínas, creando puentes metilénicos entre ellas, se forma un enrejado molecular que precipita al interior celular y preserva la estructura; al haber más grupos aldehídos en el glutaraldehído, provoca que esta molécula tenga un mayor poder fijador (Megías, Molist y Pombal, 2019).

El formol comercial se obtiene generalmente en soluciones 40% P/V y se puede diluir cuatro veces para obtenerlo al 10% o se diluye diez veces para un formaldehído al 4% (formalina), esta es la sustancia fijadora de mayor uso en los laboratorios que hacen estudios histológicos, es un líquido claro, incoloro que emite vapores irritantes para las vías respiratorias. Coagula las proteínas celulares,

conserva bien las grasas, mantiene la estructura celular y facilita la tinción gracias a su buen poder de penetración y difusión (Serrano, 2013).

- Mezclas

Bouin es la más utilizada para la microscopia óptica, está compuesta por ácido pícrico, formol y ácido acético, este último compuesto favorece la penetración del formol. También se emplean mezclas como el líquido de Zenker y de Helly.

B) Físicos

- Se emplea la congelación con nitrógeno líquido o mezclas refrigerantes de hielo seco con acetona, este proceso no desnaturaliza las proteínas y muchas de sus propiedades pueden reaparecer cuando se deshidrata el tejido, por esta razón muchos investigadores fijan con formol los tejidos luego de la deshidratación; los tejidos se colocan en bloques que se introducen en congeladores y se cortan con ayuda de un criostato. Además, este procedimiento ofrece la posibilidad de extraer componentes celulares durante la técnica histológica y evita alteraciones antigénicas que podrían ocurrir por el efecto de los fijadores químicos (Terán et al, 2013).
- Se puede utilizar un medio de calor para fijar los frotis de sangre o suspensiones celulares, se flamea 3-4 veces un portaobjetos sobre la llama de un mechero para desecar la muestra, se coagulan las proteínas y se hace la tinción de la muestra (Terán et al, 2013).



**Figura 86.** Muestra fijada en formol 10%. Fuente: Imagen obtenida de Verdín Terán, Moreno Fierros, Rojo Botello, García Hernández, Omaña Molina, Meneses Aguirre y Nieto Yáñez, 2013.

### 3) INCLUSIÓN

Esta parte de la técnica histológica se divide en tres pasos, la finalidad poder obtener una muestra a la cual se le puedan realizar cortes finos, para esto la muestra debió haberse endurecido, después de la fijación el tejido debe infiltrarse en parafina, medio de inclusión insoluble en agua y alcohol, por tanto, las muestras deben deshidratarse y pasar por una aclaración (Elsevier España, 2013).

#### A) DESHIDRATACIÓN

Tiene como propósito la eliminación gradual y completa del agua de la muestra, para que se pueda incluir, el procedimiento clásico es la sustitución del agua por alcohol, para esto se usa cualquier reactivo capaz de absorber el agua del tejido. Un buen agente deshidratante cuenta con las siguientes condiciones (Balderas, 2020):

- No debe alterar la estructura tisular.
- Debe ser capaz de mezclarse con el reactivo intermediario o agente aclarante.

Generalmente se usa alcohol etílico a diferentes gradaciones en forma ascendente (50, 70, 80, 90, 100), ya que si se comenzara con la mayor concentración el tejido se retraería por la salida de agua a golpe. El empleo de más o menos series de alcoholes, así como la decisión de iniciar en determinada concentración, van a estar en función de la experiencia personal, fragilidad de la muestra, tipo de fijador, si se utiliza un fijador alcohólico se deshidrato en cierta medida el tejido (Terán et al, 2013).

En el volumen de los baños de deshidratación se recomienda que sea diez veces mayor al de la muestra, es decir que se encuentren a una relación 10, se debe cuidar el tiempo, ya que si se excede puede ocurrir el endurecimiento excesivo del tejido, además el índice de saturación de agua en el alcohol debe ser mínimo para poder reutilizar el baño. Se debe tener precaución con estas sustancias debido a que son altamente inflamables (Ross y Pawlina, 2012).

La deshidratación debe ser completa, si no al momento de la inclusión no alcanza la dureza requerida, se puede conocer si se ha hecho una deshidratación incompleta al sumergir la muestra en el líquido diafanizador (aclarante), si esta toma

un aspecto turbio o blanquecino es un indicador de una deshidratación parcial y se debe recomenzar el proceso. Además, después de este paso, la muestra se sumerge en un solvente orgánico que desplaza al alcohol y que es solvente de la parafina (Chávez, 2017).

#### B) ACLARACIÓN/ DIAFANIZACIÓN/ IMPREGNACIÓN EN SOLVENTE

El tejido se vuelve translúcido cuando pasa por esta etapa, en este se consigue la sustitución del agente deshidratante por una sustancia miscible con el medio de inclusión que va a utilizarse, para esto la pieza histopatológica se empapa en un agente químico líquido que pueda disolverse en el medio de inclusión y penetrar en el tejido. La aclaración de los tejidos deshidratados se debe a que las sustancias aclarantes poseen un alto índice de refracción y al interactuar con los tejidos los vuelven transparentes (Megías, Molist y Pombal, 2019).

Algunos líquidos diafanizadores o intermediarios son: xilol, tolueno, benceno y cloroformo. La elección del aclarante depende de la rapidez que se requiera para eliminar el deshidratante, al igual que las acciones nocivas sobre los tejidos y la adecuación del aclarante al medio de infiltración y deshidratante, así como la facilidad de su eliminación de toxicidad, peligrosidad y precio (Serrano, 2013).

Generalmente se usa xilol, pues también es empleado para el procedimiento de tinción. Las ventajas de utilizar este compuesto es que tiene una rápida acción aclarante, aclara muestras de 5 mm de grosor en 1 o media hora, endurece poco los tejidos, se elimina fácilmente en el medio de inclusión, es fácil apreciar el punto óptimo de dosificación, los inconvenientes están en que es una sustancia tóxica, sólo aclara desde el alcohol absoluto, tiende a volver blanquecino el tejido, endurece si se deja por mucho tiempo la muestra (Ross y Pawlina, 2012).

#### C) INCLUSIÓN

Los tejidos que se aclaran adquieren cierta dureza, pero no la necesaria para que de estos se puedan hacer cortes histológicos, de milésimas de milímetros, pero esto se puede lograr cuando se haga la inclusión de las muestras, que tengan la dureza exacta para ser cortados por una navaja (Terán et al, 2013).

Las sustancias de inclusión pueden infiltrarse e incorporarse al interior de los tejidos para darles soporte; cuando el tejido ha sido aclarado se sumerge la muestra en un

recipiente con parafina líquida y xilol (1:1) y se deja en un horno con una temperatura de 56°-60° C y se hacen otros dos pasajes en parafina únicamente, para desplazar al xilol. Se construye un molde de aluminio o barras de metal en el que se coloca la muestra orientada según el sentido en que se quieran hacer los cortes y se agrega la parafina, se enfría el molde para que solidifique el medio de inclusión y se obtiene el bloque. Entre más grande sea la muestra más tiempo debe emplearse para la inclusión; los bloques se almacenan a temperatura ambiente o en un refrigerador a 4° C, hasta que se proceda a hacer los cortes (Megías, Molist y Pombal, 2019).

Las parafinas son hidrocarburos saturados que provienen de la destilación del petróleo, son sólidos a temperatura ambiente, hierve a temperaturas elevadas y sus vapores son inflamables; existen diferentes tipos de parafina de acuerdo a su punto de fusión:

- Blandas. tienen un punto de fusión de 45° C – 52° C. Son recomendables para incluir tejidos en los se detectarán antígenos mediante inmunohistoquímica (Montalvo, 2010)
- Semiduras. Sus puntos de fusión son de 54° C – 58° C. Es la parafina que se emplea con mayor frecuencia en los laboratorios donde se realiza *técnica histológica*. De acuerdo a la temperatura del medio, se recomienda su uso para secciones de 5 a 7 de  $\mu\text{m}$  (Montalvo, 2010).
- Duras. Tienen un punto de fusión de 60°– 65° C. Son parafinas que deben usarse en ambientes con climas de temperaturas altas (Montalvo, 2010).

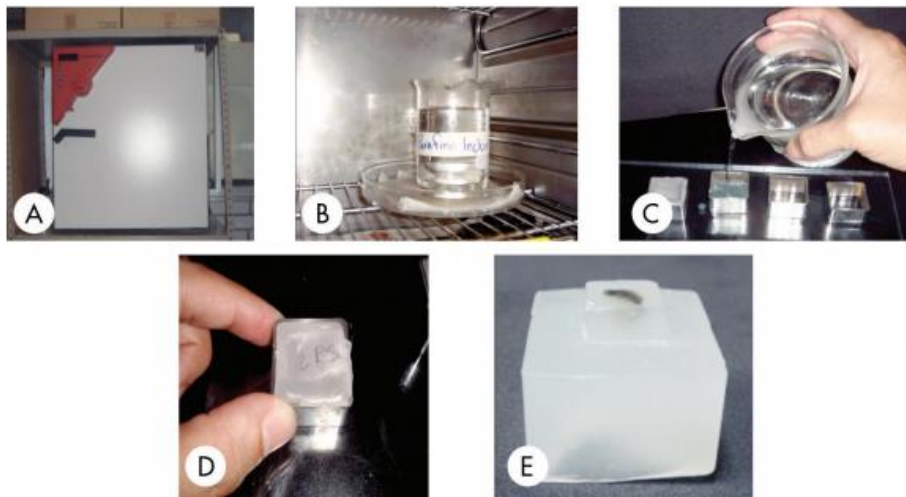


Figura 87. Inclusión de muestra en bloques de parafina. Fuente: Imagen obtenida de Verdín Terán, Moreno Fierros, Rojo Botello, García Hernández, Omaña Molina, Meneses Aguirre y Nieto Yáñez, 2013.

#### 4) CORTE EN MICRÓTOMO

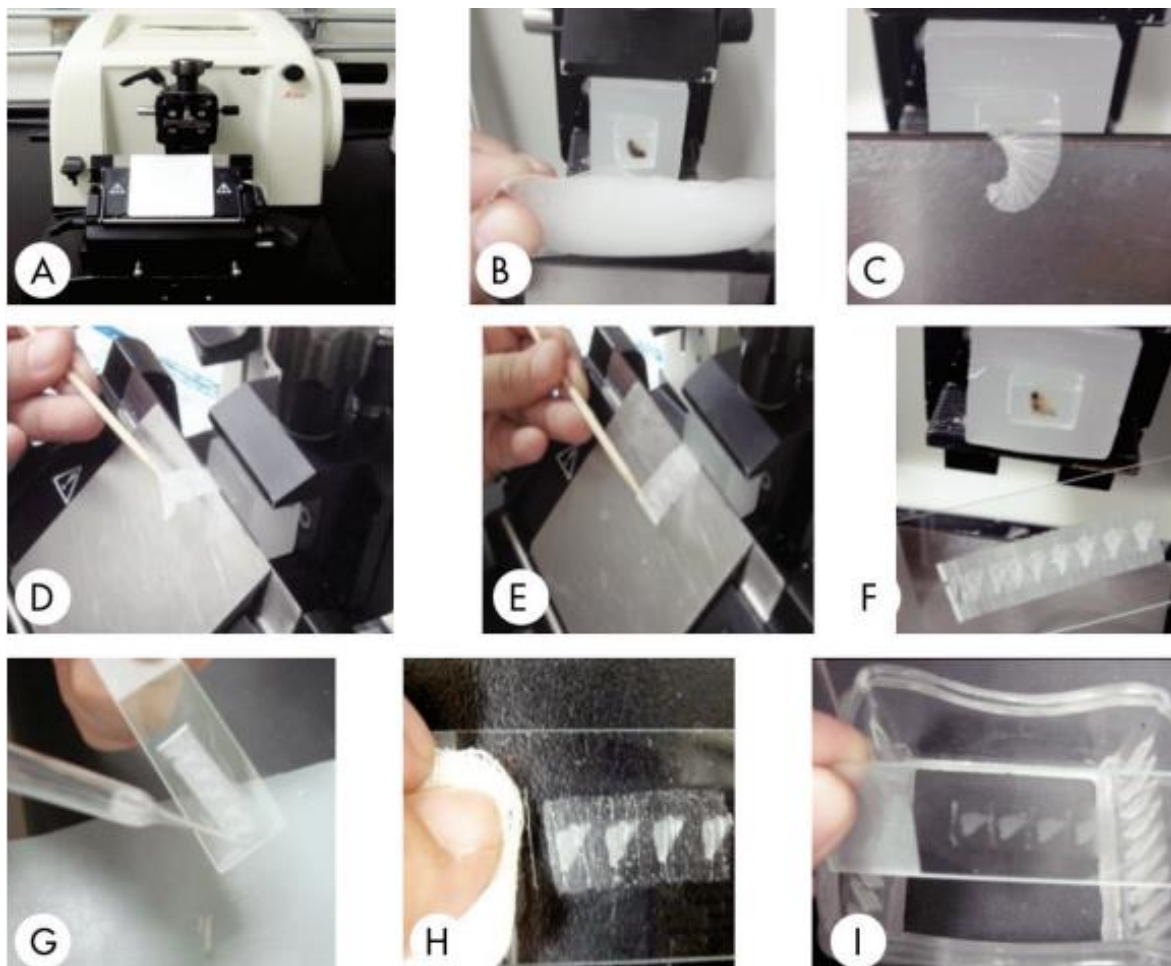
En esta etapa el tejido y la parafina integran un solo bloque que tiene la dureza y consistencia para obtener secciones delgadas y transparentes con ayuda de instrumentos mecánicos: micrótopo, es semejante a una máquina de cortar fimbria y posee una manivela que es girada manualmente para que avance el bloque unos micrómetros para que la muestra llegue hasta la navaja y realice los cortes, generalmente se hacen cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor para microscopia óptica (Canales, 2017; Nava, 2018). El sistema de funcionamiento de un micrótopo consta de los siguientes mecanismos principales:

- Sujeción del bloque de parafina
- Sujeción de la navaja
- Manivela que ayuda a controlar el grosor del corte

El micrótopo de rotación tipo Minot cuenta con una manivela circular, llamada volante, el mecanismo que sujeta al bloque se desplaza frente al filo de la navaja haciendo un movimiento de arriba hacia abajo y viceversa en un movimiento vertical, estos son los de uso más frecuente en laboratorios donde se realiza la técnica histológica, ya que estos pueden obtener secciones muy delgadas de 4-7  $\mu\text{m}$  y producen cortes seriados, es decir que cuando se obtiene un corte, este se queda adherido por su borde anterior al borde posterior del que lo precedió, formándose de esta manera una cinta de cortes que van descendiendo por la superficie anterior de la navaja. El micrótopo de deslizamiento hace un movimiento de atrás hacia delante y viceversa para obtener los cortes, el mecanismo que sujeta al bloque de parafina es el que se desplaza y la navaja permanece estática, estos micrótopos se emplean cuando los tejidos están incluidos en celoidina o cuando la inclusión tiene porciones de muestra voluminosas (Balderas, 2020).

Las navajas y cuchillas de los micrótopos requieren estar muy afiladas, ya que de esto depende que se obtengan buenos cortes, se mantienen afiladas con la ayuda de afiladores automáticos que efectúan la operación en forma rápida y garantizan un afilado uniforme. Cuando se ha realizado el corte generalmente presentan arrugas y muestran una menor área de la que realmente poseen, por lo que es necesario extenderlos para adherirlos a los portaobjetos, al obtener los cortes se

extienden en un baño de flotación a una temperatura de 40°-50°C, la parte brillante del corte (aquella correspondiente al filo de la navaja) es la que entra en contacto con el líquido caliente, si persisten las arrugas se puede hacer uso de pinzas finas y/o un pincel de pelo de camello para extenderlos completamente. Las secciones se sumergen en un baño con grenetina o albúmina, con la finalidad poder colocarlas en un portaobjetos y se adhieran totalmente, una vez colocados se dejan secar a temperatura ambiente o en un horno de calor seco para que las secciones se fijen bien al portaobjetos y no se despeguen durante la tinción y el montaje final (Megías, Molist y Pombal, 2019).



**Figura 88. Cortes en micrótopo de tejido incluido en parafina. Fuente: Imagen obtenida de Verdín Terán, Moreno Fierros, Rojo Botello, García Hernández, Omaña Molina, Meneses Aguirre y Nieto Yáñez, 2013.**

## 5) TINCIÓN

### A) DESPARAFINAR Y REHIDRATAR

Para una correcta tinción de las secciones es necesario quitar la parafina de las muestras, ya que los colorantes son soluciones acuosas que no podrían penetrar bien a los tejidos si la parafina no se retira, esto se logra sumergiendo los portaobjetos en xilol dentro de un recipiente Coplin, este solvente tiene la capacidad de remover la parafina. Luego las secciones se hidratan sumergiéndolas en soluciones de alcohol en concentraciones decrecientes (100, 90, 80, 70, 50), para que finalmente se haga un enjuague con agua destilada para completar la hidratación. El empleo de más o menos series de alcoholes, así como la decisión de terminar en cierta concentración, van a estar en función de la experiencia personal, fragilidad de la muestra, tipo de tinción e inclusión (Elsevier España, 2013).

### B) TINCIÓN DE LA MUESTRA

En este procedimiento, las estructuras celulares van a adquirir un color por la acción de una sustancia colorante. Cuando la incorporación del colorante se realiza en tejidos u organismos vivos se habla de una coloración vital y puede realizarse de forma a) *in vivo* o intravitales, mediante la administración del colorante a los animales de experimentación vivos por ingestión o inyección, los colorantes intravitales son el azul de metileno, rojo neutro o azul de Nilo; también puede ser b) *in vitro* o supravital mediante la administración del colorante a células de cultivo o vivas depositadas en un portaobjetos, el colorante utilizado para esta técnica es el verde Jano. Para la observación de células y tejidos post mortem, se requiere de un procesamiento que preserve la estructura y composición química de la muestra, además deben hacerse cortes en láminas para que puedan ser atravesadas por la luz (Montalvo, 2010).

Para la aplicación de los colorantes se debe tener en cuenta las teorías de tinción para poder elegir la más adecuada para el objeto de estudio. En la Teoría física se trabaja la tinción como un proceso físico de adsorción, donde las partículas del colorante penetran en los espacios intracelulares e intercelulares, un ejemplo de estos colorantes son los Sudanés III o IV, que colorean los lípidos por la facilidad



que tienen para disolverse entre ellas (Serrano, 2013). Por otro lado, la Teoría química se basa en la capacidad del colorante para combinarse a una sustancia coloreable, por la presencia de ciertas agrupaciones moleculares ácidas o básicas en los componentes celulares que forman a su vez sales insolubles; el enlace iónico o electrostático ocurre cuando el colorante y la sustancia que se va a teñir, desarrollan cargas eléctricas diferentes que atraen una a la otra, por ejemplo, el citoplasma celular se colorea porque contiene proteínas que poseen cargas positivas que atraen a las partículas con carga negativa del colorante. Existen varios tipos de colorantes químicos:

- Ácidos

Son sales con una parte básica incolora y componente ácido con color, liberan protones y por esta razón tienen carga eléctrica negativa, por lo que también se conocen como colorantes aniónicos o citoplasmáticos, ya que tiñen al grupo químico  $-NH_2^+$  localizado en un extremo de la cadena de aminoácidos que integran a las proteínas, las tiñen de un color rosado-rojizo y la tinción es más intensa si encontramos en el citoplasma un gran número de mitocondrias, ya que sus membranas y matriz son ricas en proteínas. Las sustancias que atraen eléctricamente a los colorantes ácidos se denominan acidófilas y están constituidas por componentes básicos. Algunos colorantes ácidos son: la eosina, el amarillo de metanilo, la fucsina ácida, el ácido pícrico, el verde rápido, el naranja G, la safranina, el azul de anilina, etc.; la propiedad colorante de la eosina o eosina de sodio se le atribuye al ácido eosínico y no al sodio (Montalvo, 2010).

- Básicos

Son sales que tienen el colorante en la parte con carga positiva (en la base) e incolora la porción ácida, debido a que aceptan protones, se les denomina colorantes catiónicos o nucleares, ya que tienen afinidad por los ácidos nucleicos (ADN/ARN) y las sustancias que tiñen se conocen como basófilas, constituidas por componentes ácidos, en consecuencia, todos los núcleos de las células tienen afinidad por los colorantes básicos y se tiñen de color azul violáceo. Ejemplos de este tipo de colorantes son: la hematoxilina, el rojo nuclear, el azul de metileno, la tionina, el azul de toluidina, la fucsina básica. por ejemplo, el azul de metileno o

clorhidrato de azul de metileno, debe su propiedad colorante a la base azul de metileno y no al ácido clorhídrico que es incoloro (Montalvo, 2010).

### C) Deshidratación

Dado que las laminillas están en un medio acuoso durante la tinción, es necesario deshidratarlas con ayuda de soluciones de alcohol en concentraciones crecientes (50, 70, 80, 90, 100). Luego se sumergen en xilol, para asegurar que el tejido se transparente y desplace al alcohol para permitir la penetración del medio de montaje, el cual emplea generalmente una sustancia hidrofóbica generalmente diluida en xilol (Terán et al, 2013).



Figura 89. A) Proceso de desparafinación e hidratación realizados en jarras de Coplin. B) Proceso de coloración. Fuente: Imagen obtenida de Elsevier España, 2014.

### 6) MONTAJE

Concluido el paso de tinción, las muestras se colocan en condiciones de protección para poder hacer las observaciones necesarias sin que se deterioren, para lograr esto, después de la deshidratación se coloca encima del corte teñido una gota o 0.5

mL de sustancia adherente para rellenar el espacio intermedio entre el portaobjetos y cubreobjetos, se pueden usar resinas naturales como el bálsamo de Canadá o resinas sintéticas de Entellan y Vecta Shield, cuyos índices de refracción son similares a los del vidrio, están diluidas generalmente en xilol, sin embargo, siempre se debe tener como base del medio de montaje el disolvente que se usó para el aclaramiento, para conseguir unas propiedades ópticas y de transparencia óptimas; después se coloca un cubreobjetos sobre la muestra con la resina, cuidando que no se generen burbujas entre los medios, se deja evaporar el xilol y que la resina adquiera la solidez necesaria, para ello se colocan en una platina caliente (54°-50°C) durante 24-48 horas, una vez solidificado el medio de montaje, la muestra está lista para su observación sin riesgo de que se mueva el cubreobjetos. Un buen preparado puede durar décadas y forma parte de los archivos de preparados histológicos que permiten hacer estudios retrospectivos (Montalvo, 2010).

#### PROPUESTA DE TÉCNICA HISTOLÓGICA

	(1)Tinción con H-E	(2) Tinción con H-E	Tinción tricrómica de Van Gieson	Tinción tricrómica de Masson
I.Toma de muestra	Se toma una biopsia de la piel del dorso del ratón de aproximadamente 1cm de largo x 1 cm de ancho x 8mm de profundidad.			
II. Fijación	Formaldehído 10% (24 horas)	Formol al 4% (24 horas)	Se puede realizar cualquiera de las dos técnicas descritas previamente.	
III. Inclusión A)Deshidratación	Etanol al 70, 80 y 90% (45 min c/u)	Etanol al 70, 80 y 90% (2 hrs c/u)		
	Etanol al 96, 100 y 100% (1 hr c/u)	Etanol al 100% (1 hr máx.)		
B) Aclaración o diafanización	Alcohol etílico puro con Xileno 1:1 (20 minutos)	-		
	1° Amílico-Xileno (10 minutos)	1° Butanol (1 hr)		
	2° Amílico-Xileno (30 minutos)	2° Butanol (1 hr)		
C) Inclusión Cuando concluye la segunda parafina se lleva a un refrigerador por 48 horas	Xileno-parafina (1hr)	-		
	1° Parafina (1hr)	1° Parafina (24 hr)		
	2° Parafina (1 hr)	2° Parafina (24 hr)		

	Se construye un molde de aluminio o barras de metal en el que se coloca la muestra orientada según el sentido en que se quieran hacer los cortes y se agrega la parafina de inclusión caliente, se enfría el molde para que solidifique el medio de inclusión y se obtiene el bloque.			
IV. Corte en micrótopo	Se hacen cortes de 6 µm de grosor, se estiran las muestras en baño de flotación con agua y grenetina, se colocan en el portaobjetos y se dejan secar en un horno de calor seco 56° C por 24 horas para remover la parafina			
V. Tinción A) Desparafinar	1° Xilol (5 minutos)	1° Xilol (5 minutos)	1° Xilol (5 minutos)	1° Xilol (5 minutos)
	2° Xilol (5 minutos)	2° Xilol (10 minutos)	2° Xilol (5 minutos)	2° Xilol (5 minutos)
B) Rehidratar	Etanol 100% (10 minutos)	Etanol 100, 90, 80 y 70% (10 lavados c/u)	Etanol 100, 96, 80 y 50% (10 min c/u)	Etanol 100, 96, 80 y 50% (10 min c/u)
	Etanol 96, 90, 80 y 70% (8 min c/u)			
	Agua corriente (5 min)	Agua corriente (10 lavados)	Agua corriente (5 min)	Enjuague con agua destilada (5 min)
	-	-	-	Enjuague con agua destilada (3 x 3min)
C) Tinción de muestra	Hematoxilina (8 min)	Hematoxilina (5 min)	Hematoxilina (10 min)	Hematoxilina (10 min)
	Enjuague con agua (10 lavados)	Enjuague con agua (10 lavados)	Enjuague con agua corriente (5 min)	Enjuague con agua corriente (5 min)
	Alcohol ácido (1 lavado)	Alcohol ácido (1 lavado)	-	-
	Enjuague con agua (10 lavados)	Enjuague con agua (10 lavados)	Enjuague con agua destilada (1 min)	Enjuague con agua destilada (3 min)
	Agua amoniacal (enjuague)	Carbonato de litio (hasta que vire)	Picro fucsina de Van Gieson (4- 5 min)	Fucsina-Escarlata (5 min)
	Enjuague con agua (10 lavados)	Enjuague con agua (1 lavado)	1° Enjuague con agua acida (15 seg)	Enjuague con agua (2 min)
		Etanol 100% (10 lavados)	2° Enjuague con agua acida (15 seg)	
	Eosina (8 min)	Eosina (7 min)	-	Ácido fosfomolibdico 5% (15 min)
				Enjuague con agua destilada (segundos)
				Ácido acético 1% (3 min)
D)Deshidratación	Etanol 70, 80, 90 y 96% (5 min c/u)	Etanol 70, 80, 90 y 100% (10 lavados c/u)	Etanol al 100, 100 y 100% (5 min c/u)	Etanol 80, 96 y 100% (10 lavados c/u)
	Etanol 100% (10 min)			

E) Diafanizar	3° Xilol (5 min)	3° Xilol (10 lavados)	3° Xilol (5 min)	3° Xilol (5 min)
	4° Xilol (5 min)	4° Xilol (hasta que se monte)	4° Xilol (5 min)	4° Xilol (5 min)
VI. Montaje	Se coloca encima del corte teñido una gota de sustancia adherente para rellenar el espacio intermedio entre el portaobjetos y cubreobjetos. Se deja evaporar el xilol y que la resina adquiera la solidez necesaria, se colocan en una platina caliente (54°-50°C) durante 24-48 horas.			
Observaciones	Colágeno: rosa pálido. Músculo: rosa fuerte. Queratina: rojo intenso. Citoplasma: rosado. Núcleos: azul oscuro o púrpura (en realidad se tiñe sólo la cromatina). Eritrocitos: color cereza.	Colágeno: rojo rosado. Músculo: amarillo anaranjado. Citoplasma: amarillo anaranjado. Núcleos: negro azulado. Citoplasma: rosado.	Colágeno: verde azulado. Músculo: rojo, marrón. Citoplasma: rosado. Núcleos: negro. Citoplasma: rosado.	

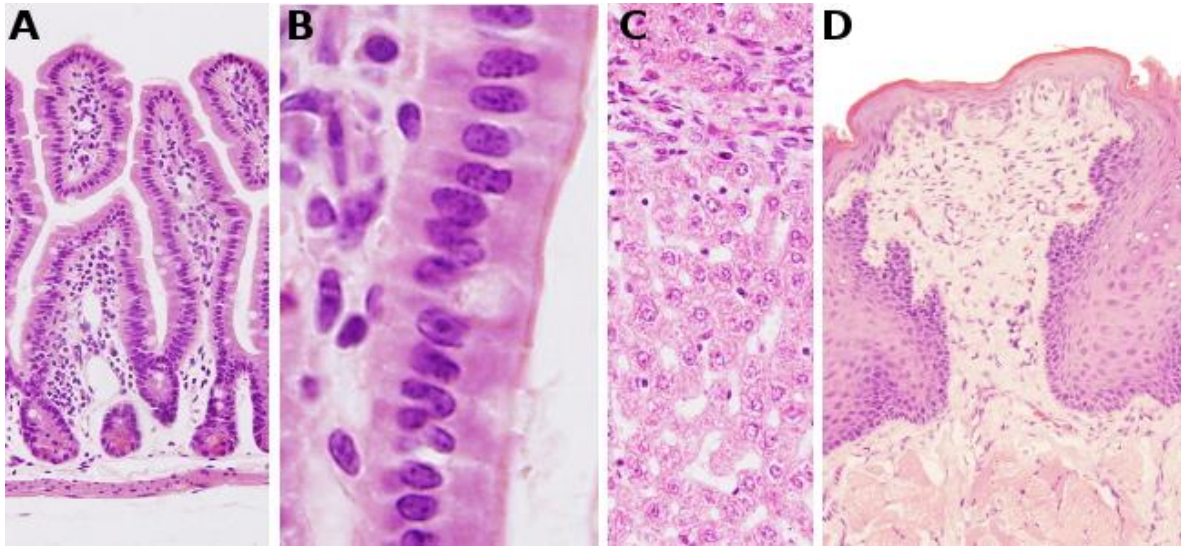


Figura 90. Secciones de parafina de 8  $\mu$ m de grosor teñidas con hematoxilina y eosina. Fuente: Imagen obtenida de <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/protocolos/p-tincion-h-e.php>.

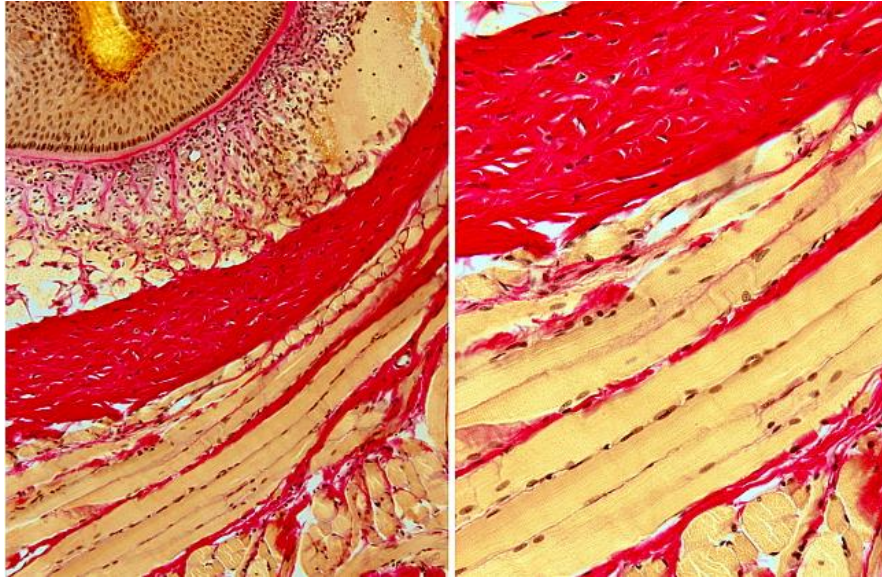


Figura 91. Sección de 8  $\mu\text{m}$  de grosor de una muestra incluida en parafina teñida con tricrómico de Van Gieson. Zona profunda de la dermis. Fuente: Imagen obtenida de <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/protocolos/p-tincion-t-van-gieson.php>

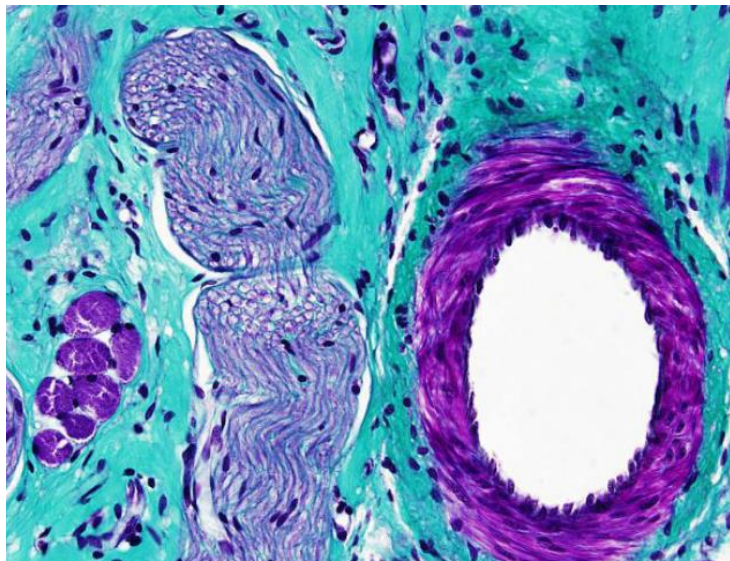


Figura 92. Sección de parafina de 8  $\mu\text{m}$  de grosor teñidas con tricrómico de Masson. Zona profunda de la lengua de rata. Fuente: Imagen obtenida de <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/protocolos/p-tincion-t-masson.php>

Para la valoración del proceso de cicatrización se puede hacer una cuantificación de los núcleos de fibroblastos presentes en la dermis, en un área de 1mm, para esto se usa un microscopio óptico a 10x y 40x y el programa Photoshop y se aplica el estadístico de ANOVA de dos factores, con valor de  $\alpha$  de 0.01, para determinar si hay diferencias significativas entre los tratamientos. También, se puede hacer un análisis de la longitud de la herida con ayuda de un microscopio Motic BA310E en 10x y 40x y el programa Motic Images Pus 20 ML. para comparar las velocidades de cierre (Canales, 2017; Nava, 2018).

## RESULTADOS ESPERADOS Y DISCUSIÓN

Como no se realizaron pruebas experimentales y por tanto no se presentan los resultados de ellas en este escrito, se hizo una exhaustiva búsqueda bibliográfica de los resultados obtenidos en otros estudios de *Prosopis*, que podrían obtenerse si se llevaran a cabo las técnicas previamente descritas y recomendadas. A continuación, se detallan algunas investigaciones consideradas relevantes por los resultados arrojados que se deben tomar en cuenta para la experimentación con *Prosopis laevigata*.

### **CUALITATIVAS**

Delgado-Núñez (2020) realizó una recopilación acerca de diferentes trabajos donde se detectaron algunos metabolitos secundarios, encontró que se confirmó la presencia de flavonoides en *P. flexuosa* var. *depressa* (alpataco), *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* (algarrobo) hojas, *P. laevigata* corteza, hojas y vaina, *P. cineraria* flor, *P. juliflora* tallo, raíz y semilla, *P. pallida* hojas y *P. velutina* hojas. Y se registró la presencia de alcaloides en *P. flexuosa*, *P. flexuosa* var. *depressa* (alpataco), *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* (algarrobo) hojas, *P. laevigata* corteza, hojas y vaina, *P. cineraria* flor, *P. juliflora* tallo, raíz y semilla, *P. pallida* hojas y *P. velutina* hojas. Las cumarinas sólo se presentaron en *P. laevigata* corteza, hojas y vaina; los taninos se registraron en *P. torquata* forraje, *P. flexuosa*, *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* (algarrobo) hojas, *P. laevigata* corteza, hojas y vaina, *P. cineraria* flor, *P. juliflora* raíz, *P. pallida* hojas. Los triterpenos se reconocieron en *P. torquata* forraje, *P. flexuosa*, *P. flexuosa* var. *depressa* (alpataco), *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* (algarrobo) hojas, *P. laevigata* corteza, hojas y vaina, *P. cineraria* flor, *P. juliflora* tallo, raíz y semilla, *P. pallida* hojas. Y se identificó la presencia de saponinas en *P. torquata* forraje, *P. flexuosa*, *P. flexuosa* var. *depressa* (alpataco), *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* (algarrobo) hojas, *P. laevigata* hojas y vaina, *P. juliflora* raíz, *P. pallida* hojas (Rossi *et al.*, 2007; Ardoino *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2016; Khandelwal *et al.*, 2016<sup>a</sup>; Khandelwal *et al.*, 2016<sup>b</sup>; Cárdenas-Camacho *et al.*, 2017; Ramírez-Royo *et al.*, 2019; Delgado-Núñez *et al.*, 2020). Se puede observar que la mayoría de las especies del género *Prosopis* son similares en cuanto a la presencia de las familias más representativas de los metabolitos secundarios, ya que, al ser organismos muy

relacionados filogenéticamente, comparten muchas características que pueden reflejarse en productos idénticos o similares entre ellas, es decir si un determinado compuesto se llegara a identificar presente en una de estas especies, también podría estarlo en otra; es por esta razón que en las siguientes investigaciones a discutir se tomarán en cuenta aquellas en las que se encuentre información relacionada a los objetivos y métodos planteados en el trabajo presente de la especie *P. laevigata*, pero también tomando en cuenta otras especies del género *Prosopis*.

En relación a la identificación cualitativa de la presencia de metabolitos secundarios, Nava (2017) realizó un estudio de dos extractos metanólicos de flores de *P. laevigata* uno obtenido en marzo y otro en febrero en Coxcatlán, Puebla, en ambos extractos se detectó (por pruebas cualitativas) la presencia de fenoles, flavonoides y alcaloides, sin embargo, en la colecta de marzo se observó una mayor presencia de fenoles que en la de febrero, además se debe mencionar que con el reactivo de Dragendorff no se detectaron alcaloides, pero con el reactivo de Mayer sí se registró una mediana presencia, esta investigación corrobora que con el reactivo de Mayer pueden reaccionar casi todas las soluciones de alcaloides, aún si se encuentran en bajas concentraciones a comparación del reactivo de Dragendorff, que no logra reaccionar con estos compuestos. Además, el autor menciona que los rendimientos para los extractos fueron de 18.95% para febrero y 22.93% para marzo.

Moreno (2019) realizó una colecta de hojas de *Prosopis laevigata* en Zapotitlán, Puebla y menciona que se obtuvo un rendimiento del extracto metanólico de 24.9% (18.16 g de peso seco). También realizó una prueba de identificación de metabolitos secundarios, donde se detectó alta presencia de fenoles y mediana presencia de flavonoides y alcaloides, estos últimos compuestos fueron identificados por medio del reactivo de Meyer. Haciendo una comparación con el anterior trabajo hecho por Nava, se puede observar que el extracto de flores obtenido en marzo tiene cierta similitud en cuanto al rendimiento del extracto y la alta presencia de fenoles con el extracto de hojas de Moreno, con base a esto, sería interesante investigar si comparten los mismos compuestos de metabolitos secundarios aun siendo de diferentes partes de la planta y diferente lugar.



## **Fenoles**

Por su parte, Gallegos et al., (2013) hicieron una investigación de las vainas de *P. laevigata* y el efecto del procesamiento térmico sobre la capacidad antioxidante, el material biológico fue colectado en Las Mercedes, Durango, se desengrasaron las vainas y se hizo un extracto acetónico, que posteriormente fue liofilizado, determinaron el contenido de fenoles totales por el método de Folin Ciocalteu y encontraron que las muestras secadas a 60°-150° C redujeron hasta un 30-43% de sus fenoles, de 70°-150° C disminuyeron del 63-66% y en una temperatura de 80°-150° C se registró de 20-37% menos fenoles, además encontraron que en 100g de harina de mesocarpio y semilla de la vaina hay 22.51g de proteína, 2.38 g de fibra cruda y 22.46 mg de fenoles totales (equivalentes de ácido gálico), por otro lado en 100g de harina de mesocarpio y semilla de la vaina con el tratamiento térmico se obtuvo 20.97g de proteína, 2.14g de fibra cruda y 19.02 mg de fenoles totales (equivalentes de ácido gálico). Lo que indica que la estabilidad de las proteínas, fibra y sobre todo de los fenoles se reduce al aplicarles temperatura, por lo que para la obtención del extracto no es recomendable utilizar técnicas que empleen el calor ya que se pueden degradar los fenoles y si se desean cuantificar e identificar no se registrarían todos estos compuestos, ya que algunos no estarán presentes en la muestra; por esta razón se sigue recomendando obtener el extracto mediante la maceración.

Díaz-Batalla et al., (2018b) dedicaron una investigación para la caracterización química y nutricional de las harinas crudas y tratadas térmicamente de las vainas de *P. laevigata* y sus salvados residuales; ellos sospechan que las harinas pueden ser una fuente de fenoles, antioxidantes y que llegan a funcionar como antiinflamatorias, para comprobar lo siguiente recolectaron el material biológico a estudiar en el Valle del Mezquital en Hidalgo. Se determinaron los fenoles totales para ello se realizó el método de Folin-Ciocalteu a los extractos crudos y se obtuvo 8.87 g de equivalentes de ácido gálico (GAE)/ kg de peso seco para la harina de mesocarpio crudo, 6.57 g GAE/kg en la harina de semilla de mesocarpio y 8.36 g GAE/kg para el de la harina de semilla, si se compara con el estudio anterior de Gallegos et al. 2013, donde obtuvieron 22.46 mg GAE en 100g de harina sin tratar

térmicamente y 19.02 mg GAE en 100g, se puede observar que en esta investigación se obtuvo más contenido de fenoles totales, esto refleja que la muestra del primer estudio debería multiplicar su contenido de fenoles 3.5 veces para igualar la concentración de las harinas de Díaz-Batalla et al., (2018b); además también resultó presentar los valores más altos, en comparación con *Prosopis nigra* y *Prosopis alba* que reportan 33-66 mg y 22-46 mg de GAE en 100 g de harina de vaina de acuerdo con Pérez et al (2014), estas concentraciones también son más elevadas que las que encontraron Gallegos et al. (2013) Por su parte Díaz-Batalla et al., (2018a) en su trabajo de las harinas crudas y extruidas de semilla del mezquite, registraron en la cuantificación total de fenoles 6.68 y 6.46 mg GAE/ g respectivamente, siendo hasta ahora los valores más bajos reportados para los fenoles en el género *Prosopis*.

En otra investigación hecha por Ramírez-Rojo et al. 2019, se realizó la cuantificación de fenoles totales del mezquite con el reactivo de Folin-Ciocalteu, para reaccionar con los fenoles y el ácido gálico como estándar de referencia, el extracto con mayor contenido de fenoles fue el etanólico con 90 mg GAE/ g de extracto seco, seguido por 75 mg GAE/ g del extracto acuoso-etanólico y por último el acuoso con 50 mg GAE/ g. Rivera-Castro y Sánchez-Escalante (2016) también estudiaron el contenido de fenoles totales por medio de la reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con los extractos etanólicos y acuosos de la vaina de *Prosopis velutina*, y el extracto con el solvente etanólico reportó de  $53 \pm 4.2$  mg GAE/ g, mientras que el acuoso registró  $6.2 \pm 0.5$  mg GAE/ g; al igual que en el caso anterior a este, se ve una tendencia en los extractos acuosos a mostrar una significativa concentración menor de fenoles, ya que se refleja que el solvente más polar tiene la mejor capacidad para extraer los compuestos fenólicos y es por esta razón que se sigue recomendando la extracción por medio del metanol, ya que es más polar que el agua.

Nava (2017) estudió los extractos de flores de *P. laevigata* de Coxcatlán, Puebla y obtuvo que en la colecta de febrero se registraron 61 mg GAE/ g y en la colecta de marzo 488 mg GAE/ g, siendo ocho veces mayor los fenoles de marzo que los de la primera colecta. Por su parte, Moreno (2019) en su extracto de hojas de *P. laevigata* de Zapotitlán, Puebla, se cuantificaron los fenoles totales y se obtuvieron

67 mg GAE/g. Antes se había mencionado, que para estos dos últimos autores, la prueba cualitativa arrojó una alta presencia de fenoles en el extracto de flores de marzo y el extracto de hojas, sin embargo, ahora se ve una clara diferencia entre ambos, el extracto de Moreno debería multiplicarse 7.2 veces aproximadamente para igualar la concentración de los fenoles del extracto de marzo, pero tiene similitud en con los valores reportados para el de febrero, lo que sugiere que para obtener la mayor cantidad de fenoles presentes en las flores se debe hacer la recolecta en el mes de marzo y de esta extraer con solventes orgánicos los fenoles.

### **Flavonoides**

En cuanto al contenido de flavonoides, Díaz-Batalla et al., (2018b) hicieron la determinación de los extractos crudos de las harinas de las vainas de *P. laevigata* y sus salvados residuales, para ellos se hizo reaccionar el extracto con una solución de cloruro de aluminio y para la curva patrón se empleó quercetina, por tanto, los resultados se expresaron como gramos de equivalentes de quercetina/kg de peso seco (g QE/ kg). Para el extracto de harina de mesocarpio se registraron 0.02-0.28 g QE/ kg de flavonoides, en el extracto de la harina de semilla fue 0.01-0.32 g QE/ kg y para el extracto de harina de semilla de mesocarpio hubo 0.01-0.30 g QE/ kg; tomando en cuenta los valores de fenoles presentados anteriormente, el extracto de harina de semilla fue el que registró más fenoles aun cuando también fue el que menos fenoles obtuvo, es decir 2.5% del extracto se compone de flavonoides. Este estudio nos confirma la implementación del cloruro de aluminio y quercetina para reaccionar y tener un referente para la cuantificación de flavonoides en la muestra a estudiar, además de que sirve como un punto de comparación entre los flavonoides que pudiera contener un extracto de vaina y otro de las flores del mezquite.

Volviendo a la investigación de Rivera-Castro y Sánchez-Escalante (2016), se usó como estándar una solución de quercetina y otra de cloruro de aluminio para la cuantificación de flavonoides, se encontró en los resultados que el extracto acuoso de *Prosopis velutina* hay  $1.5 \pm 0.1$  mg QE/ g y en uno etanólico se encuentran  $1.2 \pm 0.3$  mg QE/ g, este fenómeno se lo atribuyen a la composición de la harina de las vainas de mezquite y la forma en la que se realizó la extracción. En otra investigación hecha

por Ramírez- Rojo et al. 2019, para la cuantificación de flavonoides se observó esta misma tendencia, el extracto etanólico fue que tuvo mayor contenido de mg equivalentes de rutina/g de extracto seco y el extracto acuoso-etanólico fue el que presento menor concentración de este compuesto, cabe mencionar que se midió en función de la formación de complejos con el cloruro de aluminio, como inicialmente se había recomendado en este escrito, por tanto, se sigue sosteniendo la técnica propuesta.

Retomando la investigación de Nava (2017), se registró que en la colecta de febrero se obtuvieron 0.364 mg QE/ g y en marzo hubo 23.2 mg QE/ g y al igual que en el caso de los fenoles, la segunda colecta fue mayor a la primera, aproximadamente 63 veces más. Moreno (2019) identificó 2.6 mg QE/g de flavonoides en un extracto de hojas de *P. laevigata*. De todos los estudios anteriores contemplados acerca de la cuantificación de flavonoides, los que reúnen una menor cantidad de estos compuestos son los de harina de vaina y los que reportan mayor concentración son el extracto de flores colectadas en marzo y el extracto de hojas, los tres anteriores extractos de la especie *P. laevigata*, lo que indica que si se busca en un extracto una alta presencia de flavonoides lo más efectivo es extraerlos de las flores; de igual forma, estos datos ofrecen una buena referencia sobre en qué temporada del año es recomendable reunir las flores del mezquite con el fin de que contengan la mayor concentración de fenoles y flavonoides, además, presentan una aproximación muy cercana a la cantidad de flavonoides que se podrían encontrar en un extracto como el que se propone realizar en este escrito.

### **Alcaloides**

Retomando la investigación de Ramírez-Rojo et al. 2019, se identificó la presencia de alcaloides por medio del reactivo de Dragendorff, también se hizo una identificación de compuestos cianógenos y saponinas, en ninguno de los extractos puestos a prueba se registró la presencia de estos componentes, indica que *P. velutina* tiene ausencia de esos fitoquímicos tóxicos; sin embargo, en *P. juliflra* sí se reportaron alcaloides (Sathiya y Muthuchelian, 2008) y en *P. glandulosa* y *P. velutina* no se reconocieron compuestos cianógenos (Becker y Grosjean, 1980), por lo que se puede inferir que los extractos de *Prosopis* pueden ser reconocidos como

seguros. Por su parte, Delgado Núñez (2020) en su estudio de diferentes extractos de las hojas de *P. laevigata*, recolectadas en el Estado de Morelos, determinaron la presencia de alcaloides utilizando los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner, lograron identificar que el extracto hidroalcohólico y la fracción acuosa de este extracto tuvieron una reacción positiva fuerte a los tres reactivos, mientras que en la fracción orgánica de acetato de etilo se registró una reacción positiva débil de los reactivos, por tanto se infiere que la mayor cantidad de alcaloides están presentes en la fracción acuosa. Además, se describe la preparación de cada reactivo y coincide en que el reactivo de Mayer es la mejor opción para identificar la presencia de alcaloides en una sustancia, ya que es sencillo de preparar y no exige muchos compuestos y, por tanto, no produce tantos desechos a tratar como el reactivo de Dragendorff o Wagner, sin mencionar que este último necesita de calor para que la reacción se lleve a cabo.

Volviendo al estudio de Nava (2017), se menciona que se obtuvo en la colecta de febrero 66.96 mg e A/g (equivalentes de atropina por gramo de extracto) y en la colecta de marzo 67.39 mg e A/g, varía por muy poco la concentración de alcaloides entre los dos meses, a diferencia de los fenoles y flavonoides que si presentaron una diferencia significativa entre cada colecta. Por su parte, Moreno (2019) identificó 11.87 mg e A/g en un extracto de hojas de *P. laevigata*. En cuanto al caso de los alcaloides, al igual que los fenoles y flavonoides, se muestra una tendencia a una mayor concentración de compuestos en un extracto de flores, por lo que se sigue sugiriendo esta parte de la planta para la máxima extracción de metabolitos secundarios.

### **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

Para la prueba de captación de radicales libres, Díaz-Batalla et al., (2018b), implementaron el método de DPPH con los extractos crudos de las harinas de *P. laevigata* y sus salvados residuales y se observó que la capacidad de eliminación de radicales libres aumentó en los extractos de las harinas térmicamente tratadas, este fenómeno se le atribuyó a las reacciones de Maillard que involucran azúcares y aminoácidos que producen pigmentos amarillo-marrones que pueden interferir con la absorbancia, ya que el DPPH produce un color amarillo cuando se reduce. Por

su parte Díaz-Batalla et al., (2018a) en su trabajo de las harinas crudas y extruidas de semilla del mezquite, proponen que los productos de la reacción de Maillard se detectan en el espectrofotómetro a 290nm, por tanto, si se hace una lectura a 540 nm como se propone en este proyecto, los productos de esa reacción no deben de representar una variable de ruido al hacer la prueba de capacidad antioxidante; en relación al estudio que hicieron estos autores, se detectó que en la harina cruda y en la extruida se encuentran 9.11 y 9.32 mg de equivalentes de ácido ascórbico/ g (mg AAE/ g) respectivamente para la capacidad de eliminación de radicales 2-2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

Cattaneo et al (2016) realizaron una investigación sobre la capacidad antioxidante de diferentes tipos de extracto de hoja (acuoso EAM, etanólico EEM y acuoso-etanólico EAEM) en *Prosopis velutina*, ellos indican que la extracción de compuestos antioxidantes es altamente dependiente de la naturaleza del solvente que se utiliza, por lo que se recomienda usar solventes polares para la recuperación de fenoles, que son los compuestos que generalmente presentan la capacidad antioxidante, por ello es correcto proponer al metanol como un solvente para extraer fenoles. La actividad antiradical se llevó a cabo con DPPH y se utilizó como estándares de referencia la vitamina C y el Trolox, los cuales presentaron valores mayores al 80% de inhibición de DDPH, los resultados mostraron que el extracto que presentó mayor capacidad antioxidante fue el EEM, inhibió el 25% del DPPH, seguido de EAEM y por último el extracto acuoso (EAM), el cual no alcanzó ni el 20% de inhibición; en otro estudio hecho por García-Andrade et al. 2013, sucedió algo parecido cuando demostraron la actividad antioxidante de diferentes extractos de hojas de *Prosopis laevigata*, se encontró que el extracto con mayor actividad antioxidante fue el metanol, después el de agua-metanol, agua y por último uno de acetona. En ambos casos el extracto etanólico y el metanólico fueron en los que se reporta más capacidad antioxidante, esto se debe a que extraen mejor los compuestos fenólicos, gracias a los resultados de esta investigación se sigue recomendando el metanol para la extracción de los compuestos florares del presente estudio.

Retomando la investigación de Rivera-Castro y Sánchez-Escalante 2016, se puso a prueba la actividad antioxidante de los extractos etanólicos y acuosos de la vaina de *P. velutina* a través del método de reducción del radical DPPH y se obtuvo que el extracto con mayor actividad antiradical fue el acuoso, inhibiendo de un  $71.4\% \pm 1.1\%$  de DPPH, mientras que el extracto etanólico reportó un  $63.3\% \pm 0.5\%$  de reducción del radical, esto concuerda con los datos que se reportaron para los flavonoides, ya que el extracto que registró mayor presencia de flavonoides fue el acuoso y esto lo explicaban por la composición de la harina de las vainas de mezquite y la forma en la que se realizó la extracción. Sin embargo, cabe recalcar que este método tiene una excelente estabilidad, si se trabaja en las condiciones necesarias, ya que presenta radicales libres que pueden obtenerse sin una preparación previa, caso contrario al ABTS que tienen que ser generados tras una reacción química, enzimática o electroquímica (Kuskoski et al., 2005).

Por otro lado, Astudillo et al. 2000, evaluaron la actividad antiradical de extractos metanólicos de hojas de diferentes especies de mezquite y encontraron que en una concentración de  $100 \mu\text{g/mL}$  se reduce el DPPH un 65% para *P. chilensis*, 54% *P. tamarugo* y 8% en *P. alba*, esta actividad se le asocia a la catequina; Napar et al, en 2012, reportaron el 60.5% y 47.8% de reducción del radical DPPH para los extractos metanólicos de hojas de *P. cineraria* y *P. juliflora* respectivamente. Por su parte, Nava (2016) reportó para el extracto de flores de *P. laevigata* de febrero una  $CA_{50}$  a una concentración de  $591.38 \mu\text{g/mL}$  y para el de marzo  $907.67 \mu\text{g/mL}$ . Moreno (2019) registró una  $CA_{50} = 334.87 \mu\text{g/mL}$  para el extracto de hojas de *P. laevigata*; estos dos últimos autores reportan una baja actividad antioxidante de acuerdo con Al-Fatimi et al (2007), sin embargo, se necesitó una menor concentración del extracto de hojas para llegar a la  $CA_{50}$  aún cuando se sabe que reportó un menor contenido de fenoles, flavonoides y alcaloides que el extracto de flores; el extracto de hojas de *P. chilensis* fue el que tuvo la  $CA_{50}$  más alta, llegando a inhibir al DPPH una concentración menor a  $100 \mu\text{g/mL}$ , ya que a esa concentración se inhibe el 65% de los radicales, después de este le sigue *P. tamarugo* con el 54% de inhibición a  $100 \mu\text{g/mL}$ , lo anterior coincide con la premisa

de que las hojas parecen poseer una mayor actividad antiradical, a comparación de las flores.

Los antioxidantes en las plantas previenen o retardan oxidativo producido por los radicales libres, ya sea en la etapa de iniciación, propagación, terminación, descomposición o en la subsecuente oxidación de los productos, además el crecimiento de las plantas en ambientes desfavorables o con recursos limitados producen un incremento en la generación de ROS, por lo tanto, la planta debe aumentar sus niveles de antioxidantes para enfrentar las condiciones, los antioxidantes tienen como función la defensa contra la radiación UV, bacterias, hongos y otras plantas, además sirven como marcadores químicos para atraer a los polinizadores hacia el néctar y entre sus funciones destaca el papel estructural, proporcionan fuerza y rigidez a la pared celular, protección contra la herbivoría (Sevilla, 2011). Teniendo en cuenta todo lo anterior, las flores de *Prosopis laevigata* deberían reportar niveles altos de actividad antioxidante, ya que crecen en ambientes adversos, además de que poseen pigmentos llamativos que atraen a los polinizadores y que pueden producir un desagradable sabor para los animales herbívoros, por lo que se esperaría que la capacidad antioxidante sea mayor en un extracto de flores que en uno de hojas.

### **CROMATOGRAFÍAS**

Díaz-Batalla et al., (2018b) en su investigación para la caracterización química y nutricional de las harinas crudas y tratadas térmicamente de las vainas de *P. laevigata* y sus salvados residuales, determinaron azúcares reductores y aminoácidos que contienen azufre mediante el método de HPLC, utilizando el agua como fase móvil a una temperatura de 80°C, para los azúcares se registraron de 81-447g/kg de harina de mesocarpio crudo, 97-304 g/kg de harina de semilla de mesocarpio y 95-99g/kg de harina de semilla, siendo la sacarosa el principal disacárido seguida de la glucosa, fructosa y xilosa (monosacárido). Por otro lado, los aminoácidos que se encontraron en las harinas fueron: isoleucina, tripsina, valina, metionina, cisteína y lisina, este último en altos valores, lograron detectar que la vaina completa tiene un perfil de aminoácidos más amplio que la semilla. Delgado-Núñez (2020) también trabajó con la harina de la vaina de *P. laevigata* e



identificó los aminoácidos histidina, treonina, lisina, triptófano, valina, metionina con cisteína, isoleucina, leucina y fenilalanina con tirosina; en comparación con los autores anteriores, Delgado-Núñez (2020) encontró mayor variedad de aminoácidos presentes en su harina, sin embargo no se registró la presencia de tripsina como en el de Díaz-Batalla et al., (2018b), pero al hacer una identificación de aminoácidos para la harina de semilla de *P. laevigata* se encontró una mayor variedad de estos compuestos debido a que tienen un alto contenido proteico necesario para que pueda desarrollarse el embrión de la planta, se registró la presencia de aspartato, treonina, serina, glutamina, prolina, glicina, alanina, valina, isoleucina, tirosina, fenilalanina, histidina, lisina, arginina, cisteína, metionina, triptófano, metionina con cisteína y fenilalanina con triptófano. De las anteriores investigaciones se debe rescatar la presencia de algunos aminoácidos como la prolina e hidroxiprolina, que son los precursores de colágeno y es fundamental para el proceso de cicatrización, además los azúcares como la manosa y sus derivados (glucomanano y acemanano) forman parte de la matriz extracelular y también activan algunos receptores de factores de crecimiento de fibroblastos, lo que deriva a más fibroblastos, colágeno y proteoglicanos; es decir, si se encontrarán algunos de estos compuestos en el extracto de flores de *P. laevigata* ayudarían al proceso de cicatrización, al proporcionarle a las células algunos compuestos indispensables para el cierre de una herida.

Retomando la investigación de Ramírez-Rojo et al. 2019, se comenta que los extractos que se obtienen de cáscaras, polen y hojas del género de *Prosopis* tienen propiedades importantes como la antifúngica, antimicrobiana, citotóxica, antiinflamatoria, antitumoral, antiviral, antidiarreica y antioxidante que son atribuidas a la presencia de alcaloides y fenoles, de estos últimos compuestos se reporta la catequina, quercetina, apigenina, juliflorina, kaempferol, ácido gálico, galato de epicatequina, luteolina, rutina y mezquitol. Cattaneo et al (2016), reportaron los siguientes fenoles: C-glicosil flavonas, incluyendo schaftoside, isoschaftoside, vicenin II, vitexin e isovitexin para *Prosopis alba*, estos compuestos fueron corroborados por Sharifi-Rad et al. 2019, y los correlacionó con efectos antiplasmodiales, antiinflamatorios, anticancerosos, antidiabéticos y de cicatrización

de heridas; esto abre la posibilidad de encontrar alguno de los compuestos previamente mencionados en el extracto las flores de *P. laevigata*, además de reafirmar la conjetura de probable agente cicatrizante.

Por su parte Schmeda-Hirschman et al. 2020, encontraron que en las harinas de las vainas de *Prosopis* hay un total de 45 flavonoides derivados del ácido elágico, catequina y fenoles simples. Díaz-Batalla et al., (2018a), en su trabajo de las harinas crudas y extruidas de semilla del mezquite encontraron que .0416 mg/ g y .0395 mg/ g corresponden al flavonoide de Apigenina. Por su parte, Pérez et al. 2014, identificaron que la harina de las vainas de *Prosopis nigra* se caracteriza por la presencia de antocianinas, reflejándose en una tonalidad púrpura, así como 14 glucósidos flavonoides y se compara su espectro contra la harina de las vainas de *Prosopis alba* de color marrón claro, que muestra 8 glucósidos flavonoides, como los constituyentes más relevantes de la harina, lo que indica que *Prosopis nigra* tienen mayor diversidad química, los compuestos principales fueron: quercetina, O-glucósidos y C-glucósidos basados en la apigenina.

García-Andrade et al. 2013, hizo una extracción con acetona-acuosa de hojas de *Prosopis laevigata* y de la fracción polar se identificaron los siguientes fenoles. ácido gálico, ácido cumárico, ácido cafeico y de flavonoides se identificó la catequina, galocatecol, quercetina, galato de epicatequina, rutina, morina, naringenina y luteolina, coincidiendo con algunos trabajos previos de cuantificación de flavonoides donde se utilizaba la luteolina, rutina y quercetina como estándar de referencia. Ruiz-Nieto et al, 2020 analizó los fitoconstituyentes de diferentes especies de *Prosopis* y obtuvo que *P. laevigata* presentó isoramnetina, luteolina y 4'-O-metilcatequina, *Prosopis glandulosa* tenía Juliprosopina, *Prosopis juliflora* mostró Juliflorina y *Prosopis cineraria* exhibe Prosofilina y 5,5-oxybis-1,3-benzenediol, teniendo algunas similitudes con los resultados de otros autores. Se puede observar que varias especies comparten ciertos compuestos como la catequina, apigenina, quercetina y luteolina (flavonoides), por lo que se podría inferir que sea una sinapomorfia, que significaría que podría estar presente en un extracto de *P. laevigata*.

Schmeda-Hirschman et al (2020), mencionan que los alcaloides hallados en *Prosopis* se encuentran principalmente en las hojas, que se utilizan como forraje para ganado, lograron aislar e identificar los alcaloides de piperidina, triptamina, tiramina y  $\beta$ -fenetilamina, estos no mostraron toxicidad ni efecto mutagénico. Sin embargo, Sánchez en 2014, hizo una cromatografía en capa delgada de la harina integral de *Prosopis laevigata* y reconoce algunos posibles alcaloides como 1) alcaloides derivados del triptófano (indólicos): ergometrina, ergotamina, aspidospermina y reserpina, los primeros dos son considerados micotoxinas o alcaloides neurotóxicos, 2) reserpina, alcaloide con núcleo indólico y efecto antihipertensivo, 3) alcaloide derivado de la tirosina: hordenina, 4) cefalina, alcaloide isoquinoleico monoterpénico con actividad emética, 5) alcaloide derivado de la ornitina y lisina (pirrolidínicos): fisostigmina, que no se encuentra en *P. laevigata* ya que se utilizó revelador  $\text{HNO}_3$  concentrado y dio un resultado negativo 6) alcaloides derivados de aporfinas (aporfinoides): bulbocapnina, que fueron descartados con ayuda del reactivo de Marquis y arrojando negativo para estos componentes, 7) alcaloides con anillo tropánicos: escopolamina, se relacionan con efectos alucinógenos y anticolinérgicas, 8) alcaloides derivados del ácido nicotínico: arecolina, presente en *Areca catechu*, por lo que también se descarta la presencia en *Prosopis laevigata*. En este estudio se puede apreciar que el alcance de una cromatografía en capa delgada, esta nos ofrece un panorama de los probables compuestos que pueda contener una muestra, sin embargo, su precisión no es tan confiable como una cromatografía de gases o una líquida, ya que se enfocan en separar, por lo que, si el objetivo es identificar algún compuesto, se debe recurrir a una técnica con mayor resolución, esto mismo se refleja en el siguiente trabajo al que se recurrió.

Retomando el trabajo de Delgado Núñez (2020), acerca de los extractos: hidroalcohólico (E-HA), acuoso (F-Aq) y de acetato de etilo (F-AcEt) de las hojas de *P. laevigata*, se menciona que la fracción más activa (F-AcEt) se procesó en cromatografía de sílice gel en una columna abierta usando un gradiente de solventes con polaridad creciente en fase móvil y de esta se obtuvieron un total de 45 fracciones que se analizaron por cromatografías en capa fina con gel de sílice,

las subfracciones se agruparon según su similitud química, dando como resultado cuatro subfracciones (C<sub>1</sub>F<sub>1</sub> de 5.7 g, C<sub>1</sub>F<sub>2</sub> de 6.0 g, C<sub>1</sub>F<sub>3</sub> de 3.5 g y C<sub>1</sub>F<sub>4</sub> de 1.5 g); la C<sub>1</sub>F<sub>1</sub> se sometió a fraccionamiento en columna abierta con gel de sílice en fase normal y se colectaron 74 fracciones, que también se pasaron por una cromatografía de capa fina y se agruparon de acuerdo a su similitud química, resultando en C<sub>2</sub>F<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>F<sub>2</sub> y C<sub>2</sub>F<sub>3</sub>. Se tomó la C<sub>2</sub>F<sub>2</sub> (2 g) para aislar sus compuestos por medio de una cromatografía en columna abierta con sílice gel polygoprep® 60-50 C18 en fase reversa, de esta se obtuvo un total de 41 fracciones, se combinaron la 14, 15 y 16 para formar un polvo amarillo sólido, mientras que con la 17 y 18 produjeron una mezcla de compuestos al cual lo nombraron C1, la fracción 22 fue el C2 y la fracción 26 fue el C3. Gracias a estas cromatografías se detectó la presencia de fenoles, flavonoides, alcaloides, taninos, triterpenos y saponinas, sin embargo, no se logró identificar que compuesto en específico conformaban estos grupos, por lo que se hizo un análisis cromatográfico por HPLC acoplado a un detector de fotodiodos y software EmpowerPro, se utilizó una columna Supelcosil LC-F (4,6 mm 50 mm), con un tamaño de partícula de 5µm, el volumen de inyección fue de 10µL, la fase móvil consistió en una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,5% (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B) en un sistema de gradiente y el detector de matriz de fotodiodos se fijó a una longitud de onda de 310 nm para la identificación de compuestos fenólicos, también se determinaron pesos moleculares de los compuestos aislados en el espectrómetro de masas triple cuádruple (MS) de Waters equipado con una ionización por electrospray y se utilizó al argón como gas de colisión a una velocidad de flujo de 0.10 mL/min (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania). En esta cromatografía se registró que el E-HA tenía compuestos polares, de polaridad intermedia y de baja polaridad, entre ellos se encontraban al menos seis compuestos fenólicos (con tiempos de retención RT DE 4.5 y 8.3 min) y cuatro flavonoides (8.6, 8.9, 9.5 y 25.6 min RT), para la F-AcEt también se registraron los flavonoides en los tiempos (8.7, 9, 9.5, 10, 10.3 y 15.7 min RT). Por otro lado, la MS permitió identificar en la subfracción C<sub>2</sub>F<sub>2</sub>, la presencia de tres flavonoides: isoramnetina, una mezcla de isoramnetina-luteolina, luteolina y 4'-O-metilcatequina, el C1 reveló que el compuesto tenía un λ<sub>max</sub> a 254 y 373 nm,

característico del flavonoide isoramnetina, mientras que el C2 produjo un polvo naranja que presentó una  $\lambda_{\max}$  a 205, 255 y 368 nm, característico de los flavonoles, pero también mostró una similitud con el C1, ya que presentaba las mismas señales de desplazamiento químico, pero carecía de una señal en el grupo metoxilo en C-3', lo que indicaba la característica del flavonoide luteolina. Y el C3 produjo un compuesto color rosa que mostró un espectro de absorción de UV entre valores de  $\lambda_{\max}$  236 y 279 nm; característica de un flavonoide llamado catequina. Este estudio también coincide con lo que encontraron Ruiz-Nieto et al (2020) y García-Andrade et al. (2013) ya que se encontraron isoramnetina, 4'-O-metilcatequina, isoramnetina, luteolina y catequina en sus investigaciones de *P. laevigata*, por lo que es muy probable que también se encuentren estos compuestos en un extracto de flores.

Retomando la investigación de Nava (2017), se realizó una HPLC para la identificación de xantofilas y los resultados arrojaron que en los extractos de *P. laevigata* hay diferentes pigmentos, en ambos extractos el pico más alto se registró como luteína. También se hizo otra HPLC-DAD donde se trató de identificar más compuestos presentes en el extracto de febrero, sin embargo, sólo se pudo llegar a nivel de familia química, ya que no se tuvieron coincidencias en la base de datos que se usó, por lo que se identificaron por medio de los espectros UV, de esta colecta se identificaron los siguientes compuestos: flavona, flavonol, isoflavona (1), isoflavona (2), ácido fénolico, dihidrochalcona, flavanonol, fenil propanoide (1), fenil propanoide (2) y fenil propanoide (3); para el extracto de marzo se registró la presencia de isoflavona, flavona, flavanona, 3-antraquinona, antraquinona, fenantreno, hidroxycoumarina, rotenoide y flavonol. También se realizó una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación de compuestos con la base de datos del mismo por medio del tiempo de retención, el extracto de febrero registró presencia de alcohol coniferílico, ácido palmítico (antiinflamatorio), ácido linoleico (antibacteriano), ácido linolénico (antiinflamatorio) y palmitato de isopropilo. El extracto de marzo se trabajó en dos fracciones y se encontró ácido palmítico (antibacteriano), ácido linoleico (antibacteriano) y 1,2-Benzisothiazol-3-amine tbdms en la fracción metanólica y en la fracción de

diclorometano se halló ácido linoleico (antibacteriano). Este autor, también hizo una HPLC-MS, para el extracto de febrero se identificó vainillina, ácido caféico, crisina y acacetina y en el de marzo se encontró pinocebrina, apigenina, naringenina, kaemperol y quercetina.

Moreno (2019) realizó una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y se encontró en un extracto de hojas de *P. laevigata* un total de 7 compuestos diferentes, sin embargo, no pudieron ser identificados por la base de datos utilizada. También se realizó una HPLC-DAD y de acuerdo con los resultados del tiempo de retención y el espectro UV los compuestos identificados a nivel de grupo químico fueron: fenol simple (1), fenol simple (2), fenol simple (3), catecol, fenol simple (4), fenol simple (5) y un compuesto no identificado. Igualmente se hizo una HPLC-MS, se detectaron 4 compuestos diferentes, sin embargo, no pudieron ser identificados mediante la biblioteca del dispositivo utilizado.

Teniendo en cuenta los estudios de Delgado Núñez (2020), Nava (2017) y Moreno (2019) se puede percibir que implementando un solo tipo de cromatografía en algunos casos no es suficientemente, claramente es el ejemplo del primer autor que realizó tres tipos de cromatografías diferentes para poder obtener fracciones con pocos compuestos y de fácil identificación; por otro lado, Moreno (2019) y Nava (2017) no pudieron hacer la identificación específica de cada compuesto presentes en los extractos. Sin embargo, si se llevaran a cabo tantas cromatografías como Delgado Núñez se necesitaría de muchos recursos, tanto económicos como en tiempo, materiales, instrumentos y personal especializado para poder llevar a cabo una cantidad similar de cromatografías, además se producirían muchos desechos complicados de manejar; por lo que se recomienda realizar sólo las cromatografías propuestas en el apartado de materiales y métodos, ya que son las que brindan un panorama más cercano acerca de los componentes de un extracto sin requerir demasiado tiempo, recursos humanos y materiales.

### ***Actividad antimicrobiana***

Prabha et al. 2014, hicieron una recopilación de algunas investigaciones de *Prosopis*, hallaron que este género en sus partes aéreas posee apigenina y quercetina y en la corteza hay taninos que se vinculan con la actividad antibacterial,

entre otras investigaciones encontraron que las hojas de *P. juliflora* poseen alcaloides y julifloravizole a los cuales se les atribuye su actividad antifúngica, antibacteriana y compuestos como fenoles y flavonoides (juliflorine, julifloricine, 3'-oxo-juliprosopine) a los cuales también se les hace responsables de la actividad antimicrobiana; en la corteza se registró la presencia de quercetina, 4',7'-dimethylether, kaempferol, 4'-O-methylether, retusin, L-manopyranoside que también mostraron actividad antifúngica. Así mismo, en algunos reportes de *Prosopis* spp. se menciona que la planta contiene harmina, prosopina, tiramina y juliflorina que son alcaloides que se intercalan en el ADN y podrían explicar la actividad antimicrobiana, por otra parte, la inhibición de la formación de biopelículas puede explicarse por los flavonoides (quercetina, kaempferol, naringenina y apigenina) que son capaces de reducir la síntesis de biopelículas tras suprimir la actividad del autoinductor-2 responsable de la comunicación célula-célula (Sánchez et al., 2016). Como se puede apreciar el género *Prosopis* posee la característica de tener compuestos que muestran actividad antibacteriana, por lo que se espera que en un extracto de flores de *P. laevigata* se encuentren compuestos como apigenina, quercetina, kaempferon o 4'-O-methylether, los cuales se les atribuye la inhibición antimicrobiana. Gobinath et al. 2013, reportaron la inhibición de H, K y ATPasa de *Helicobacter pylori* por un extracto de semillas y hojas de *P. juliflora*.

El extracto alcohólico de las hojas de *Prosopis juliflora* reportan una alta actividad antimicrobiana sobre las cepas de *Escherichia coli* a concentraciones del 50% y 100% del extracto (Bezerra, 2014). En el 2015, Soares da Silva y colaboradores probaron la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de hojas y corteza de *Prosopis juliflora*, reportaron la inhibición de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Proteus mirabilis*. Ahmad et al. 1989, identificaron la forma estructural de dos alcaloides: juliprosinene y juliflorinine presentes en *P. juliflora* que mostraron actividad antibacteriana contra cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Shigella sonnei*.

Por su parte, Sirmah (2000) trabajó con la misma planta y encontró que la mezcla de hojas fue más eficaz que la bacitracina, gentamicina, cloromicetina y trimetoprim

contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus pyogenes* y *Corynebacterium diphtheria*. Sathiya y Muthuchelian 2008, colectaron hojas de *P. juliflora* e hicieron un extracto de etanol que probaron sobre cinco bacterias Gram positivas: *Staphylococcus epidermis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp. y *Bacillus subtilis* y cinco Gram negativos: *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp en un ensayo de difusión en agar con discos. Se reportó que todas las bacterias fueron inhibidas pero *S. aureus* fue la bacteria Gram positiva más susceptible al extracto con  $9.88 \pm 0.68$ ,  $12.20 \pm 0.76$ ,  $14.85 \pm 0.66$  y  $16.75 \pm 0.48$  mm en su zona de inhibición en concentraciones de 50, 100, 200 y 300 mg/mL respectivamente, a las mismas concentraciones la bacteria Gram negativa más susceptible al extracto fue *K. pneumoniae* con halos de inhibición de  $10.78 \pm 0.28$ ,  $12.10 \pm 0.66$ ,  $13.60 \pm 0.48$  y  $15.20 \pm 0.36$ . Como se puede observar el extracto *P. juliflora* es un buen antibacteriano ya que inhibe muchas bacterias comunes que causan patogenicidad en los humanos, por lo tanto, se esperaría que *P. laevigata*, al ser una especie hermana, comparta esta característica antibacteriana y pueda inhibir algunas de las bacterias puestas a prueba por Sathiya y Muthuchelian, 2008. Yadav y Rana (2020) realizaron una revisión de los aspectos farmacológicos y farmacognósticos de *P. juliflora* y hacen mención que el extracto de hojas en éter de petróleo, cloroformo, benceno, etanol, metanol y acuoso mostraron actividad antifúngica contra *Alternaria alternata*, sin embargo, el de metanol y etanol exhibieron la mayor actividad antifúngica entre todos los extractos, además encontraron que las fracciones de alcaloides de esta planta reportaron una CMI de 1000 ppm y fue tan efectivo en comparación con fungicidas sintéticos, pero cuando se combinaron los alcaloides con los fungicidas químicos su actividad fue altamente significativa a comparación con alcaloides o fungicidas solos. También hallaron que este extracto fue eficaz para inhibir *Neisseria gonorrhoeae*, *Lawsonia inermis*, *Oxalis corniculata* y *Xanthomonas* sp. Las hojas de *P. juliflora* tienen actividad antibacteriana comparable a la bacterimicina y la estreptociclina.

Singh et al. 2011, realizaron un estudio de los extractos etanólicos de hoja, vaina, flor, raíz y tallo de *P. juliflora* (100mg/mL) y de este se obtuvo una fracción rica en



alcaloides, la cual fue probada (10 $\mu$ ) en cepas bacterianas de MTCC (IMTECH, Chandigarh) Gram-negativas: *Pseudomonas putida* (MTCC672), *Klebsiella pneumonia* (MTCC3384), *Salmonella sp.* (MTCC3215), *Escherichia coli* (MTCC 40), *E. coli (amp R)* y *Alcaligen sp.* y Gram-positivas como: *Staphylococcus aureus* (MTCC3160), *Bacillus cereus* (MTCC430), y *Acinetobacter sp.* y por el método de difusión en agar y se registró la actividad antibacteriana midiendo el diámetro de la zona de inhibición, estos fueron comparados contra el cloranfenicol, ampicilina, tetraciclina, estreptomina, rifampicina, sulfamidas y oflaxacina (1mg/mL). Se encontró que *E. coli*, *P. putida*, *B. cereus.*, *Klebsiella sp.*, *S. aureus*, *E. coli (ampR)* son susceptibles a todos los extractos, sin embargo los extractos de raíz y tallo no inhibieron todas las bacterias y el mejor extracto inhibidor fue el de hoja, los extractos de hojas, vainas y flores mostraron una gran inhibición y en particular *Salmonella sp.*, *Acinetobacter sp.* y *Alcaligen sp.* son inhibidos por los extractos de hojas y vainas, pero resistentes al de las flores, estos tres últimos extractos tuvieron un efecto mayor que las sulfamidas y se comportaron como la ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, rifampicina, ya que inhibieron las mismas cepas (*E. coli*, *P. putida*, *B. cereus*, *Klebsiella sp*, *S. aureus*, *Salmonella sp.* *E. coli (ampR)*) en su mayoría Gram-negativas; por otro lado, los extractos de hojas y vainas además de tener similitud con los fármacos anteriores también mostraron similitud con la estreptomina y ofloxacina que fueron los medicamentos que exhibieron un espectro de inhibición más amplio. También se midió la CMI para cada extracto y se encontró que para el de hoja (EH) contra *Klebsiella sp* la CMI fue a 25  $\mu$ g/mL, para la vaina (EV) y la flor (EF) con esta misma cepa la CMI fue de 50  $\mu$ g/mL, para *E. coli* y *P. putida* se registró una CMI de 50  $\mu$ g/mL para EH, 75  $\mu$ g/mL para EV y EF, para la CMI de *E. coli (ampR)* en EH se registró una concentración 50  $\mu$ g/mL, en EV fue de 75  $\mu$ g/mL y para EF fue 100  $\mu$ g/mL. en *B. cereus* y *S. aureus* la CMI se registró en EH 50  $\mu$ g/mL y EV 100  $\mu$ g/mL; para *Alcaligenes sp.* en EH la CMI fue a 75  $\mu$ g/mL y en EV a 100  $\mu$ g/mL; para *Acinetobacter sp.* y *Salmonella sp.* su CMI en EH y EV fue 100  $\mu$ g/mL, para el extracto de flor la CMI no se registró en ninguna de las concentraciones probadas, pero en general variaba de 25-100  $\mu$ g/mL, *Klebsiella* fue la bacteria más susceptible mientras que *Acinetobacter* y *Alcaligenes*

fueron las menos susceptibles, los extractos mostraron un gran potencial para inhibir cepas bacterianas resistentes a antibióticos. Este estudio puede ser un buen referente de comparación contra *P. laevigata*, además abre la puerta para hacer pruebas de actividad antimicrobiana con los alcaloides obtenidos de un extracto. En otras investigaciones, como la que realizaron Sánchez et al. (2016), de algunos extractos metanólicos de plantas colectadas en Santa Catarina, Nuevo León, México, revelan que el extracto de *P. laevigata* fue el más activo reportando una inhibición de  $2.8 \pm 0.5$  cm contra bacterias nosocomiales, su mayor diámetro reportado fue contra la cepa *Staphylococcus aureus* (Grampositivo), cabe resaltar que *Klebsiella pneumoniae* (Gramnegativos) y *Enterococcus faecalis* (Grampositivo) sólo fueron inhibidas por este extracto, sin embargo, *Escherichia coli* (Gramnegativos) fue menos susceptible a *P. laevigata* y *Stenotrophomonas maltophilia* (Gramnegativos) fue el único microorganismo que no fue inhibido por el extracto. El extracto de *P. laevigata* tuvo un valor bajo para la concentración mínima bactericida CMB: 2 mg/mL para *E. coli*, 2.8 mg/mL para *E. faecalis*, 3.8 mg/mL para *K. pneumoniae* y 0.7 mg/ml para *S. aureus*. También reportan la presencia de cumarinas, alcaloides, taninos y flavonoides en este extracto, mostrando similitud con *P. juliflora*, donde se ha reportado la presencia de taninos, fenólicos, flavonoides, esteroides, terpenos y alcaloides. Castro (2016) obtuvo halos de inhibición de 21 mm en cepas bacterianas gracias al extracto metanólico de la flor de *Prosopis laevigata*; en la caracterización química se encontraron alcaloides, xantofilas, ácido linolénico, ácido linoleico y ácido palmítico en altas concentraciones.

Nava (2017) estudio la actividad antibacteriana de dos extractos (uno de marzo y otro de febrero) de flores de *Prosopis laevigata*, los puso a prueba contra el cloranfenicol y observó que tuvo halos de inhibición mayores a los extractos. Entre los dos extractos, el de marzo fue el que mostró una actividad inhibitoria superior al de febrero en casi todas las cepas bacterianas, se observan dos fenómenos: 1) ambos extractos presentan claras diferencias en su actividad antibacteriana, pero coinciden en que las bacterias Gram-positivas son las que tuvieron mayor actividad; 2) el extracto de marzo presentó una mayor actividad, que puede deberse a que

contiene más metabolitos secundarios que el de febrero, los cuales pueden ser responsables de la actividad antibacteriana. Las cepas puestas a prueba y que registraron inhibición fueron: *Streptococcus mutans* ATCC35668, *Streptococcus mutans* CDBB-B-1455, *Staphylococcus aureus* ATCC 1 2398, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33592, *Staphylococcus aureus* 85S, *Staphylococcus epidermidis* caso clínico, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, *Enterococcus faecalis* CDBB-B-1533, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Actinomyces viscosus* WFCC 449, *Pseudomonas aeruginosa* CDBB-B-999, *Pantoea agglomerans* CDBB-B-959, *Enterobacter aerogenes* CDBB-B-958, *Enterobacter coloaecae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, caso clínico 1, *Escherichia coli*, caso clínico 2, *Escherichia coli* 28-MR, *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis*, caso clínico, *Vibrio cholera*, caso clínico, *Salmonella typhimurum*, *Vibrio cholera* CDBB-1159, *Enterobacter aerogenes* CDBB-B-968 y *Salmonella typhi* CDBB-B-1111. En este estudio también se midieron las CMI y CMB, se observó una diferencia evidente entre cada extracto, el de febrero se necesitó una menor concentración para la inhibición bacteriana. Sólo las bacterias Gram-negativas como *Vibrio cholerae* CDBB-1159, *Enterobacter aerogenes* CDBB-B-968 y *Salmonella typhi* CDBB-B-1111 fueron las que tuvieron valores más bajos de inhibición para el extracto de marzo.

De acuerdo con las investigaciones anteriores acerca de la actividad antibacteriana, se puede observar que la mayoría de los estudios reportan inhibición de las siguientes bacterias: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter sp.* y *Salmonella typhi* por parte de los extractos de diferentes partes de plantas del género *Prosopis*; además en varios trabajos se menciona que la acción antibacteriana en algunos casos fue más eficaz que algunos antibióticos como la bacitracina, gentamicina, cloromicetina, trimetoprim y sulfamidas, otros extractos mostraron en su comportamiento una similitud con bacterimicina, estreptociclina, ampicilina, tetraciclina, rifampicina, estreptomina y ofloxacina, sin embargo cuando se comparó contra el cloranfenicol, la inhibición del extracto fue menor al

antibiótico; por lo que se esperaría que un extracto de flores de *P. laevigata* tenga la capacidad para inhibir la mayoría de las bacterias previamente mencionadas y pueda actuar igual o similar a alguno de los antibióticos, o incluso posea una mejor inhibición, ya que se sabe que la alta variabilidad genética de las bacterias les permite evadir la acción de los antibióticos, los cuales son las bases para enfrentar las infecciones bacterianas, sin embargo, al haber resistencia antibiótica, se hace necesario buscar e investigar sobre las propiedades antibacterianas de las plantas, como *P. laevigata*, para utilizar sus componentes bioactivos y sean una alternativa para la prevención y mitigación de infecciones en heridas de piel, o bien servir como guías para el desarrollo de productos farmacéuticos que aborden las necesidades terapéuticas.

Sirmah et al. (2009), registraron la inhibición de hongos resistentes a fármacos que se le asocio al mezquitol presente en la madera de *P. juliflora*. De la Fuente-Salcido et al. 2016, realizó un trabajo acerca de la actividad antifúngica in vitro del extracto de hoja, flor y rama de *P. glandulosa* (EM), proveniente de Irapuato, Guanajuato y reportó que para los hongos *Colletotrichum gloeosporoides* y *Fusarium oxysporum* se redujo su crecimiento radial del 50% en un medio con 5% de extracto a las 48 horas. Para *Rhizopus oryzae* y *Rhizopus stolonifer* se observó la inhibición del crecimiento hasta las 72 horas en un medio con 5% EM. También realizó inoculaciones de los hongos previamente mencionados sobre fresa, tomate y zanahoria a las cuales se les agregó el EM al 5%, observó que las muestras tratadas no desarrollaron crecimiento micelial en la superficie del vegetal, lo que indica que el extracto de mezquite tiene un gran potencial fugitóxico.

Nava (2017) también trabajó la actividad antifúngica en hongos levaduriformes y filamentosos por dos extractos de flores de *Prosopis laevigata*, obtuvo que ambos extractos se registraron halos de inhibición en hongos levaduriformes a una concentración de 4 mg/mL, pero su actividad fue ligeramente menor a la Nistatina (control positivo) y, al igual que en la actividad antibacteriana, hay una diferencia significativa entre los extractos, el de marzo registra una mayor capacidad inhibitoria que el de febrero, excepto en las cepas de *Candida albicans* CDBB-L-1003 y de *Cryptococcus neoformans*, ambos extractos inhibieron todas las cepas de hongos

probadas, las cuales fueron: *Candida albicans*, caso clínico, *Candida albicans* ATCC 14065, *Candida albicans* CDBB-L-1003, *Candida tropicalis* donada por el Hospital los Ángeles, *Candida tropicalis* CDBB-L-1098, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* donada por el Hospital los Ángeles, *Criptococcus neoformans* Donada por el Laboratorio de Micología y Parasitología de la Facultad de Medicina UNAM, *Candida albicans* ATCC1023, *Candida albicans* caso clínico, *Candida glabrata* CBS 138 y *Candida glabrata*, caso clínico; la cepa que reportó la zona de inhibición de mayor extensión fue la de *Criptococcus neoformans*. Después de realizar la prueba cualitativa se procedió a hacer una evaluación cuantitativa, sobre las cepas de *Candida albicans* ATCC 32354, *Candida glabrata* CDBB-L-1536 y *Candida tropicalis* CDBB-L-1098, la cepa que registró la concentración fungicida mínima (CMF) y la concentración fungicida media (CF<sub>50</sub>) mayores fue *Candida glabrata* en la colecta de marzo con concentraciones de 10 mg/mL y 2.5 mg/mL respectivamente, *Candida tropicalis* fue la que reportó la menor actividad en la colecta de febrero con 0.3125 mg/mL de CF<sub>50</sub> y 0.625 mg/mL en CFM, siguiendo la tendencia en las pruebas cualitativas.

En las pruebas de evaluación cualitativa del efecto de los extractos en hongos filamentosos se observó que ambas colectas presentan actividades similares sobre el crecimiento de las cepas utilizadas, *Fusarium sp.* raíz de gerbera fue la única cepa que no registro actividad, *Fusarium moniliforme* CDBB-H-265, *Trichophyton mentagrophytes* CDBB-H1112 y *Fusarium subglutinas* fueron las cepas que reportaron una actividad alta, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus sp.* donada por el Laboratorio de Microbiología de la UBIPRO y *Aspergillus niger* CDBB-H-179 mostraron una actividad media; *Rhizoctonia lilacina* CDBB-H-306, *Fusarium sporotrichioides* ATCC NRLL3299 tuvieron entre mediana y alta actividad inhibitoria. Cuando se obtuvo los resultados de la prueba cualitativa se procedió a hacer una evaluación cuantitativa sobre cinco cepas de hongos filamentosos, en este experimento también se vio una actividad similar entre ambos extractos, sin embargo, el extracto de marzo presentó una actividad un poco mayor sobre *Fusarium sporotrichioides* y *Fusarium moniliforme* y el extracto de febrero tuvo mayor efectividad sobre *Trichophyton metagrophytes* CDBB-H1112, *Aspergillus*

*niger* CDBB-H-179 y *Rhizoctonia lilacina* CDBB-H-306. La CF<sub>50</sub> más baja reportada fue de 0.28 mg/mL del extracto de marzo sobre la cepa de *Trichophyton metagrophytes*, la más alta fue de 8.41 mg/mL del extracto de febrero sobre *Rhizoctonia lilacina*.

Moreno (2019) realizó una evaluación cualitativa de la actividad anti-*Candida* (hongo levaduriforme) de un extracto de hojas de *P. laevigata* y registró el tamaño de los halos de inhibición que se obtuvieron cuando el extracto (4 mg) entró en contacto con las siguientes cepas: *Candida albicans*, caso clínico, *Candida albicans* ATCC 14065, *Candida albicans* ATCC 32354, *Candida albicans* CDBB-L-1003, *Candida glabrata* CDBB-L1536, *Candida tropicalis* donada por el Hospital Ángeles, *Candida tropicalis* CDBB-L-1098, *Candida tropicalis*, caso clínico, *Candida tropicalis* donada por el Hospital Ángeles, *Candida albicans* ATCC-10231 Sensible, *Candida albicans* resistente, *Candida glabrata* CBS 138, *Candida glabrata*, caso clínico resistente, *Candida albicans*, caso clínico, *Candida glabrata*, caso clínico y *Candida tropicalis*, caso clínico. El control positivo fue Nistatina a 25 µg y se comparó mediante una prueba de t si había diferencias significativas entre este y el extracto; en la mayoría de las cepas se observó que el extracto tuvo una menor actividad que la Nistatina, pero con la cepa *Candida tropicalis* (donada por el Hospital Ángeles) fue la que mostró mayor capacidad inhibitoria que las demás cepas. También se realizó en este estudio la determinación de la CFM y CF<sub>50</sub>, se utilizaron 21 concentraciones, donde la máxima era de 20 mg/mL y la mínima de 0.019 mg/mL, en la concentración más alta no hubo crecimiento de las cepas, por lo que se disminuyó la concentración a 1.25mg/mL, la CF<sub>50</sub> menor fue a 0.156 mg/mL con las cepas *Candida albicans* ATCC-10231 Sensible, *Candida glabrata*, caso clínico y *Candida tropicalis*, caso clínico, la CF<sub>50</sub> mayor fue 0.039 mg/mL con las cepas *Candida albicans* ATCC 14065 y *Candida albicans* ATCC 32354. La CFM menor fue a 0.312 mg/mL en las cepas *Candida albicans* ATCC-10231 Sensible y *Candida glabrata*, caso clínico, la mayor se registró a 0.078 mg/mL con las cepas *Candida albicans* ATCC 14065 y *Candida albicans* ATCC 32354. Posteriormente se realizó un análisis de la actividad del extracto en la curva de crecimiento de *C. albicans* cc, *C. albicans* ATCC 10231 sensible, *C. glabrata* cc y *C. tropicalis* cc, a las cuales se

les administró 4 dosis del extracto cada 12 horas, en tres concentraciones CFM, CF<sub>50</sub> y CF<sub>25</sub>), las concentraciones mínimas mostraron un efecto fungistático desde los primeros tiempos sobre las cuatro cepas, al aumentar las dosis sobre todas las cepas proporciona un efecto fungicida, en especial en cuando se le agregó a *C. tropicalis* cc la segunda dosis. Salinas-Sánchez y colaboradores (2009), reportan actividad antimicrobiana de los extractos hexánicos, cetónicos y metanólicos de hojas y tallo de *Prosopis laevigata* en una cepa de *Candida albicans* y de bacterias. Como se observa las especies más utilizadas para las pruebas de actividad antifúngica, de acuerdo con los resultados presentados, son las cepas del género *Candida* para los hongos levaduriformes y para los filamentosos son las del género *Fusarium*, por lo que se recomienda trabajar con estos organismos, pero si existe la posibilidad de poner a prueba otras especies se deberían tener en cuenta para poder conocer si son susceptibles o muy poco al entrar en contacto con el extracto; también se debe de tener presente que el poder antifúngico de los extractos mencionados fue menor a la nistatina, por lo que un estudio del extracto de flores *P. laevigata*, como el que se propone en un inicio, debería de mostrar cierta similitud con estos datos, lo que significa en un proceso de cicatrización sí podría impedir el crecimiento de hongos filamentosos y levaduriformes, a pesar de tener menor actividad que la nistatina, puesto que se ha reportado la inhibición de una amplia gama de especies de hongos patógenos por parte de los extractos de diferentes partes de la planta del género *Prosopis*.

Por otro lado, Delgado Núñez (2020) trabajó con diferentes extractos de las hojas de *P. laevigata*: hidroalcohólico (E-HA), acuoso (F-Aq) y de acetato de etilo (F-AcEt) y encontró que las subfracciones (C<sub>1</sub>F<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>F<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>F<sub>3</sub> y C<sub>1</sub>F<sub>4</sub>) del F-AcEt mostraron mortalidad del 79,4%, 24,4%, 6,8% y 5,7%, respectivamente para *Haemonchus contortus*, que es un parásito que provoca una anemia mortal en animales jóvenes, debido a sus hábitos hematófagos. Además, para subfracciones (C<sub>2</sub>F<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>F<sub>2</sub>) del C<sub>1</sub>F<sub>1</sub> se demostró la mortalidad larvicida del 100% del *H. contortus* larvicida a 7.5 mg/mL y la C<sub>2</sub>F<sub>3</sub> a esa concentración registró 95% de mortalidad, sin embargo las concentraciones más bajas del C<sub>1</sub> dieron lugar a una alta mortalidad de larvas a 3.7 mg/mL = 88.2% y 2.5 mg/mL = 68.15%. Por otra parte, la luteolina y la 4'-O-

metilcatequina no mostraron ninguna actividad ovicida, pero la mezcla de isoramnetina/luteolina presentó el 100% de actividad ovicida requiriendo sólo 0.07 mg/mL, esto indica que que la isoramnetina pura era 5.2 veces más potente que la F-AcEt. En otro estudio similar, hecho por De Jesús Gabino et al. 2010, también registraron actividad antiparasitaria in vivo contra las larvas del mismo parásito en gerbos por parte de *P. laevigata* a una concentración de 40 mg/mL. Por su parte, Delgado-Altamirano et al. 2017, probaron varios extractos orgánicos y acuosos de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana para comprobar su actividad como antiparasitario y citotóxica, obtuvieron que para el extracto acuoso de hojas y ramas de *P. laevigata* fue el segundo más potente registrando  $22.8 \pm 2.9$  de inhibición en pruebas contra la leishmaniasis, que es una enfermedad parasitaria causada por *Leishmania* que afecta a la piel y sus membranas mucosas, además presentó una citotoxicidad de  $35.2 \pm 4.7$ , ellos infieren que la presencia de terpenos es responsable de la actividad leishmanicida. Rahman (2011) reportó que  $\Delta 1,6$ -juliprosopina es la responsable de la actividad antiparasitaria en las hojas de *P. glandulosa* var. *glandulosa*, que podría estar presente también en *P. laevigata*. Estos trabajos nos indican que *P. laevigata* no sólo puede ser un buen antimicrobiano, sino que también un gran antiparasitario, por lo que en futuras investigaciones se podría contemplar esta característica para desarrollar estudios dirigidos para prevenir un parasito en un proceso de cicatrización, además se remarca que gracias a la gran gama de compuestos presentes en la planta se le puede adjudicar un amplio abanico de propiedades terapéuticas contra patógenos.

### **TOXICIDAD**

Retomando el estudio de Sánchez et al. (2016), se menciona que se realizó un bioensayo de letalidad con *Artemia salina* para determinar la toxicidad del extracto metanólico de *P. laevigata*, la letalidad media  $LC_{50}$  se registró a una concentración de 141.6  $\mu\text{g/mL}$ , indicando que el extracto es moderadamente tóxico (por encima de 1000  $\mu\text{g/ml}$  se considera no tóxico), esto coincide en un trabajo anterior hecho por Ahmed et al. (2014), cuando determinaron la toxicidad del extracto metanólico de *Prosopis spicigera* reportando que el 60% sobrevivió a los nauplios a 100  $\mu\text{g/mL}$ . Nava (2017), también realizó una prueba para identificar el grado de toxicidad de



dos extractos de febrero y marzo de flores de *P. laevigata*, por el método de toxicidad general con larvas nauplio de *Artemia salina*, la concentración de 1000 ppm mostró el 100% y el 90% de letalidad en las colectas de febrero y marzo respectivamente, todas las concentraciones (100 y 10 ppm) en ambos extractos reportaron del 70-96% de letalidad, excepto el extracto de marzo a 10 ppm que fue el único que registro un 50%.

Ayanwuyi et al. 2010, informó una dosis letal media oral del extracto metanólico de *P. africana* a 3.808 g/kg en ratones y de 5 g/kg en ratas y los resultados del estudio apoyan la afirmación tradicional de esta planta para el analgésico y actividades antiinflamatorias. Yadav y Rana (2020) encontraron que la dosis letal media oral de un extracto etanólico de *P. juliflora* fue de 3807.9 mg/kg en ratones y 5000 mg/kg en ratas; sin embargo, no se observaron síntomas tóxicos por debajo de 200 mg/kg en un lapso de 30 días, donde no hay cambios en parámetros hematológicos, parámetros bioquímicos, función renal y hepática.

Osano et al (2016), realizó una evaluación de toxicidad oral aguda de un extracto de hoja de *P. juliflora* en ratas Wistar hembra, se usó una dosis diaria de 100 mg/kg y se reportó que todos los animales sobrevivieron las primeras 48 horas, pero el 2° y 4° animal murieron a las 58 y 72 horas respectivamente. También hallaron que el extracto provocó cambios en los eritrocitos después de 28 días de administración: hubo un aumento de hemoglobina y volumen corpuscular insignificante. Se estableció que el extracto posee una DL<sub>50</sub> superior a 2000 mg/kg peso corporal, ya que la administración no dio lugar a algún efecto de toxicidad grave en órganos principales, ni el peso corporal de las ratas durante el estudio.

Se puede observar que en los estudios de toxicidad con larvas nauplio de *Artemia salina* los valores más altos registrados fueron para los extractos de *P. laevigata*, mientras que el extracto de *P. spicigera* a una concentración similar reporto el 40% de letalidad, lo que indica que el extracto de *P. laevigata*, sobre todo el de flores, es más tóxico. Por otro lado, en los ensayos de toxicidad oral se aprecia una gran similitud en la dosis letal media entre los tres autores mencionados, ya que Ayanwuyi et al. 2010, coinciden con Yadav y Rana (2020) en la LD<sub>50</sub> en rata a 5g/kg y una muy parecida en ratones con LD<sub>50</sub> a 3.808 y 3.807 g/kg respectivamente, es

relevante este dato ya que los primeros autores utilizaron un extracto de *P. africana* y en el segundo usaron a *P. juliflora*, lo que sugiere que las especies del género *Prosopis* podrían tener grados de letalidad similares en concentraciones iguales; Yadav y Rana (2020), reportaron que a los 200 mg/kg no se observaron síntomas tóxicos y Osano et al. 2016, observaron un comportamiento idéntico a una concentración de 100 mg/kg, ambos resultados reportados para ratas con un extracto de *P. juliflora*. A través de estas investigaciones se puede percatar que los estudios de toxicidad van más dirigidos hacia la letalidad de la ingestión de los extractos, por eso es necesario realizar una prueba de toxicidad cutánea aguda, si se va a hacer un estudio de la influencia de un extracto en el proceso de cicatrización, además se deben tomar en cuenta los datos de toxicidad oral como referencia para decidir a qué concentración sería conveniente aplicar un tratamiento de toxicidad dérmica, ya que se sabe que incluso ingerido el extracto a 100-200 mg/kg no se presentan síntomas tóxicos en ratas, por lo que se podrían elegir valores superiores a estas cifras para comenzar el abanico de concentraciones a probar sobre la piel del animal.

### **CICATRIZACIÓN**

Galera (2000) menciona que en México se extraen de las hojas de *P. juliflora* sustancias medicinales, como principios de vinalina, que son usados como antimicrobianos; en Perú, el jugo se usa como purgante, para dolores de estómago, escalofríos, diarrea, disentería, excrecencias, ojos, gripe, dolor de cabeza, ronquera, inflamación, comezón, sarampión, garganta, y la curación de heridas. Por su parte, Vargas (2016) estudia al algarrobo (*Prosopis sp.*) y reporta que la infusión de flor es usada como diurética y que el fruto molido ayuda a la cicatrización de heridas y detención de hemorragias. Alethia Muñiz Ramírez, en 2019, llevaba a cabo una investigación para aislar e identificar compuestos de plantas que están en ecosistemas de zonas áridas con un valor farmacológico, incluye a *Prosopis laevigata* (mezquite) como una planta que puede ayudar a disminuir algunas de las complicaciones de la diabetes como hipoglucemia, inflamación, glicación avanzada y cicatrización (El Sol de San Luis, 2019).

Mudgil y Barak 2020, realizaron una investigación acerca de la goma del mezquite, sus propiedades y aplicaciones, lograron identificar que los componentes principales de la goma son D-galactosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glucuronato y D-xilosa. De este estudio se rescata la presencia de D-manosa, ya que, si se encontrara en un extracto de flores de *Prosopis laevigata*, se podría relacionar con la estimulación de los fibroblastos por parte de sus dos polisacáridos derivados: glucomanano y acemanano (Radha y Laxmipriya, 2015). Éstos interactúan con los receptores de los factores de crecimiento de los fibroblastos. Secundariamente, se incrementa la síntesis de colágeno y proteoglicanos, además, las fibras de colágeno realizan un entrecruzamiento más estable gracias a los proteoglicanos, sustancias que permiten la inserción de las fibras (Sahu et al., 2013).

Por su parte, en el 2020, Reséndiz-Trejo et al., publicaron una investigación enfocada al mezquite como ayuda ergogénica para atletas de alto rendimiento en deportes intermitentes, para poder llegar a una conclusión realizaron una revisión sistemática de algunos artículos publicados e incluyeron los que previamente se describieron en este apartado. Ellos sostienen que los polifenoles tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antibacterianas, citotóxicas, antiparasitarias, mejoran la tasa de recuperación en un atleta, disminuyen la inflamación y pueden atenuar el dolor muscular. Teniendo en cuenta lo anterior y los resultados obtenidos en los estudios previos, estos autores sugieren que *Prosopis* podría representar una buena fuente de fenoles como complemento en una dieta para un deportista, ya que fenoles como la luteolina mejora el rendimiento en ejercicios de velocidad, la apigenina puede modular el estrés oxidativo, expresión génica y proceso epigenético, la catequina puede reducir el daño muscular, estrés oxidativo y el tiempo de recuperación, por otro lado, aumenta la oxigenación al músculo ejercitado y modula el proceso inflamatorio, por su parte la quercetina puede inhibir la NADPH oxidasa que es productora de especies reactivas de oxígeno (ROS) y atenuar el daño muscular por ejercicio interfiriendo con los mecanismos inflamatorios al reducir la producción de las interleucinas y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); es importante rescatar los tres últimos compuestos, ya que se los liga con una elevada actividad antiradical, ayudando a disminuir los daños

por parte de ROS a células sanas que se encargarían de reparar una herida, además la catequina y quercetina pueden influir en la etapa inflamatoria, reflejándose en un menor tiempo de duración, debido a la disminución de las moléculas que producen la inflamación, lo que significaría una mayor velocidad de cicatrización de la lesión. Siva et al (2009) hallaron que el extracto metanólico de corteza de *P. juliflora* a 100, 200 y 400 mg/kg exhibieron una actividad antiinflamatoria significativa en modelos inflamatorios agudos y crónicos en comparación contra la histamina y serotonina en un modelo con ratas. Yadav y Rana (2020), reportan que en dosis de 400 mg/kg muestra actividad antiinflamatoria en un edema de pata, este estudio apoya la creencia tradicional de que el extracto de *P. juliflora* puede ser utilizado en el tratamiento de inflamaciones. Pérez et al (2018), demostraron que el extracto de harina de *P. nigra* tiene fenoles libres y unidos, como la apigenina y ácidos fenilpropanoides, a los que se les adjudica la inhibición de enzimas proinflamatorias además de exhibir actividad antioxidante. Ambos estudios llegaron a una conclusión similar que Reséndiz-Trejo et al. 2020, ellos observaron que los extractos mostraron actividad contra una enzima proinflamatoria, lo que indica que contenían polifenoles biológicamente activos, que producen un impacto positivo en la salud humana al reducir la inflamación.

Por su parte, Ukande et al. 2019, muestran la actividad farmacológica de diferentes especies de *Prosopis* y reportan que varias de ellas contienen ciertos compuestos que muestran una gran actividad antioxidante, como *P. juliflora* que contiene mezquitol en la madera, *P. cineraria* que en sus vainas tienen triterpenoides y prosofilina, *P. flexuosa* y *P. tamarugo* contienen catequina en sus partes aéreas y hojas respectivamente. Díaz-Batalla et al., 2018b, García-Andrade et al., 2013, describen a *Prosopis laevigata* como buena fuente de antioxidantes, lo que nos indica que este género es rico en compuestos con capacidad antiradical, la cual contribuye a la disminución del estrés oxidativo en un proceso de cicatrización, ya que cuando se genera una herida en la piel hay una alteración en el estado redox y a su vez se incrementa el estrés oxidativo por las especies reactivas de oxígeno (ROS), que se generan para la activación del sistema inmune y las citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e interleucina 1), sin embargo, si no se atenúan las ROS

provocarán la alteración de las células adyacentes a nivel funcional produciendo un deterioro fisiológico y habrá una sobreproducción de las citocinas que conducirían a un estado inflamatorio prolongado por la ausencia de la defensa de los antioxidantes, por ello es relevante la capacidad antioxidante que ofrecería un extracto de flores de *P. laevigata*, porque cumpliría un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis y el balance redox en el área afectada por una herida, que conduciría a la modulación de la fase inflamatoria en la cicatrización.

## CONCLUSIONES

En este estudio se concluye que efectivamente las flores de *P. laevigata* son ricas en fenoles, flavonoides y alcaloides, de acuerdo con la literatura consultada, se recomienda obtener el extracto de flores colectadas en marzo, ya que es cuando se observó una mayor concentración de metabolitos; además los compuestos identificados dentro de estas familias coinciden con la apigenina, naringenina, kaempferol y quercetina, que son moléculas antioxidantes que neutralizarían a los radicales libres presentes en una herida que entorpecen el proceso de cicatrización. También se asegura que un extracto de flores de *P. laevigata* tiene actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos levaduriformes y filamentosos, por lo que funcionaría como buen inhibidor de microorganismos patógenos que pudieran infectar una herida y evitar o retrasar la cicatrización. Dicho lo anterior se demuestra que el extracto de flores de *P. laevigata* es una importante fuente de compuestos fenólicos y antimicrobianos, lo que le confiere un gran potencial para ser usados en tratamientos cicatrizantes de heridas cutáneas.

## APORTACIONES Y TRASCENDENCIA

Este escrito es una contribución y retribución al conocimiento sobre la medicina tradicional y sus nuevas aplicaciones encaminadas a las necesidades del presente; en específico se busca conocer más sobre las bondades y utilidades del árbol del mezquite (*P. laevigata*) en tratamientos cicatrizantes, el cual, aún es un campo muy amplio y desconocido al que se le debe prestar más atención. Así mismo, se muestra la importancia de esta especie, pues se conocía su valor biológico (al ser endémico), valor forrajero y maderero; ahora en este trabajo se ahonda

profundamente en su valor medicinal, recalcando de esta forma el impacto, repercusión y significado de la presencia de esta especie en la sociedad humana. También se busca que este manuscrito sirva de referencia para futuros trabajos sobre *P. laevigata*, así como, comprender algunos de los métodos que se pueden aplicar para identificar o cuantificar ciertos compuestos y conocer de forma teórica las técnicas y métodos para realizar la experimentación al poner a prueba un extracto como cicatrizante.

## REFERENCIAS

1. Ahmad V.U., Sultana A., Qazi S., 1989. Alkaloids from the leaves of *Prosopis juliflora*. *Journal Natural Products*. 52, 497-501.
2. Ahmed, W., Ahmed, M., Rauf, A., Feroz, S., Khan, Z. and Haq, Z. U., 2014. Phytochemistry and cytotoxicity of *Prosopis spicigera* using brine shrimp lethality assay. *Topclass Journal of Herbal Medicine*. 3(3), 14–16.
3. Al-Fatimi M., Wurster M., Schröder G. and Lindequist U., 2007. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *Journal of Ethnopharmacology*. 111 (3), 657-66.
4. Amaguaña, R. F. y Churuchumbi, R. E., 2018. Estandarización fitoquímica del extracto de caléndula (*Calendula officinalis*). Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: Ingenieras en Biotecnología de los Recursos Naturales. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito.
5. Anmat. 2003. FARMACOPEA ARGENTINA. Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina, México.
6. Ardoino, S.M., Boeris, M.A. y Toso, R.E., 2013. Caracterización fitoquímica de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* (algarrobo) y *Prosopis flexuosa* var. *depressa* (alpataco), plantas con acción farmacológica. *Revista Científica Veterinaria*. 15(1), 115-125.
7. Arenas, J., 2003. Las heridas y su cicatrización. *Offarm* (Barcelona. Internet). 22 (5), 126-132.
8. Arias A. T., Valverde M. V. y Reyes, J. S., 2000. Plantas de la región de Zapotitlán Salinas, Puebla. Instituto Nacional de Ecología, UNAM, México.

9. Astudillo, L., Schmeda-Hirschmann, G., Herrera, J.P. and Cortés, M., 2000. Proximate composition and biological activity of Chilean *Prosopis* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80, 567-573.
10. Arias-Toledo, A., 2000. Las plantas de Zapotitlán Salinas, Puebla: un folleto de divulgación y conservación. Tesis de licenciatura en biología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
11. Ayanwuyi, L.O., Yaro, A.H. y Abodunde O. M., 2010. Analgesic and antiinflammatory effects of the methanol stem bark extract of *Prosopis africana*. *Pharmaceutical Biology*. 48, 296-299.
12. Balderas, C. D., 2020. Evaluación de la actividad cicatrizante del propóleo de Chihuahua. Tesis que para optar por el grado de Maestra en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
13. Balderas, C. D., Nava, T.A. Sánchez, S. R., Cabrera, A. W., Canales, M. M. y Rodríguez M. M., 2019. Actividad cicatrizante de un propóleo mexicano. *Revista Latinoamericana de Química*. 47, 67.
14. Becker, R. y Grosjean, O.K.K., 1980. A compositional study of pods of two varieties of mesquite (*Prosopis glandulosa*, *P. velutina*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 28:,22-25.
15. Bezerra, F., 2014. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de *Myracrodruon urundeuva* e *Prosopis juliflora* frente a *Escherichia coli* produtora de betalactamase de espectro estendido. Tesis de Licenciatura, Universidad de Estadual de Paraíba.
16. Canales Alvarez O., 2017. Estudio preliminar de la actividad cicatrizante del aceite esencial de *Bursera schlechtendalii* Engler. Tesis para obtener el título de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México.
17. Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Duran, A. and Lira, R., 2005. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlan, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology*. 97, 429-439.
18. Cantón Lacasa E., Martín Mazuelos E. y Espinel-Ingroff A., 2007. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los

- antifúngicos. Revista Iberoamericana de Micología. ISBN: 978-84-611-8776-8.
19. Cárdenas-Camacho, C., Ruiz-Quiroz, J., Castro-Luna, A., Ramos-Cevallos, N., Rojas-Armas, J. and Ramos-Perfecto, D., 2017. Antibacterial and antioxidant activity of ethanolic extract from 87 leaves of *Prosopis pallida* leaves (American carob). *Revista Cuba de Plantas Medicinales*. 22(4).
  20. Carranza y Huayana., 2009. Determinación de metabolitos secundarios del tallo de *Croton alnifolius* L. (Tunga). Informe de trabajo de investigación I. Universidad Nacional de Trujillo.
  21. Castañeda, R., Gutiérrez, H., Carrillo, É. y Sotelo, A., 2017. Leguminosas (Fabaceae) silvestres de uso medicinal del distrito de Lircay, provincia de Angaraes (Huancavelica, Perú). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 16 (2), 136-149
  22. Castro, A., 2016. Estudio preliminar de la actividad antibacteriana de la flor de *Prosopis laevigata* (Humb.et Bonpl. Ex Wild) M.C. Johnst. Tesis de Licenciatura, Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.
  23. Cattaneo, F. Costamagna, M. S., Zampini, I. C., Sayago, J., Alberto, M. R., Chamorro, V., Pazos, A., Thomas-Valdés, S., Schmeda-Hirschmann, G. and Isla, M. I., 2016. Flour from *Prosopis alba* cotyledons: A natural source of nutrient and bioactive phytochemicals. *Food Chemistry*. 208, 89-96.
  24. Cavalieri S. J., Harbeck, R. J., McCarter, Y. S., Ortez, J.H., Rankin, I. D., Sautter, R.I., Sharp, S.E. y Spiegel, C.A., 2005 Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.
  25. CellPharma., 2010. KitosCell. Preguntas frecuentes. Obtenido el 8 de septiembre de 2020 de <https://www.kitoscell.com/faqs.html>
  26. Centro Nacional de Información Biotecnológica., 2020. Resumen de compuestos de PubChem para CID 2005, ácido 6-acetamidohexanoico. Obtenido el 8 de septiembre de 2020 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6-Acetamidohexanoic-acid> .



27. Centro Nacional de Información Biotecnológica., 2020. Resumen de compuestos de PubChem para CID 8378, neomicina. Obtenido el 8 de septiembre de 2020 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Neomycin> .
28. Centro Nacional de Información Biotecnológica., 2020. Resumen de compuestos de PubChem para CID 40632, pirfenidona. Obtenido el 7 de septiembre de 2020 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pirfenidone> .
29. Chang, C. C., M. H. Yang, H. M. Wen, and J. C. Chern. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 10, 178-182.
30. Chávez S. I., 2017. Actividad cicatrizante del propóleo de Chihuahua. Tesis que opta que para obtener el Título de Bióloga. Universidad Nacional Autónoma de México.
31. Colinas R. A., 2016. Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de "Muehlenbeckia hastulata (J.E.Sm) I.M. Johnst" de la zona de Yucay (Cusco). Tesis para optar el Título Profesional de Químico. Facultad de química e ingeniería química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
32. CONAFOR-CONABIO., 2004. *Prosopis laevigata* (Humb. et Bonpl. ex Willd). Obtenido el 10 de septiembre de 2020 en: <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/988Prosopis%20laevigata.pdf>.
33. Coronado, H. M., Vega, S. L., Gutiérrez R. T., Vázquez M. F y Radilla, C.V., 2015. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*. 42 (2), 206-212.
34. Coy-Barrera, C.A., Parra J. y Cuca-Suárez, L. E., 2014. Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas -de la especie *raputia heptaphylla* (rutaceae). *Revista Elementos*. (4), 31-39.

35. Dávila P., Villaseñor J.L. y Chiang F., 1990. Fitogeografía del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 50, 135-149.
36. Delgado-Altamirano R., Monzote L., Piñón-Tápanes A., Vibrans H., Rivero-Cruz J.F., Ibarra-Alvarado C. and Rojas-Molina A., 2017. *In vitro* antileishmanial activity of Mexican medicinal plants. Heliyon. 3(9), doi: 10.1016/j.heliyon.2017.e00394.
37. De Jesús-Gabino, A.F., Mendoza-de Gives, P., Salinas-Sánchez, D.O., López-Arellano, M.E., Liébano-Hernández, E., Hernández-Velázquez, V.M. and Valladares-Cisneros, G., 2010. Anthelmintic effects of *Prosopis laevigata* n-hexanic extract against *Haemonchus contortus* in artificially infected gerbils (*Meriones unguiculatus*). Journal of Helminthology. 84, 71–75.
38. De la Fuente-Salcido, N. M., Pimentel, A., Valenzuela, A., Gutiérrez, E., Ontiveros, D., Sandoval, A., Linaje, T., Rodríguez, V., Salcedo, H. R., Barboza-Corona, J. E., y Castañeda, R. J., 2016. Acción fungitóxic del extracto de mezquite (*P. laevigata*) contra *Colletotrichum gloeosporoides*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus oryzae* y *R. stolonifer*. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1(2), 347-352.
39. Delgado-Altamirano, R., Monzote, L., Piñón-Tápanes, A., Vibrans, H., Rivero-Cruz, J.F., Ibarra-Alvarado, C. y Rojas-Molina, A., 2017. *In vitro* antileishmanial activity of Mexican medicinal plants. Heliyon. 3(9), e00394.
40. Delgado-Núñez, J., 2020. Actividad antihelmíntica in vitro de *Prosopis laevigata* contra huevos y larvas de infectantes de *Haemonchus contortus*. Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
41. Diario Oficial de la Federación (DOF)., 2020. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Recuperado el 7 de febrero de 2021 en: <http://oldwww.ibt.unam.mx/computo/pdfs/bioterio.NOM-062.pdf>.
42. Díaz-Batalla, L., Hernández-Uribe, J. P., Gutiérrez-Dorado, R., Téllez-Jurado, A., Castro-Rosas, J., Pérez-Cadena, R. and Gómez-Aldapa, C. A., 2018a.

- Nutritional characterization of *Prosopis laevigata* legume tree (mesquite) seed flour and the effect of extrusión cooking on its bioactive components. *Foods*. 7 (8), 124.
43. Díaz-Batalla, L., Hernández-Uribe, J. P., Román-Gutiérrez, A. D., Cariño-Cortés, R., Castro-Rosas, J., Téllez-Jurado A. and Gómez-Aldapa A. C., 2018b. Chemical and nutritional characterization of raw and thermal-treated flours of Mesquite (*Prosopis laevigata*) pods and their residual brans. *C y TA – Journal of Food*. 16 (1), 444-4451.
44. Domínguez, X.A., 1979. *Métodos de la Investigación Fotoquímica*. Ed. Limusa, México.
45. El Sol de San Luis., 2019. Buscan con “gobernadora”, heno y mezquite, obtener fármacos para complicaciones diabéticas. Obtenido el 14 de septiembre de 2020 de: <https://www.elsoldesanluis.com.mx/local/buscan-con-gobernadora-heno-y-mezquite-obtener-farmacos-para-complicaciones-diabeticas-3684291.html>.
46. Elsevier España., 2013. *Histología médico-práctica*. Obtenido el 20 de febrero de 2021 de: [file:///C:/Users/Atenea1/Documents/7mo.%20semestre/LIC/CICATRIZACI%C3%93N/HISTOLOGIA/-Tecnica\\_histologica.pdf](file:///C:/Users/Atenea1/Documents/7mo.%20semestre/LIC/CICATRIZACI%C3%93N/HISTOLOGIA/-Tecnica_histologica.pdf).
47. Flores, C.y Escudero P., 2012. *Reacción, reactividad y reconocimiento de Fenoles*. Universidad Tecnológica Metropolitana. Consultado el 5 de octubre de 2020 en: [https://sites.google.com/site/organicaiii/quimica\\_organica/quimica-organica-iii-nueva/quimica-organica-iii-2009-2012/experimentos-analisis-funcional-2010/e4/e4a/reaccion-reactividad-y-reconocimiento-de-fenoles](https://sites.google.com/site/organicaiii/quimica_organica/quimica-organica-iii-nueva/quimica-organica-iii-2009-2012/experimentos-analisis-funcional-2010/e4/e4a/reaccion-reactividad-y-reconocimiento-de-fenoles)
- 48.-Flores-Rivera, O. I., Ramírez-Morales, K., Meza-Márquez, J. M. y Nava-López, J.A., 2014. Fisiología de la coagulación. *Revista Mexicana de Anestesiología*. 37 (2), 382-386
49. Galera, F.M., 2000. *LOS ALGARROBOS*. Las especies del género *Prosopis* (algarrobos) de América Latina con especial énfasis en aquellas de interés económico. Talleres Gráficos de Graziani Gráfica: Córdoba.

50. Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., González-Laredo, R. F. & García-Casas, M. A., 2013. Thermal processing effect on the antioxidant capacity of pinole from mesquite pods (*Prosopis laevigata*). *C y TA- Journal of Food*. 11(2), 162-170.
51. García, A., 2002. Reparación de las heridas. Recuperado el 19 de marzo del 2020 de: <http://www.oc.lm.ehu.es/Departamento/OfertaDocente/PatologiaQuirurgica/Contenidos/Apoyo/Cap%203%20Curaci%C3%B3n%20de%20las%20heridas.pdf>.
52. García-Andrade, M., González-Laredo, R.F., Rocha-Guzmán, N.E., Gallegos-Infante, J.A., Rosales-Castro, M., and Medina-Torres, L., 2013. Mesquite leaves (*Prosopis laevigata*), a natural resource with antioxidant capacity and cardioprotection potential. *Industrial Crops and Products*. 44, 336-342.
53. García, B. A., 2003. Estudio fitoquímico y antibacteriano de *Prosopis laevigata* (H. B. ex Wild), mezquite de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
54. García Rodríguez, J. A. Cantón J. R, García Sánchez E. Gómez-Lus M. L., Martínez Martínez L. y Rodríguez-Avial C., 2000. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editor Juan J. Picazo, España.
55. García-Romero, A. S., 2002. Cromatografía. Instituto de Biotecnología, UNAM, México.
56. Gartner L. y Hiatt J. 2008. Texto Atlas de Histología, 3ª Ed. Mc. Graw Hill – Interamericana, México.
57. Grether, R., Martínez-Bernal, A., Luckow, M., y Zárata S., 2006. Flora del Valle Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología, UNAM, México.
58. Gobinath, S.M., Reddy, K.S. and Shankar, T., 2013. To evaluate the antipyretic activity of *Prosopis juliflora* ethanolic extract in Brewer's yeast

- induced hyperthermia in rats. *Journal Biotechnology and Biosafety*. 1(2), 28-32.
59. González Tuero J.H., Rodríguez Ramírez R., Machado Pineda M., González Quiala J. y Cabrera Salazar J., 2004. Heridas: Métodos de tratamiento. *MEDISA*. 8(1).
60. Grether, R., 2007. *Prosopis* L. emend. Burkart. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Instituto de Ecología. 150: 202-209.
61. Gross, J., 2011. *Mass Spectrometry*. Spriger-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania.
62. Guarín-Corredor C., Quiroga-Santamaría P. and Landínez-Parra N.S., (2013). Wound healing process of skin, endogenous fields related and chronic wounds. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba*. 61, 441-448.
63. Gutiérrez, M. C. y Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín INTEXTER (U.P.C) N° 122*.
64. Harris D. C., 2001. *Análisis Químico Cuantitativo*. Editorial Reverte, España.
65. Herrera, M. L., 1999. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños*. 34, 33-41.
66. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED),, 2020. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. Obtenido el 28 de septiembre de 2020 en <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM21puebla/municipios/21209a.html>
67. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (México),, 2017. Anuario estadístico y geográfico de Puebla 2017. México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
68. Khandelwal, P., Sharma, R.A. and Agrawal, M., 2016a. Phytochemical analyses of various parts of *Prosopis juliflora*. *Mintage Journal Pharmaceutical Medical Sciences*. 16-18.

69. Khandelwal, P.J., Sharma, R.A. and Agarwal, M. (2016b). Phytochemical analyses of various parts of *Prosopis cineraria*. International Journal of Pharmacy and Chemistry. 2(1), 6-9.
70. Kostennikova Z., 1983. UV spectrophotometric quantitative determination of flavonoid in calendula tincture. Farmatsiya 33(6), 83-86.
71. Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. y Mitchell, R. N., 2008. Robbins Patología Humana. 8ª edición Elsevier, España.
72. Kuskoski M. E., Asuero, A. G. Troncoso, A. M. Mancini-Filho J. y Roscane FETT., 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en la pupa de frutos. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas. 25 (4), 726-732.
73. Lucha-Fernández, V., Muñoz-Mañez, V. y Fornes-Pujalte, B., 2008. La cicatrización de las heridas. Revista Enfermería dermatológica. (2), 8-15.
74. Mariaca, C. J., Zapata M., y Uribe P., 2016. Oxidación y antioxidantes: hechos y controversias. Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica. 24 (3), 162-173.
75. Md. Nur Alam, Nusrat Jahan Bristi and Md. Rafiquzzaman., 2013. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal. 21, 143–152.
76. Megías M., Molist P. y Pombal M.A., 2019. Atlas de histología vegetal y animal. Técnicas histológicas. Recuperado el 23 febrero de 2021 de: <http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/1-introduccion.php>
77. Meneses-Reyes, J. C., Soto-Hernández, R. M., Espinosa-Solares T. y Ramírez-Guzmán M.E., 2008. Optimización del proceso de extracción de flavonoides de flor de manzanilla (*Matricaria recutita* L.). Agrocienca. 42, 425-433.
78. Merino, P. J. y Noriega B., 2011. La piel y sus funciones. Open Course Ware, Universidad de Cantabria.
79. Monedero Pasiminio, J. M., 2016. Identificación y caracterización de flavonoides por espectrometría de masas en melazas residuales de un

- ingenio azucarero. Trabajo de grado para optar al Título de Pregado en Química Farmacéuta. Universidad ICESI Facultad de Ciencias Naturales.
80. Montalvo A. C., 2010. Técnica Histológica. UNAM, Facultad de Medicina, México.
81. Montalvo A. C., 2018. Sistema Tegumentario: Piel y Anexos. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
82. Montoya, A. R., García-Palomares J. C., Padilla-Ramírez J., 2004. Utilización de un SIG para la determinación de Impacto Ambiental generado por las actividades Agrícolas, Ganaderas e Industriales: El caso del Valle de Zapotitlán de la reserva de la Biosfera de Tehuacán- Cuicatlán. Boletín de la AGEN No. 38, España.
83. Moreno, G. P., 2019. Evaluación de la actividad anti*Candida* del extracto metanólico de las hojas de *Prosopis laevigata*. Tesis para obtener el Título de Bióloga. Universidad Nacional Autónoma de México.
84. Mudarra, F. I., 2011. Guía de Anestesia y Analgesia en Ratón. Recuperado el 29 de enero 2020 de <https://sea.umh.es/files/2011/12/2221-pnt-guia-anestesia-y-analgesia-en-raton.pdf>.
85. Mudgil, D and Barak, S., 2020. Mesquite gum (*Prosopis* gum): Structure, properties & applications. International Journal of Biological Macromolecules. 159, 1094-1102.
86. Muñoz Jáuregui A. M., Ivarado-Ortíz U. C., Teresa Blanco Blasco T., Castañeda Castañeda B., Ruiz Quiroz J. y Alvarado Yarasca A., 2014. Determinación de compuestos fenólicos, flavonoides totales y capacidad antioxidante en mieles peruanas de diferentes fuentes florales. Revista de la Sociedad Química del Perú. 80 (4), 287-297.
87. Napar, A.A., Bux, H., Zia, M.A., Ahmad, M.Z., Iqbal, A., Roomi, S., Muhammad, I. and Shah, S.H., 2012. Antimicrobial and antioxidant activities of Mimosaceae plants; *Acacia modesta* Wall (Phulai), *Prosopis cineraria* (Linn.) and *Prosopis juliflra* (Swartz). Journal of Medicinal Plants Research. 6, 2962-2970.

- 88.Nava, S.U., 2017. Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de las flores de *Prosopis laevigata* (Humb. &Bonpl. Ex Willd) M.C. Jhonst. Tesis para obtener el Título de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 89.Nava, T. A., 2018. Propiedades biológicas del extracto etanólico del propóleo de Chihuahua, en un modelo de cicatrización. Tesis profesional para obtener el grado de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 90.Navarrete Franco G., 2003. Histología de la piel. Revista Facultad de Medicina UNAM. 46(4), 130-133.
- 91.OECD., 2017. *Test No. 402: Acute Dermal Toxicity*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264070585-en>.
- 92.Oliveros-Galindo, O., 2000. Descripción Estructural de las Comunidades Vegetales en las Terrazas Aluviales del Rio Salado, en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de Licenciatura. FES- Iztacala. UNAM.
- 93.Okusa, P., Penge, O., Devleeschouwer, and M., Duez, P., 2007. Direct an indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (*Boraginaceae*). Journal of Ethnopharmacology. 112, 476-481.
- 94.Osano, K.O., Nyamai, D.W., Ogola, P.E., Ouko, R.O., Arika, W.M., Bina, M.W., Mburu, D.N. and Ngugi, M.P., 2016. Evaluation of in vivo toxicity of dichlorometane: methanolic leaf extracts of *Prosopis juliflora* in female Wistar Albino Rats. Journal of Drug Metabolism & Toxicology. 7 (1), 1-11.
- 95.Pardo-Núñez, J., 2001. Diagnóstico de las plantas silvestres, arvenses y ruderales que son empleadas como alimento por habitantes de cuatro localidades del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Tesis de licenciatura en biología. Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.
- 96.Paredes-Flores, Martín, Lira Saade, Rafael, y Dávila Aranda, Patricia D., 2007. Estudio etnobotánico de Zapotitlán Salinas, Puebla. Acta botánica mexicana. (79), 13-61. Recuperado en 11 de noviembre de 2020, de



[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S018771512007000200002&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018771512007000200002&lng=es&tlng=es).

97. Perez, M. J., Cuello, A. S., Zampini, I. C., Ordoñez, R. M., Alberto, M., Quispe, C. and Isla, M., 2014. Polyphenolic compounds and anthocyanin content of *Prosopis nigra* and *Prosopis alba* pods and their antioxidant and anti-inflammatory capacities. *FoodResearch International*. 64, 762–771.
98. Pérez MJ, Zampini IC, Alberto MR and Isla MI., 2018. *Prosopis nigra* Mesocarp Fine Flour, A Source of Phytochemicals with Potential Effect on Enzymes Linked to Metabolic Syndrome, Oxidative Stress, and Inflammatory Process. *Journal of Food Science*. 83(5),1454-1462.
99. Prabha D. S., Dahms H. S. & Malliga P., 2014. Pharmacological potentials of phenolic compounds from *Prosopis* spp. a review. *Journal of Coastal Life Medicine*. 2 (11), 918-924.
100. Radha, M. H. and Laxmipriya, N. P., 2015. Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of *Aloe vera*: A systematic review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 5(1), 21 -26.
101. Rahman, A.A., Samoylenko, V., Jacob, M.R., Sahu, R., Jain, S.K., Khan, S.I., Tekwani, B.L. and Muhammad, I., 2011. Antiparasitic and antimicrobial indolizidines from the leaves of *Prosopis glandulosa* var. *glandulosa*. *Planta Medica*. 77: 1639e43.
102. Ramamoorthy, P., and Bono, A., 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology*. 2(1), 70-80.
103. Ramírez, H. A., 1996. Contribución al conocimiento de la flora medicinal de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Tesis de licenciatura en biología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
104. Ramírez-Hernández, G. A., 2010. Fisiología de la cicatrización cutánea. *Revista Facultad de Salud*. 2 (2), 69-78.
105. Ramírez-Rojo, M. I., Vargas-Sánchez, R. D., Hernández-Martínez, J., Martínez-Benavidez, E., Sánchez-Escalante, J. ., Torrescano-Urrutia, G. R. y Sánchez-Escalante, A., 2019. Actividad antioxidante de extractos de hoja de

- mezquite (*Prosopis velutina*). Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. 21(1), 113-119.
- 106.Ramos, C. G., 2016. Análisis fitoquímico de *Ipomoea murucoides*. Tesis para obtener el Título de Bióloga. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 107.Rengifo-Penadillos R. A., 2013. Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propóleos. Revista Farmaciencia. 1(2).
- 108.Reséndiz-Trejo, J., Ramírez-Moreno, E. Ariza-Ortega, J. A. y Ortiz-Polo, A., 2020. El mezquite como ayuda ergogénica para atletas de alto rendimiento en deportes intermitentes. Revisión sistemática. Publicación semestral, Educación y Salud Boletín Científico Instituto de Ciencias de la Salud Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 9(17), 116-124.
- 109.Ríos Herrera E. N., 2012. Determinación de metabolitos secundarios y código de barras de ADN de Vitroplantas de *Turvinicarpus valdezianus*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Fotomejoramiento. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Dirección de Postgrado.
- 110.Rivera-Castro, V. y Sánchez-Escalante A., 2016. Actividad antioxidante de extractos etanólicos y acuosos de vaina de mezquite (*Prosopis velutina*) con potencial de aditivo alimentario. 4º Encuentro de Jóvenes Investigadores-CONACYT. 7 (2), 1-9.
- 111.Rodríguez, B. C., 2006. Fármacos para sedación, anestesia y analgesia. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez".
- 112.Rodríguez. S. E., Rojo. M. G., Ramírez. V. B., Martínez. R. R., Cong. H. M., Medina. T. S. y Piña. R. H., 2014. Análisis técnico del árbol del mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Wild.) en México. Ra Ximhai. 10(3), 173 - 193.
- 113.Rojas De Astudillo, L., Jaramillo-Jaramillo, C. y Lemus Barros, M., 2015. Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios. Universidad Técnica de Machala, Ecuador.
- 114.Román P. H., 2016. Bromatología de la vaina de mezquite (*Prosopis* spp.) como alternativa para consumo sustentable en la comarca lagunera.

- Monografía presentada como requisito parcial para obtener el título de:  
Ingeniero en Agroecología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
115. Ross M. H. y Pawlina W. 2012. Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular. Médica Panamericana, Buenos Aires.
  116. Rosas, L., 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis de Licenciatura para obtener el título de: biólogo. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
  117. Rossi, C.A., De León, M., González, G.L. and Pereyra, A.M., 2007. Secondary metabolites presence in ten browse woody plants in the xerophitic woodland in the argentine arid Chaco region. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 7(2), 133-143.
  118. Ruiz-Nieto, J.E., Hernández-Ruiz, J., Hernández-Marín, J., Mendoza-Carrillo, J., Abraham Juárez, M., Isiordia-Lachica, P.M. and Mireles-Arriaga, A.I., 2020. Mesquite (*Prosopis* spp.) tree as a feed resource for animal growth. *Agroforestry Systems*. 94, 1139 - 1149.
  119. Sahu, P. K., Dayal, G. D., Sigh, R., Pandey, P., Gupta, S. and Kumar, A., 2013. Therapeutic and Medicinal Uses of *Aloe vera*: A Review. *Pharmacology & Pharmacy*. 4:599-610.
  120. Salinas- Sánchez, D., Arteaga G., León I., Dorado O., Vallarades M. and Navarro V., 2009. Antimicrobial activity of medicinal plants from the Huautla Sierra Biosphere in Morelos (México). *Polibotánica*. 28, 213-225.
  121. San Román, A. D., 2014. Desarrollo de un método espectrofotométrico para la detección de alcaloides pirrolizidínicos (pas) en mieles y polen de plantas melíferas de la península de Yucatán. Tesis que para obtener el grado académico de Maestro en Ciencia y Tecnología en la Especialidad de Procesos Agroindustriales. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C.
  122. Sánchez. A. K., 2014. Determinación de factores antinutricionales de la harina integral de mezquite (*Prosopis laevigata*). Tesis que para obtener el

Título de Químico farmacobiólogo. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

123. Sánchez, E., Rivas-Morales, C., Castillo, S., Leos-Rivas, C., García-Becerra, L. and OrtizMartínez, D.M., 2016. Antibacterial and antibiofilm activity of methanolic plant extracts against nosocomial microorganisms. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, 1-8.
124. Sandoval S. C., 2013. Química Orgánica II. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
125. San Román Ávila, D. A., 2014. Desarrollo de un método espectrofotométrico para la detección de alcaloides pirrolizidínicos (PAs) en mieles y polen de plantas melíferas de la Península de Yucatán. Tesis para obtener el grado de Maestro en ciencia y tecnología en la especialidad de procesos agroindustriales, centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco, A. C.
126. Sathiya, M. y Muthuchelian, K., 2008. Investigación del perfil fitoquímico y el potencial antibacteriano de la hoja etanólica del extracto de *Prosopis juliflora* DC. *Folletos Etnobotánicos*. 12 (12), 40-45.
127. Schmeda-Hirschman, G., Theoduloz, C., Jiménez-Aspee, F. and Echeverría, J., 2020. Bioactive constituents from South American *Prosopis* and their use and toxicity. *Current pharmaceutical design*. 26 (5), 542-555.
128. Secretaría del Desarrollo Social (SEDESOL)., 2016. Informe anual sobre la situación de pobreza y rezago social 2016. Recuperado el 28 de septiembre de 2020 de: [http://diariooficial.gob.mx/SEDESOL/2016/Puebla\\_209.pdf](http://diariooficial.gob.mx/SEDESOL/2016/Puebla_209.pdf)
129. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales., 2018. El área natural protegida Tehuacán-Cuicatlán ya es patrimonio de la humanidad. Recuperado el 13 de octubre de 2021 de: <https://www.gob.mx/semarnat/prensa/el-area-natural-prottegida-tehuacan-cuicatlan-ya-es-patrimonio-de-la-humanidad-163342?idiom=es>
130. Senet P., 2007. Dermatologie. Physiologie de la cicatrisation cutanée. EMC Elsevier Masson SAS: Paris.

131. Sepúlveda Saavedra J., 2012. Texto atlas de histología. Biología celular y tisular. Mc-Graw Hill: China.
132. Serrano P. R., 2013. Efecto cicatrizante de *Brusera morelensis* Ramírez (Burseraceae) de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Tesis que para optar por el grado de Doctora en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
133. Sevilla-Valenzuela, F., 2011. Importancia de los antioxidantes en plantas. Recuperado el 4 de mayo del 2021 de <https://www.um.es/acc/importancia-de-los-antioxidantes-en-plantas/>.
134. Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R. and Verdian-rizi, M., 2008. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai Journal Pharmacology Science*. 32, 17-20.
135. Sharifi-Rad, J., Kobarfard, F., Ata, A., Ayatollahi, S. A., Khosravi-Dehaghi, N., Jugran, A. K., Tomas, M., Capanoglu, E., Matthews, K. R., Popović-Djordjević, J., Kostić, A. Kamiloglu, S., Sharopov, F., Choudhary, M. I. and Martins, N., 2019. *Prosopis* plant chemical composition and pharmacological attributes: targeting clinical studies from preclinical evidence *Biomolecules*. 9 (12), 777.
136. Singh S., Swapnil, S. and Verma, K., 2011. Antibacterial properties of alkaloid rich fractions obtained from various parts of *Prosopis juliflora*. *International Journal of Pharma Sciences and Research*. 2 (3), 114-120.
137. Singleton, V., Orthofer, R. and Lamuela-Reventós, R., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*. 299, 152-178.
138. Sirmah PK., 2000. Towards valorisation of *Prosopis juliflora* as an alternative to the declining wood resources in Kenya. Université Henri Poincaré, France.
139. Sirmah, P., Dumarçay, S., Masson, E. and Gerardin P., 2009. Unusual amount of (-)-mesquitol from the heartwood of *Prosopis juliflora*. *Natural Product Research*. 23, 183-189.

140. SivaKumar, T., Srinivasan, K., Rajavel, R., Vasudevan, M., Ganesh, M. and Kamalakannan, K., 2009. Isolation of chemical constituents from *Prosopis juliflora* bark and anti-inflammatory activity of its methanolic extracts. *Journal of Pharmacy Research*. 2, 551-556.
141. Soares da Silva, R., Santos da Oliveira, K. and Cavalcante, G., 2015. Suscetibilidade antimicrobiana de bactérias ocorrentes em úlceras crônicas aos extractos brutos de *Prosopis juliflora*. *Revista Saúde e Pesquisa*. 3, 493-499.
142. Sreevidya N and Mehrotra S., 2003. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. *Journal of AOAC International*. 86 (6), 1124-1127.
143. Taroco, V. Seija, R. Vignoli, 2020. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Obtenido el 3 de febrero del 2021 de <http://higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
144. Ukande, M., Shaikh, S., Murthy, K and Shete, R., 2019. Review on Pharmacological potentials of *Prosopis juliflora*. *Journal of drug delivery therapeutics*. 9(4), 755-760.
145. Universidad Nacional Autónoma de México. (2007). Técnicas cromatográficas. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
146. Vademécum Actuamed., 2020. RECOVERÓN Y RECOVERÓN C, RECOVERÓN N Y RECOVERÓN NC. Obtenido el 8 de septiembre de 2020 de <https://www.actuamed.com.mx/marca/18579>
147. Valencia, B. C., 2010. Cicatrización: Proceso de reparación tisular. Aproximaciones terapéuticas. *Investigaciones Andina*. 20 (12), 85-98.
148. Vargas, M. B., Ambriz, G. D., Navarro, M. M., Trejo, C. A., Rodríguez, E. G. y González, V. M., 2018. Manejo de animales del Bioterio de la UAM-I. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
149. Vargas R. J., 2016). Estudio de la distribución geográfica del Algarrobo (*Prosopis* sp.) en la comunidad de Taypichullo municipio de Mecapaca del

departamento de la Paz. Tesis para adquirir el Título de de Ingeniero Agrónomo. Universidad Mayor de San Andrés.

150. Venegas-Casanova, E. A., 2012. Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis L.* y su capacidad antioxidante. UCV-Scientia. 4(2), 161-175.
151. Verdín Terán, Moreno Fierros, Rojo Botello, García Hernández, Omaña Molina, Meneses Aguirre y Nieto Yáñez., 2013. Histología e Inmunohistoquímica. Manual de métodos. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
152. Vidaurre-Martínez, M. F., Querevalú-García, L. M., De Los Ríos-Martínez, E. y Ruiz-Reyes, S. G., 2019. Características farmacognósticas de las hojas de *Capparis avicennifolia*. Revista Médica Vallejana. 4 (2), 121-131.
153. Wang P.H., Huang B.S, Horng H.C, Yeh C.C. y Chen Y.J. 2018. Cicatrización de la herida. Journal of the Chinese Medical Association. 81, 94–101
154. Yadav, N y Rana A.C., 2020. Aspecto farmacológico y farmacognóstico de *Prosopis juliflora*: una revisión. Revista mundial de investigaciones y reseñas avanzadas. 8 (1), 36-52.
155. Zárate, G., Gatica, T. y Alfieri F., 2018. Manual de heridas y suturas. Universidad Finis Terrae, Chile.
156. Zhao R., Liang H., Clarke E., Jackson C. and Xue M., 2016. Inflammation in chronic wounds. International Journal of Molecular Sciences. 17(12), 1–14.