



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Efecto cicatrizante de *Bursera morelensis* Ramírez (Burseraceae), de San
Rafael, Coxcatlán, Puebla

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ROCIO SERRANO PARRALES

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ
FES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM
DRA. ANA LUISA ANAYA LANG
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D.F. MAYO, 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Efecto cicatrizante de *Bursera morelensis* Ramírez (Burseraceae), de San
Rafael, Coxcatlán, Puebla

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ROCIO SERRANO PARRALES

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ
FES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

DRA. ANA LUISA ANAYA LANG
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D.F. MAYO, 2013.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 10 de diciembre de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **SERRANO PARRALES ROCÍO** con número de cuenta **99515412** con la tesis titulada **"EFECTO CICATRIZANTE DE *Bursera morelensis* RAMÍREZ (BURSERACEAE), DE SAN RAFAEL, COXCATLÁN, PUEBLA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA MARGARITA CANALES MARTÍNEZ**:

Presidente: DR. CÉSAR MATEO FLORES ORTÍZ
Vocal: DRA. BEATRÍZ VÁZQUEZ CRUZ
Secretario: DRA. ANA LUISA ANAYA LANG
Suplente: DR. RICARDO REYES CHILPA
Suplente: DR. ADOLFO ANDRADE CETTO

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de mayo de 2013.



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

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

AGRADECIMIENTOS

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme la beca económica que me permitió concluir esta etapa de mi desarrollo profesional (No. de registro/No.CVU: 165405/165405).

A los proyectos UNAM PAPCA 2009 a 2010 (Proyecto 7), UNAM DGAPA PAPIIT (IN218511-3) y al proyecto Conservación de Plantas Útiles de San Rafael, Coxcatlán, MGU/Useful Plants Project (UUP)-México, Royal Botanic Gardens por el financiamiento para la realización de este trabajo.

A los miembros del Comité Tutor: Dra Ana Luisa Anaya Lang y Dr. Manuel Jiménez Estrada.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Dra. María Margarita Canales Martínez por dirigir esta tesis, guiarme hacia el logro de los objetivos de este trabajo y por su apoyo académico en los momentos más importantes de mis estudios de Doctorado.

A la Dra. Ana Luisa Anaya Lang y al Dr. Manuel Jiménez Estrada, por su apoyo incondicional y sus valiosas aportaciones que enriquecieron mi desempeño académico y personal.

A los honorables miembros del jurado: Dr. César Mateo Flores Ortiz, Dra. Beatriz Vázquez Cruz, Dr. Ricardo Reyes Chilpa y Dr. Adolfo Andrade Cetto, por aportar su tiempo y su conocimiento para la revisión de este trabajo y por sus valiosas contribuciones para mejorarlo.

A los académicos: Dra. Claudia Tzasná Hernández Delgado, Dr. José Guillermo Ávila Acevedo y Dra. Ana María García Bores por compartir su conocimiento, por impulsarme y motivarme hacia mi superación y por brindarme su apoyo, su asesoría y su amistad en todo momento.

A los académicos: Dra. Beatriz Vázquez Cruz, M. en C. David Segura Cobos, Biól. José del Carmen Benítez Flores, M. en C. María del Rosario González Valle, M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla y Dr. Oswaldo Téllez Valdés por sus contribuciones en la realización de la parte experimental de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres, por darme la vida, por creer en mí y por quereme y apoyarme siempre.

A mis hermanos por crecer conmigo en todos los aspectos y por su cariño.

A Israel, por compartir su vida conmigo, por mostrarme que todo lo que se desea es posible, y por quereme y amarme.

A mis amigos: Nany, Julieta, Angélica, Jimena, Daniel, Anita, Memo, Karla, Griselda, Sebastián, Adriana, Jimena, Erik, Cecilia, Antonio, Leonor, Javier, Karina... por brindarme su amistad y por compartir buenos y malos momentos.

Todos ellos hicieron posible la realización de esta tesis, los quiero mucho.

Índice de contenido

Índice de contenido.....	I
Índice de cuadros.....	II
Índice de figuras.....	III
Abreviaturas utilizadas.....	IV
Resumen.....	V
Abstract.....	VI
Introducción.....	1
Cicatrización de heridas.....	1
Proceso de cicatrización.....	2
Productos utilizados en la cicatrización de heridas.....	8
Las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán (SRC).....	10
Género <i>Bursera</i>	12
<i>Bursera morelensis</i> Ramírez.....	12
Antecedentes de estudios sobre el Género <i>Bursera</i> y sobre <i>B. morelensis</i>.....	16
Hipótesis.....	20
Objetivos.....	20
Material y métodos.....	21
Fase 1. Obtención del extracto metanólico, la partición metanólica (PM), caracterización química general de la PM y evaluación de la actividad biológica de la PM.....	22
1.1. Estudio fitoquímico.....	22
a) Material vegetal y extractos.....	22
b) Caracterización preliminar del extracto metanólico.....	23
1.2. Actividad biológica.....	23
a) Animales.....	23
b) Actividad cicatrizante.....	24
c) Actividad antiinflamatoria.....	25
d) Efecto analgésico.....	25
e) Actividad antioxidante.....	26
f) Actividad antibacteriana.....	26
g) Actividad antifúngica.....	27
1.3. Procesamiento de los datos.....	27

Fase 2. Aislamiento de los principios activos de la PM, caracterización química general de las fracciones obtenidas de la PM y evaluación de la actividad biológica de las fracciones de la PM.....	28
2.1. Estudio fitoquímico.....	28
a) Aislamiento de los principios activos.....	28
b) Caracterización general de los constituyentes de las fracciones obtenidas de las separaciones cromatográficas.....	28
2.2. Actividad biológica.....	98
Fase 3. Elucidación general de los principios activos de las fracciones de la PM con actividad biológica.....	29
3.1. Elucidación de los principios activos.....	29
• Determinación cualitativa.....	29
• Resonancia magnética nuclear de protones.....	30
Resultados.....	31
Fase 1.....	31
1.1. Estudio fitoquímico.....	31
a) Datos etnobotánicos de <i>B. morelensis</i>	31
b) Extracción.....	31
c) Caracterización preliminar del extracto metanólico.....	32
1.2. Actividad biológica.....	34
a) Efecto cicatrizante.....	34
• Método tensiométrico.....	34
• Análisis histopatológico.....	35
• Estudio de regeneración total.....	41
b) Actividad antiinflamatoria.....	45
• Edema plantar por carragenina.....	45
• Migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal.....	45
c) Efecto analgésico.....	47
d) Actividad antioxidante.....	48
e) Actividad antibacteriana.....	49
• Evaluación cualitativa.....	49
• Evaluación cuantitativa.....	49
• Cinética de proliferación bacteriana.....	50
f) Actividad antifúngica.....	52
• Evaluación cualitativa.....	52
• Evaluación cuantitativa.....	52
Fase 2.....	53
2.1. Estudio fitoquímico.....	53
a) Aislamiento de los principios activos.....	53
b) Caracterización general de los constituyentes de las fracciones obtenidas de las separaciones cromatográficas.....	54
2.2. Actividad biológica.....	56
a) Actividad antioxidante.....	56
b) Actividad antibacteriana.....	58

• Correlación entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante y antibacteriana.....	59
c) Efecto cicatrizante.....	62
• Método tensiométrico.....	62
• Determinación de hidroxiprolina.....	63
Fase 3.....	64
a) Elucidación de la estructura química de los constituyentes de las fracciones.....	64
• Determinación cualitativa.....	64
• HPLC-MS de las fracciones C1-3, C1-6 y C2-9.....	64
• RMN ¹ H de las fracciones C1-3, C1-6 y C2-9 y RMN ¹³ C de la fracción C1-3.....	64
• Estructuras probables de los taninos hidrolizables en la fracción C1-3.....	71
Discusión.....	73
Conclusiones.....	83
Apéndices.....	85
I. Método de maceración.....	85
II. Método de Folín-Ciocalteu.....	86
III. Método tensiométrico.....	87
IV. Estudio histológico.....	89
V. Edema plantar por carragenina en rata.....	90
VI. Migración celular a la cavidad peritoneal.....	92
VII. Método de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético.....	94
VIII. Reducción del radical DPPH.....	95
IX. Método de difusión en agar de Kirby-Baüer.....	96
X. Método de dilución en agar.....	98
XI. Actividad de los extractos herbales sobre la cinética del crecimiento en la población bacteriana.....	100
XII. Método de inhibición del crecimiento radial.....	101
XIII. Método de dilución en agar (hongos).....	102
XIV. Determinación de hidroxiprolina.....	103
XV. Diferenciación de taninos (hidrolizables o condensados).....	105
Referencias.....	106
Artículo: Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant properties of <i>Bursera morelensis</i> bark from San Rafael, Coxcatlán, Puebla (México): Implications for cutaneous wound healing.....	115

Índice de cuadros

Cuadro 1.	Metabolitos secundarios con efecto citotóxico y antitumoral de algunas especies del género <i>Bursera</i>	17
Cuadro 2.	Actividad biológica de los extractos crudos de algunas especies del género <i>Bursera</i>	18
Cuadro 3.	Cepas bacterianas utilizadas para los bioensayos.....	26
Cuadro 4.	Especies fúngicas utilizadas para los bioensayos.....	27
Cuadro 5.	Datos generales de <i>B. morelensis</i>	31
Cuadro 6.	Rendimiento del extracto metanólico (corteza de <i>B. morelensis</i>).....	31
Cuadro 7.	Datos de HPLC-fase reversa de la PM. DAD ($\lambda=260$ nm).....	33
Cuadro 8.	Efecto de la PM sobre la curación de heridas en piel de ratón.....	34
Cuadro 9.	Actividad antibacteriana de la PM (prueba cualitativa).....	49
Cuadro 10.	Actividad antibacteriana de la PM (prueba cuantitativa).....	49
Cuadro 11.	Resultados de actividad antifúngica de la PM (prueba cualitativa).....	52
Cuadro 12.	Porcentaje de inhibición de la PM sobre <i>T. mentagrophytes</i> (prueba cuantitativa).....	52
Cuadro 13.	Fracciones de la primera cromatografía en columna de la PM.....	53
Cuadro 14.	Fracciones de la segunda cromatografía en columna.....	54
Cuadro 15.	Tiempos de retención de los constituyentes químicos de las fracciones de la cromatografía 1. HPLC-fase reversa. DAD ($\lambda=260$ nm).....	55
Cuadro 16.	Tiempos de retención de los constituyentes químicos de las fracciones de la cromatografía 2. HPLC-fase reversa. DAD ($\lambda=260$ nm).....	55
Cuadro 17.	Porcentaje de fenoles de las fracciones obtenidas por cromatografía de la PM de <i>B. morelensis</i> y su relación con la actividad antibacteriana y con la actividad antioxidante.....	62
Cuadro 18.	Tiempo de retención, abundancia y peso molecular de los constituyentes químicos de las fracciones C1-3, C1-6, C2-9 y de la PM. HPLC-MS (ESI-trampa de iones).....	66

Índice de figuras

Figura 1.	Ubicación geográfica de SRC.....	11
Figura 2.	Corteza de <i>Bursera morelensis</i>	13
Figura 3.	<i>Bursera morelensis</i> Ramírez.....	14
Figura 4.	Comparación por HPLC-fase reversa del extracto metanólico (M) y la PM de <i>B. morelensis</i>	32
Figura 5.	HPLC-fase reversa de la PM (DAD, $\lambda=260$ nm).....	33
Figura 6.	Efecto de la PM de <i>B. morelensis</i> sobre la piel de ratón lesionada.....	35
Figura 7.	Micrografías de: a) piel intacta, b) sin tratamiento. Muestras tomadas después de 5 días de la lesión. La región mostrada representa la regeneración debajo de la cicatriz. (H&E).....	37
Figura 8.	Micrografías de: a) vehículo (gel de carbopol), b) neosporin dérmico. Muestras tomadas después de 5 días de la lesión. La región mostrada representa la regeneración debajo de la cicatriz. (H&E).....	38
Figura 9.	Micrografías de: a) 5 % de la PM, b) 10 % de la PM. Muestras tomadas después de 5 días de la lesión. La región mostrada representa la regeneración debajo de la cicatriz. (H&E).....	39
Figura 10.	Micrografías de: a) 20 % de la PM, b) 30 % de la PM. Muestras tomadas después de 5 días de la lesión. La región mostrada representa la regeneración debajo de la cicatriz. (H&E).....	40
Figura 11.	Cicatriz a los 10 días de tratamiento.....	41
Figura 12.	Micrografías de las heridas en reparación tratadas con la PM de <i>B. morelensis</i> , después de 10 días de la lesión. a) vehículo, b) recoverón, c) 5 % de la PM. La región mostrada representa la región debajo de la cicatriz. (H&E).....	43
Figura 13.	Micrografías de las heridas en reparación tratadas con la PM de <i>B. morelensis</i> , después de 10 días de la lesión. a) 10 % de la PM, b) 20 % de la PM. La región mostrada representa la región debajo de la cicatriz. (H&E).....	44
Figura 14.	a) Efecto de la PM sobre el edema plantar por carragenina en rata. b) Efecto de la PM después de 4 h de la inducción del edema.....	46
Figura 15.	Efecto de la PM sobre la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal.....	46
Figura 16.	Efecto de la PM sobre las contorsiones abdominales totales, acumuladas durante un lapso de observación de 20 minutos.....	47

Figura 17.	Efecto antioxidante de la PM. Porcentaje de reducción del DPPH (equivalente a porcentaje de decoloración del DPPH).....	48
Figura 18.	Efecto de diferentes concentraciones de la PM sobre el crecimiento en la población bacteriana. a) PM sobre <i>S. aureus</i> , b) PM sobre <i>V. cholerae</i> cc.....	51
Figura 19.	Contenido total de fenoles de las fracciones de las cromatografías realizadas a la PM de <i>B. morelensis</i>	54
Figura 20.	Efecto antioxidante de las fracciones de la cromatografía 1. Porcentaje de reducción del DPPH (equivalente con el porcentaje de decoloración del DPPH).....	56
Figura 21.	Efecto antioxidante de las fracciones de la cromatografía 1. Porcentaje de reducción del DPPH (equivalente con el porcentaje de decoloración del DPPH).....	57
Figura 22.	Actividad antibacteriana de las fracciones de las cromatografías sobre <i>S. aureus</i>	58
Figura 23.	Relación entre el contenido total de fenoles y la actividad antibacteriana (sobre <i>S. aureus</i>). a) Fracciones de la cromatografía 1, b) Fracciones de la cromatografía 2.....	60
Figura 24.	Relación entre el contenido total de fenoles y la actividad antioxidante (reducción del radical DPPH). a) Fracciones de la cromatografía 1, b) Fracciones de la cromatografía 2.....	61
Figura 25.	Efecto de la PM y algunas fracciones de <i>B. morelensis</i> en piel de ratón lesionada, después de 10 días de tratamiento. a) Método tensiométrico: porcentaje de cicatrización, b) Determinación de hidroxiprolina.....	63
Figura 26.	HPLC-MS. a) fracción C1-3, b) fracción C1-6, c) fracción C2-9, d) PM.....	65
Figura 27.	Espectro de RMN ¹ H de la fracción C1-3.....	67
Figura 28.	Espectro de RMN ¹ H de la fracción C1-6.....	68
Figura 29.	Espectro de RMN ¹ H de la fracción C2-9.....	69
Figura 30.	Espectro de RMN ¹³ C de la fracción C1-3.....	70
Figura 31.	Estructura base de taninos hidrolizables.....	72
Figura 32.	Estructuras probables de lostaninos hidrolizables en la fracción C1-3.....	72
Figura 33.	a) Ratones anestesiados donde se observa la incisión que incluye todas las capas de la piel; b) jeringas con los tratamientos de la PM con gel al 5, 10, 20 y 30 % (P/V) y gel solo; c) ratones anestesiados con la incisión hecha y con el tratamiento de la PM al 5%.....	88
Figura 34.	Ratón contorsionándose después de la aplicación de ácido acético.....	94

Abreviaturas utilizadas

- CA₅₀**: capacidad antioxidante media.
- CBM**: concentración bactericida mínima.
- CD₃OD**: metanol deuterado.
- CFM**: concentración fungicida mínima.
- CI₅₀**: concentración inhibitoria media.
- CMI**: concentración mínima inhibitoria.
- COSY**: correlated spectroscopy (espectroscopía de correlación).
- DAD**: detector de arreglo de diodos.
- DMSO**: dimetil sulfóxido.
- DPPH**: 2,2-difenil-picril-hidrácilo.
- E.E.M.**: error estándar de la media.
- EGF**: factor de crecimiento epidérmico.
- ERO**: especies reactivas de oxígeno.
- GC-MS**: cromatografía de gases acoplada con espectroscopía de masas.
- GM-CSF**: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
- H&E**: hematoxilina- eosina (tinción).
- HPLC**: *high performance liquid chromatography* (cromatografía líquida de alta resolución)
- HPLC-MS**: cromatografía líquida de alta resolución acoplada con espectrometría de masas.
- IFN- γ** : interferón gamma.
- IGF**: factor de crecimiento similar a insulina.
- IL-1**: interleucina 1.
- IL-8**: interleucina 8.
- M**: extracto metanólico crudo.
- MAIC**: moléculas de adhesión intercelular.
- MEC**: matriz extracelular.
- MEC**: matriz extracelular.
- ND**: neosporín dérmico.
- PDGF**: factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- PH**: partición hexánica.
- PM**: partición metanólica.
- RMN ¹³C**: resonancia magnética nuclear de carbono trece.
- RMN ¹H**: resonancia magnética nuclear de protones.
- SRC**: San Rafael Coxcatlán.
- TGB- β** : factor de crecimiento transformante beta.
- TGF- β** : factor de transformación del crecimiento beta.
- TNF- α** : factor de necrosis tumoral alfa.
- UFC**: unidades formadoras de colonias.
- VEGF**: factor de crecimiento endotelial vascular.

Resumen

Introducción: El género *Bursera* se encuentra ampliamente diversificado en el Continente Americano, donde existen más de 100 especies, México es su centro de diversidad donde se conocen 85 especies, 70 de las cuales son endémicas. *Bursera morelensis* es utilizada por los habitantes de San Rafael Coxcatlán para curar heridas, sin embargo no existen estudios dirigidos a evaluar tal actividad biológica. En el presente trabajo se evaluó la actividad cicatrizante de la corteza de la especie *B. morelensis*, así como la actividad antiinflamatoria, analgésica, antioxidante y antimicrobiana, en vista de que tales actividades biológicas favorecen el proceso de cicatrización. Además, se realizó el aislamiento y la caracterización de los metabolitos secundarios de la corteza de *B. morelensis*, mismos que le confieren su actividad biológica.

Material y métodos: Se obtuvo el extracto metanólico y se realizó una partición de este usando metanol y hexano. La partición metanólica (PM) se utilizó para hacer todas las pruebas biológicas y se caracterizaron algunos de sus metabolitos secundarios. La actividad cicatrizante se evaluó mediante el método tensiométrico sobre heridas hechas en ratón, los resultados de este método se corroboraron con pruebas histológicas y la determinación de la concentración de hidroxiprolina en las heridas experimentales. La actividad antiinflamatoria se evaluó por el método de edema plantar por carragenina en rata y el método de migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal en ratón; el efecto analgésico se determinó por el método de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético en ratón; la actividad antioxidante por el método *in vitro* de DPPH; la actividad antibacteriana por los métodos *in vitro* de difusión y dilución en agar; la actividad antifúngica por los métodos *in vitro* de inhibición del crecimiento radial y el de dilución en agar. El aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios con actividad biológica se realizó mediante técnicas cromatográficas de columna, CCF, HPLC-fase reversa, HPLC ESI-trampa de iones, RMN ¹H y RMN ¹³C.

Resultados: Los resultados del efecto cicatrizante de la PM mostraron que el tratamiento del 20 % fue el más efectivo, aunque se observó una cicatriz más estética en los grupos tratados con el 5 y 10 % de la PM. La PM en las heridas mostró una reparación bidireccional y aceleración de los procesos de re-epitelización y formación de tejido de granulación. Las muestras histológicas de los grupos a los que se le administró la PM mostraron una mayor cantidad de fibroblastos y mayor acumulación de fibras en comparación con el Recoverón

(usado como fármaco de referencia) y con el control, lo que demuestra una aceleración del proceso de cicatrización. En los cortes histológicos de las heridas a las que se les aplicó la PM al 5 %, se observó la presencia de células satélite debajo de la dermis, lo que indica regeneración muscular en el tejido. Además, las heridas a las que se les aplicó la PM mostraron mayor concentración de hidroxiprolina, lo que indica mayor cantidad de colágeno y, por tanto, mayor regeneración del tejido. La PM mostró efecto antiinflamatorio mediante la disminución del edema plantar inducido por carragenina y disminución del número de neutrófilos que migran a la cavidad peritoneal mediante un efecto dependiente de la dosis. El mecanismo de acción antiinflamatoria de la PM puede atribuirse a la inhibición de algunos mediadores químicos de la inflamación como las prostaglandinas y los leucotrienos. La PM mostró efecto analgésico mediante disminución del número de contorsiones abdominales en ratón, el efecto fue dependiente de la dosis. La PM y la mayoría de las fracciones de las cromatografías presentaron actividad antioxidante sobre el radical DPPH con una CA_{50} menor que la mostrada por la quercetina (usada como estándar de referencia), lo que sugiere que sus constituyentes pueden estar actuando mediante sinergismo de potenciación. El efecto antioxidante de la PM puede favorecer la cicatrización al disminuir la cantidad de especies reactivas de oxígeno en la herida. La PM y las fracciones obtenidas de ésta poseen actividad antibacteriana y antifúngica, las especies microbianas más susceptibles a la PM fueron *Sarcina lutea* y *Trichophyton mentagrophytes*. El efecto antimicrobiano de la PM se relaciona con la cicatrización, al inhibir el crecimiento de los microorganismos en la herida, previniendo la infección y permitiendo que la reparación del tejido se lleve a cabo de manera adecuada. Los resultados de la caracterización de los metabolitos secundarios mostraron que la PM de *B. morelensis* está constituida por 50 % de compuestos fenólicos cuya naturaleza química corresponde a fenilpropanoides, flavonoides y taninos hidrolizables, esta composición química le confiere a *B. morelensis* su propiedad medicinal como cicatrizante.

Conclusión: Los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento fitoquímico de la especie *B. morelensis*, debido a que los flavonoides y taninos no habían sido reportados previamente en la especie ni en el género. Asimismo, contribuyen al conocimiento etnofarmacológico al corroborar el efecto cicatrizante de *B. morelensis*, con lo que se valida su uso medicinal como cicatrizante.

Abstract

Abstract

Introduction: The *Bursera* genus is widely diversified in America, where more than 100 species exist; Mexico is the center of this diversity, where 85 species are known and 70 of these are endemic.

Bursera morelensis is used by the inhabitants of San Rafael Coxcatlán to wound healing, nevertheless there are not any researches on evaluating this biological activity. In this work it is evaluated the healing activity of the bark of *B. morelensis*, as well as the anti-inflammatory, analgesic, antioxidant and antimicrobial effects, because these assist the cicatrization process. Apart from that, it was carried out the isolation and characterization of the secondary metabolites of *B. morelensis* bark, which produce this biological activity.

Materials and methods: It was obtained the methanolic extract and it was carried out a partition of it by using methanol and hexane. The methanolic partition (MP) was used to make all the biological tests and some of their secondary metabolites were characterized. The healing activity was evaluated by means of the tensiometric method on wounded mice; the results of this method were corroborated by the histological evidence and the determination of the hydroxyproline concentration on the experimental wounds. The anti-inflammatory activity was evaluated by the methods of inhibition of carrageenan induced paw edema in rats and the migration of neutrophils to the peritoneal cavity of mouse; the analgesic effect was determined by the acetic acid-induced abdominal writhing response method; the antioxidant activity by the DPPH method; the antibacterial activity by the diffusion and dilution in agar methods; the antifungal activity by the inhibition of the radial growth and dilution in agar methods. The isolation and characterization of the secondary metabolites with biological activity were carried out by chromatography in column, CCF, reverse HPLC-phase, HPLC ESI-trap of ions, NMR ^1H and NMR ^{13}C .

Results: The results of the wound healing effect of MP proved that the treatment with 20% of MP was the most effective, although the groups treated with the 5% and 10% of it produced a more aesthetic scar. The MP produced a bidirectional repair in wounds and an acceleration in the processes of the re-epithelization and granulation tissue formation. The histological samples of the groups treated with the MP showed a larger quantity of fibroblasts and a larger accumulation of fibers in comparison with Recoveron (used as the reference standard drug) and with the

control group. All this exhibits an acceleration of the cicatrization process. In the histological samples of the wounds in which 5% of MP was applied the presence of satellite cells under the dermis was observed; this indicates acceleration in the process of muscular regeneration. Apart from that, the wounds where MP was applied evidenced a larger concentration of hydroxyproline; this proves a larger quantity of collagen and therefore a larger quantity of tissue regenerated. The MP showed anti-inflammatory effect by the decrease of the edema plantar induced by carrageenan and by a decrease of the number of neutrophils that migrate to peritoneal cavity by means of a dose dependent effect. The mechanism of the anti-inflammatory action of MP can be attributed to the inhibition of arachidonic acid liberation and some chemical mediators of inflammation, such as the prostaglandins and leukotrienes. The MP evidenced analgesic effect by the decrease of the abdominal writhing response in mouse; this effect was dose dependent. The MP and most of the chromatography fractions showed antioxidant activity on the radical DPPH with a smaller SC_{50} in comparison with that of quercetin (used as reference standard). All this suggests that the components of MP can act by the power of synergism. The antioxidant effect of MP can assist cicatrization by diminishing the quantity of reactive oxygen species in the wound. The MP and their chromatography fractions have antibacterial and antifungal activities, the bacteria *Sarcina lutea* and the fungus *Trichophyton mentagrophytes* were the most susceptible species to it. The antimicrobial effect of MP is closely related to healing; it benefits the cicatrization process by inhibiting the growth of microorganisms in the wound and by preventing infection and allowing the process of tissue repair to develop appropriately. The results of the characterization of the secondary metabolites proved that MP of *B. morelensis* is constituted by 50% of phenolic compounds whose chemical nature corresponds to phenylpropanoids, flavonoids and hydrolysable tannins; this chemical composition provides *B. morelensis* with its medicinal properties in healing wounds.

Conclusion: The results contribute to the knowledge of phytochemical nature of *B. morelensis*, because the flavonoids and tannins had not been reported previously neither in the species nor in genus. They also augment to the ethnopharmacological knowledge by corroborating the healing effect of *B. morelensis* bark which supports the traditional use of *B. morelensis* bark in the treatment of acute wounds.

Introducción

Cicatrización de heridas

La curación de heridas es un tema tan antiguo como la historia del ser humano, hace 60 000 años A. C., el hombre de Neanderthal, en Irak, usó hierbas contra las quemaduras y según el papiro de Smith, los apósitos datan desde 5 000 años AC (Andrades *et al.*, 2004). En esa época, el Asu o sanador egipcio aplicaba curaciones compuestas de grasa animal, miel y fibras vegetales; sin saberlo estaba aplicando una curación no adherente, antibacteriana, osmótico enzimática y absorbente de exudado (Ladin, 1998). También se usaban como apósitos el barro, gomas, resinas, miel, mirra y sustancias oleosas. Por otra parte, Hipócrates trataba las heridas con vino, cera de abeja, roble, aceite y azúcar (Andrades *et al.*, 2004). Actualmente en muchas comunidades de todo el mundo se siguen utilizando productos naturales para el tratamiento de heridas, principalmente en las zonas rurales.

Las heridas en la piel son el resultado visible de una lesión o muerte de las células en los tejidos y pueden ser ocasionadas por hipoxia, agentes físicos o químicos, microorganismos, radiación y respuestas inmunes o inflamatorias (David, 1988). Existen dos grandes categorías para la clasificación de las heridas en la piel que corresponde a agudas y crónicas (Andrades *et al.*, 2004; Brunicardi *et al.*, 2006).

Las heridas agudas son aquellas que siguen un proceso de reparación ordenado, dentro de un tiempo adecuado, en el cual se restaura la integridad anatómica y funcional del tejido lesionado (Lazaurus, 1994), estas a su vez se dividen en incisionales y excisionales. Las heridas incisionales consisten en una lesión longitudinal que pueden ser de espesor parcial o total y de longitud variable; las heridas excisionales se caracterizan por una pérdida significativa de tejido, que consiste en la extirpación completa de una parte del tejido (Lazaurus, 1994).

Por otra parte, las heridas crónicas son aquellas que no siguen un proceso de reparación ordenado o que dicho proceso no restaura la integridad anatómica y funcional del tejido lesionado (Lazaurus, 1994). Casi todas las heridas que no han

cicatrizado en tres meses se consideran crónicas (Brunicardi et al., 2006) y se caracterizan porque se han detenido en la fase inflamatoria debido a un desbalance entre los factores de crecimiento y las proteasas. Esta alteración es el resultado de la presencia exagerada de citocinas proinflamatorias, la disminución de los factores de crecimiento, la alteración en el depósito de colágeno y de matriz, la alteración de la proliferación celular y de la síntesis proteica, así como un aumento de la apoptosis. En los tejidos que rodean a las heridas crónicas los fibroblastos son seniles e insensibles a citocinas y factores de crecimiento (Bermúdez et al., 2008).

Las heridas en la piel también pueden clasificarse según la profundidad, en cuyo caso se dividen en superficiales, de espesor parcial y de espesor total. Las heridas superficiales son producidas generalmente por fricción, en ellas solo se encuentra afectada la epidermis y la reparación del tejido ocurre sin dejar una cicatriz. Las heridas de espesor parcial son aquellas en donde se afecta la epidermis y la dermis papilar, los anexos cutáneos no son afectados y, al ser reparadas, dejan una cicatriz ya que la lesión involucra la capa basal, un ejemplo son las quemaduras superficiales. Finalmente, las heridas de espesor total se encuentran involucradas todas las capas de la piel (epidermis, dermis e hipodermis) y los anexos cutáneos; algunas veces también comprometen tejidos más profundos como músculo, tendón, cápsula articular y hueso; en este tipo de heridas la reparación siempre deja una cicatriz (Bermúdez et al., 2008), la cual es una masa de colágeno que se produce cuando no es posible reparar la necrosis de las células parenquimatosas por regeneración (Chandrasoma y Taylor, 1998).

Proceso de cicatrización

El proceso de cicatrización de las heridas es complejo y comprende varias etapas. Generalmente inicia con la formación de un coágulo (hemostasis), posteriormente ocurren las fases de inflamación, proliferación y remodelación (Werner y Grose, 2003).

a) Hemostasis

La hemostasis ocurre durante las primeras dos horas posteriores a la lesión y consiste en la formación de un coágulo mediante la extravasación de plasma, células sanguíneas y otros factores hacia el sitio lesionado (Bermúdez et al., 2008). Las plaquetas entran al área de la herida, se agregan y liberan mediadores químicos que inician la cascada de coagulación, así como factores de crecimiento y citocinas involucrados en la quimiotaxis de las células inmunes e inflamatorias (Wilgus, 2008).

En esta etapa, las plaquetas son activadas por la trombina que es generada localmente y el colágeno fibrilar es expuesto. Como resultado de esta activación se produce la degranulación plaquetaria, que consiste en la liberación de numerosos mediadores que intervienen en la agregación plaquetaria. La activación de la cascada de coagulación lleva a la conversión del fibrinógeno en fibrina y a su polimerización a gel, transformándose en una matriz provisional para la migración de células inflamatorias (Rendic y Aldea, 2008).

b) Inflamación

La fase inflamatoria se caracteriza por la llegada de los neutrófilos al sitio de la lesión (Bermúdez et al., 2008) y son las primeras células que se infiltran en la matriz de fibrina, lo cual ocurre en las primeras horas de ocurrida la lesión (Rendic y Aldea, 2008). Estas células son las responsables de destruir cualquier microorganismo invasor en el sitio de la lesión (Wilgus, 2008). La migración de los neutrófilos es estimulada por el incremento de la permeabilidad vascular, la liberación local de prostaglandinas y la presencia de sustancias quimiotácticas como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), la calicreína, los fibrinopéptidos, factores del complemento, interleucina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Brunicardi et al., 2005; Bermúdez et al., 2008).

La histamina y las prostaglandinas E₁ y E₂, sintetizadas por los leucocitos, provocan vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, al crear

pequeñas aberturas entre las células endoteliales, lo cual permite el escape de plasma y leucocitos que migran hacia los espacios intersticiales, facilitando la dilución de los contaminantes y generando el edema. Una vez que los neutrófilos salen al intersticio, ocurren las interacciones célula-célula y célula-matriz, favorecidas por las integrinas o receptores de superficie de los neutrófilos. Así los neutrófilos inician la fagocitosis y la destrucción de bacterias y desechos tisulares por medio de la liberación de enzimas como: hidrolasas, proteasas, colagenasas y lisozimas, y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Finalmente, los neutrófilos quedan atrapados en el coágulo y se disecan con él, los que permanecen en tejido viable mueren por apoptosis y posteriormente también son removidos por los macrófagos (Brunicardi et al., 2005; Bermúdez et al., 2008; Rendic y Aldea, 2008).

Dos o 3 días después de la lesión, se produce un acumulo de macrófagos que reemplazan a los neutrófilos. La migración de los macrófagos es estimulada por factores quimiotácticos, algunos compartidos con los neutrófilos y otros específicos, los últimos incluyen fragmentos de colágeno, elastina, fibronectina, trombina enzimáticamente activa, factor de crecimiento transformante beta (TGF β 1), calicreína y productos de degradación de la matriz. Los macrófagos permanecen en el tejido lesionado hasta que la cicatrización de la herida termina. Los macrófagos se unen a proteínas de la matriz extracelular (MEC) mediante receptores de integrinas, promoviendo la fagocitosis (Brunicardi et al., 2005; Bermúdez et al., 2008) por la vía de mediadores, como citocinas y factores de crecimiento. Las endotoxinas bacterianas estimulan la liberación de IL-1 de los macrófagos, que a su vez estimula la liberación de interleucina 8 (IL-8) que atraerá más macrófagos (Brunicardi et al., 2005; Bermúdez et al., 2008).

Los macrófagos también pueden incorporar y activar a otras células de forma directa, mediante la interacción entre célula y célula; así como moléculas de adhesión intercelular (MAIC), de esta manera regulan la proliferación celular, la síntesis de la MEC y la angiogénesis por la liberación de mediadores como el TGF- β , el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de

crecimiento similar a insulina (IGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y lactato (Brunicardi et al., 2005; Bermúdez et al., 2008).

Los linfocitos T constituyen otra población de células inflamatorias inmunitarias que migran hacia el sitio lesionado, estos aparecen entre el quinto y séptimo día después de la lesión (Rendic y Aldea, 2008). Los linfocitos T son un puente en la transición de la fase inflamatoria a la fase proliferativa de la cicatrización, éstas células liberan factores inhibidores de la migración de macrófagos y factores activadores de macrófagos (Canal et al., 2007), también ejercen un efecto en la disminución de la síntesis de colágeno por los fibroblastos, mediante el interferón gamma (IFN- γ), el TNF- α y la IL-1 (Brunicardi et al., 2005).

c) Proliferación

La fase proliferativa de la cicatrización abarca de los días 4 a 12 posteriores a la lesión, durante esta etapa la continuidad del tejido se restablece. Consta de los siguientes procesos: fibroplasia, angiogénesis, reepitelización, y contracción de la herida (Brunicardi et al., 2005; Bermúdez et al., 2008).

El proceso de fibroplasia ocurre durante el segundo y tercer día después de la lesión. Se caracteriza por la llegada de los fibroblastos al sitio de la herida (Bermúdez et al., 2008). Los fibroblastos migran utilizando la red de fibrina, la que será gradualmente reemplazada por el tejido de granulación formado por colágeno tipo III, que a su vez será sustituido por colágeno tipo I en la etapa de remodelación (Rendic y Aldea, 2008).

Los fibroblastos constituyen las células más importantes en la producción de la matriz dérmica. Una vez en el sitio de la lesión, migran con movimientos activos sobre una matriz laxa de fibronectina, para ello el PDGF hace que expresen receptores de integrina $\alpha 1$ y $\alpha 5$, posibilitando la migración e interacción con los demás factores de crecimiento. La matriz de fibronectina proporciona un molde para las fibrillas de colágeno e interviene en la contracción de la herida (Brunicardi et al., 2005; Bermúdez et al., 2008).

A medida que migran, los fibroblastos van depositando una nueva matriz provisional de fibronectina y ácido hialurónico. Desde el tercero al quinto día son estimulados por citocinas y factores de crecimiento para comenzar a sintetizar la matriz de colágeno (tipos I, III y VI), una vez que se depositó una suficiente cantidad, cesa la producción, debido a que el interferon gamma (INF- γ) y la misma matriz inhiben su proliferación y la síntesis de colágeno (Brunicardi et al., 2005; Bermúdez et al., 2008).

La angiogénesis se inicia simultáneamente con la fibroplasia (Bermúdez et al., 2008), en el proceso participan fibroblastos, células endoteliales y macrófagos con sus factores de crecimiento. Este tejido ofrece una superficie húmeda y deslizante fundamental para la migración celular (Rendic y Aldea, 2008). Los vasos adyacentes a la herida emiten yemas capilares, en cuyo extremo se encuentran las células endoteliales que, al segundo día de iniciado el proceso de cicatrización, experimentan un cambio fenotípico que les permite proyectar pseudópodos a través de las membranas basales fragmentadas y migrar al espacio perivascular (Bermúdez et al., 2008). A medida que las células endoteliales migran hacia el intersticio forman brotes capilares que se dividen en sus extremos y luego se unen formando asas que darán origen a los plexos capilares (Bermúdez et al., 2008).

La reepitelización inicia en el transcurso de un día de la lesión, en este proceso se intenta restaurar la continuidad de la piel y restablecer su función como barrera protectora (Canal et al., 2007). Durante esta etapa se observa un engrosamiento de la epidermis en el borde de la herida e involucra la proliferación de los queratinocitos y la migración de estos para reparar la barrera epidérmica. Los queratinocitos basales cercanos al borde de la lesión experimentan divisiones mitóticas rápidas y migran uno sobre otro en forma de saltos hasta recubrir la herida. Posteriormente las células en migración pierden su aspecto aplanado, adquieren una forma más cilíndrica e incrementan su actividad mitótica. Las capas del epitelio se restablecen y al final la capa superior se queratiniza (Brunicardi et al., 2005).

El proceso de contracción de la herida es el último paso de la fase proliferativa. Tras la serie de cambios fenotípicos de los fibroblastos estos adoptan el fenotipo de miofibroblastos que es rico en microfilamentos de actina en el lado citoplasmático de la membrana y establece uniones célula-célula (adherentes) y uniones con la MEC a través de receptores integrínicos. El colágeno neoformado se une a través de enlaces covalentes cruzados con haces del borde de la herida y con haces de la dermis adyacente. Estas uniones crean una red a través de la herida y así, la tracción que realizan los fibroblastos a la matriz pericelular, se puede transmitir dando como resultado una contracción coordinada (Bermúdez et al., 2008).

d) Remodelación

La fase de remodelación comienza al mismo tiempo que la fibroplasia y continúa por meses, se caracteriza por una reorganización del colágeno previamente sintetizado. Los fibroblastos son las células activas en este proceso: producen fibronectina, ácido hialurónico, proteoglicanos y colágeno y sirven como base para la migración celular y soporte tisular. Con el tiempo la fibronectina y el ácido hialurónico van desapareciendo por acción de las proteasas y hialuronidasas respectivamente. Al cabo de 1 año o más, el colágeno tipo III que se depositó durante la reparación es reemplazado por el de tipo I, con un fenotipo más estable y similar al que tenía la dermis originalmente (Brunicardi et al., 2005; Bermúdez et al., 2008).

El contenido neto de colágeno de la herida es el resultado de un equilibrio entre colagenólisis y la síntesis de colágeno, procesos que están controlados de modo estricto por citocinas y factores de crecimiento. Este equilibrio entre el depósito y la degradación de colágeno es el determinante final de la fuerza y la integridad de la herida, mediante el restablecimiento de la MEC compuesta de una cicatriz rica en colágeno (Brunicardi et al., 2005; Bermúdez et al., 2008).

Al final del proceso la cicatriz adquiere una resistencia máxima del 70%, comparada con el tejido sano, la actividad celular disminuye y el tejido conjuntivo cicatrizal se torna rico en colágeno, pobre en células y vasos, sin folículos pilosos

y sin glándulas sudoríparas ni sebáceas. La dermis recupera la composición previa a la lesión y la reparación de la herida se considera finalizada (Brunicardi et al., 2005; Bermúdez et al., 2008).

Productos utilizados en la cicatrización de heridas

Existen productos de uso común con propiedades cicatrizantes, tal es el caso del azúcar granulada (sacarosa) y la miel, que se han usado desde antes de la era cristiana para la cicatrización de heridas (González et al., 2004).

Las propiedades cicatrizantes de la sacarosa se deben a que favorece un medio con bajo contenido de agua y alta osmolaridad propiciando que el plasma y la linfa migren fuera del tejido, causando una disminución de nutrimentos hacia él y la inhibición del crecimiento bacteriano. La sacarosa en la herida atrae a los macrófagos, que fagocitan el tejido necrótico o gangrenoso; además, proporciona una fuente de energía local y forma una capa protectora (González et al., 2004).

Por otra parte, la miel favorece la cicatrización por la acción que ejerce sobre la división celular, la síntesis y la maduración del colágeno, así como la contracción y la epitelización de la herida (González et al., 2004).

La miel posee compuestos antioxidantes que protegen el tejido de radicales libres, además posee propiedades antiinflamatorias, que disminuyen el edema, el exudado y el dolor local en el sitio lesionado. Asimismo, su acidez (por debajo de pH 4) beneficia la acción fagocítica de los macrófagos, ya que un pH ácido dentro de la vacuola se relaciona con la lisis bacteriana y reduce la formación de amonio tóxico, de esta manera la acidificación coadyuva a la cicatrización (González et al., 2004).

Para acelerar la cicatrización de heridas se han utilizado múltiples plantas y compuestos que se obtienen de ellas, algunos ejemplos son: *Agrimonia eupatoria* L., *Actium lappa* Burdock, *Capsella bursa-pastoris* L., *Cupressus sempervires* L., *Equisetum arvense* L., *Citrus limonum* Risso y *Malva sylvestris* L. Otras plantas muy utilizadas para este mismo fin son: *Calendula officinalis* L. (caléndula) y

Uncaria guianensis Aubl. (uña de gato), *Hidrocotyle asiatica* L. (centella asiática), *Aloe vera* L. y *A. barbadensis* Miller (sábila). Las dos últimas especies se utilizan para tratar numerosas enfermedades, principalmente de la piel, tales como la psoriasis, diversas dermatitis, excoriaciones, heridas de diferente gravedad y quemaduras, entre otras (González *et al.*, 2004).

En trabajos realizados para evaluar la actividad cicatrizante de algunas especies vegetales, se ha mencionado que los compuestos fenólicos (flavonoides y taninos), alcaloides y triterpenoides poseen propiedades cicatrizantes (Guillermo *et al.*, 2005). Asimismo, se ha reportado la actividad cicatrizante del alcaloide taspina, aislado de *Croton lechleri* M. (“Sangre de Drago”) (Milla, 1985; Risco *et al.*, 2005) y del lignano 3'-4-O-dimetilcedrusina, este último estimula la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno en el proceso de cicatrización (Pieters, 1992 y 1993).

Otros metabolitos secundarios, como las proantocianidinas y los lignanos tipo diterpeno, tienen la propiedad de potenciar el efecto cicatrizante, cuando son combinados con el alcaloide taspina de *Croton lechleri* (Cai *et al.*, 1991, 1993; Pieters *et al.*, 1993).

El proceso de cicatrización, al ser tan complejo, puede alterarse por factores o procesos que se desencadenan durante la reparación, tales como la presencia de radicales libres o por infección microbiana (Houghton *et al.*, 2005). Es por ello que un compuesto cicatrizante ideal debe, además de acelerar la reparación del tejido, controlar el proceso inflamatorio sin inhibirlo, además de mantener una estabilidad en la producción de radicales libres; es decir, tener efecto antioxidante y poseer la capacidad de eliminar a los microorganismos que pudieran infectar la herida, propiedades que en conjunto favorecen el proceso de cicatrización.

Las plantas medicinales en San Rafael Coxcatlán (SRC)

Existen cerca de 3 000 especies de plantas medicinales usadas en México para el tratamiento de diversos padecimientos (Linares *et al.*, 1999) y una zona que se caracteriza por poseer una gran diversidad de especies, entre ellas las de uso medicinal es la reserva de la biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, por lo cual es una zona de gran importancia florística; se caracteriza por ser la más seca del sur de México y se encuentra aislada del resto de las áreas de tierras áridas del norte y centro del país. Posee 10 000 Km² de superficie; destaca por su flora rica en endemismos y formas biológicas espectaculares. En la reserva se han reportado 2 700 especies de plantas vasculares, las cuales probablemente constituyen la mayor diversidad biológica de las zonas áridas de Norte América (Casas *et al.*, 2001).

Dentro de la reserva de la biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, se encuentra la localidad de San Rafael Coxcatlán (SRC) en el Estado de Puebla (figura 1), la cual se ubica al sureste del Valle de Tehuacán, a 18° 12' y 18° 14' latitud norte y 97° 07' y 97° 09' longitud oeste, a 1 217 m.s.n.m. (INEGI, 1991). La altitud promedio es de 1 000 m.s.n.m. (Valiente, 1991). Su clima es semiárido a árido, la temperatura media anual es de 22 °C, variando entre 25 °C en abril y mayo y 18 °C en enero, con lluvias en verano, desde junio hasta septiembre (Medina, 2000). La precipitación media anual es de 450.7 mm (García, 1981).

El tipo de vegetación con la que cuenta esta reserva es matorral espinoso con especies como *Bursera morelensis* Ramírez, *Bursera aptera* Ramírez, *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeb, *Opuntia puberula* Pfeiffer, *Ceiba parvifolia* Rose y *Acacia cochliacantha* Humb. & Bonpl. ex Willd (Rzedowski, 1978; Fernández, 1999; Casas *et al.*, 2001).

En SRC se encuentran rocas sedimentarias, principalmente arenisca y conglomerado (INEGI, 1984). Los suelos en la región están pobremente desarrollados; se encuentran principalmente regosoles (calcáreos y éutricos) y xerosoles (háplicos) (Blanckaert *et al.*, 2004).

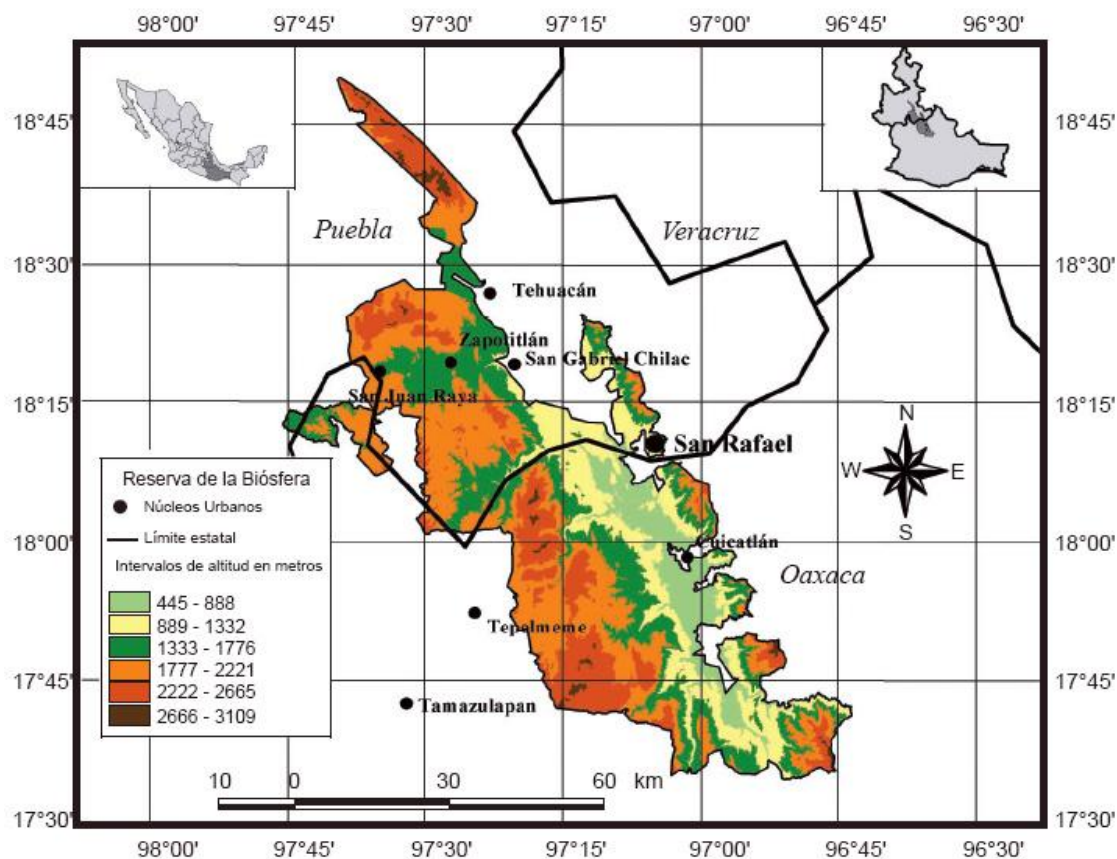


Figura 1. Ubicación geográfica de San Rafael Coxcatlán, con referencia a la Reserva de la Biósfera Valle de Tehuacán Cuicatlán (Tomado de Canales et al., 2006)

La localidad de SRC es objeto de una línea de investigación etnobotánica regional, que pretende conocer la condición actual de los recursos naturales, así como el proceso de cultivo, manipulación y domesticación de plantas, encaminada a proveer herramientas de manejo para el uso y preservación de los recursos naturales dentro de la reserva de la biosfera (Lira, 2001).

En la comunidad de SRC se ha realizado un trabajo sobre la flora útil, en donde se han registrado 374 especies de plantas divididas en 249 géneros y 87 familias. De las especies registradas, 368 son utilizadas por los habitantes (Rosas, 2003), muchas de ellas como medicinales. Canales *et al.*, (2005) registraron un total de 46 especies de uso medicinal en la zona, donde se incluyen especies del género *Bursera*, que son utilizadas por los habitantes para curar heridas y como cicatrizantes, tal es el caso de la especie *Bursera morelensis*, que se conoce comúnmente en la localidad como “aceitillo” (Rzedowski, 2004).

Género Bursera

El género *Bursera* se encuentra ampliamente diversificado en el Continente Americano, donde existen más de 100 especies que se distribuyen desde los extremos suroeste y sureste de los Estados Unidos hasta el norte de Perú y de Brasil, incluyendo las Antillas y las Galápagos. México es su centro de diversidad, donde se conocen 85 especies (Rzedowski *et al.*, 2004), 70 de las cuales son endémicas (Rzedowski y Kruse, 1979).

Las especies del género *Bursera* generalmente son árboles, aunque también hay algunas que son arbustos, y constituyen un elemento característico y dominante o codominante de los bosques tropicales caducifolios de México. Habitan en altitudes entre 0 y 1 800 m.s.n.m y varias especies prosperan en matorrales xerófilos; algunas llegan a ascender a elevaciones cercanas a 2 400 m.s.n.m., penetrando, en ocasiones, en áreas transicionales con bosques de encino y de coníferas. Dadas estas afinidades ecológicas, la mayor diversidad de las especies mexicanas de *Bursera* se establece en la vertiente pacífica de la República, con su máxima concentración en la cuenca del río Balsas (Rzedowski y Kruse, 1979).

***Bursera morelensis* Ramírez**

a) Descripción botánica

La especie *B. morelensis* es un árbol dioico, de 3 a 10 m de alto, con abundante resina aceitosa y aromática. El tronco mide hasta 40 cm de diámetro, con corteza exfoliante rojiza en láminas delgadas (figura 2); las ramas jóvenes y maduras son glabras y poseen catafilos inconspicuos, pronto deciduos; las hojas son imparipinnadas, de 5 a 11 cm de largo y 1.5 a 4.5 cm de ancho, con peciolo acanalado, de 1 a 2 cm de largo, raquis inconspicuamente alado, foliolos sésiles o subsésiles, linear-oblongos a linear-lanceolados, de 7 a 22 mm de largo y 1.4 a 2.5 mm de ancho, ápice agudo, base aguda a cuneada, margen entero, nervadura central evidente, las nervaduras secundarias son inconspicuas. Las flores masculinas se encuentran dispuestas en inflorescencias racimosas o paniculadas, de hasta 5 cm de largo, con bracteolas filiformes a subuladas, deciduas, las flores

son generalmente pentámeras o con menos frecuencia trímeras o tetrámeras, el cáliz posee lóbulos angostamente triangulares, de 0.7 a 2.3 mm de largo, ápice agudo, glabro. Los pétalos son amarillentos, verdosos o blanquecinos, de 3 a 6 mm de largo, oblongos a lanceolados, cuculados, 10 estambres, anteras oblongas, de 1.5 a 2 mm de largo. Las flores femeninas usualmente se encuentran solitarias, rara vez en pares o en panículas cortas, por lo general son trímeras, menos frecuentemente tetrámeras o pentámeras, son semejantes en forma y tamaño a las masculinas, las anteras de los estaminodios de 1 a 1.5 mm de largo, ovario trilocular, 3 estigmas; pedúnculos en el fruto marcadamente engrosados, encorvados y glabros, de 1.3 a 2.2 cm de largo, fruto trivalvado, oblicuamente ovoide, de 5 a 8 mm de largo y de 4 a 6 mm de ancho, ligeramente apiculado, glabro, el hueso está recubierto totalmente por un pseudoarilo amarillo pálido (figura 3) (Rzedowski *et al.*, 2004).



Figura 2. Corteza de *Bursera morelensis*

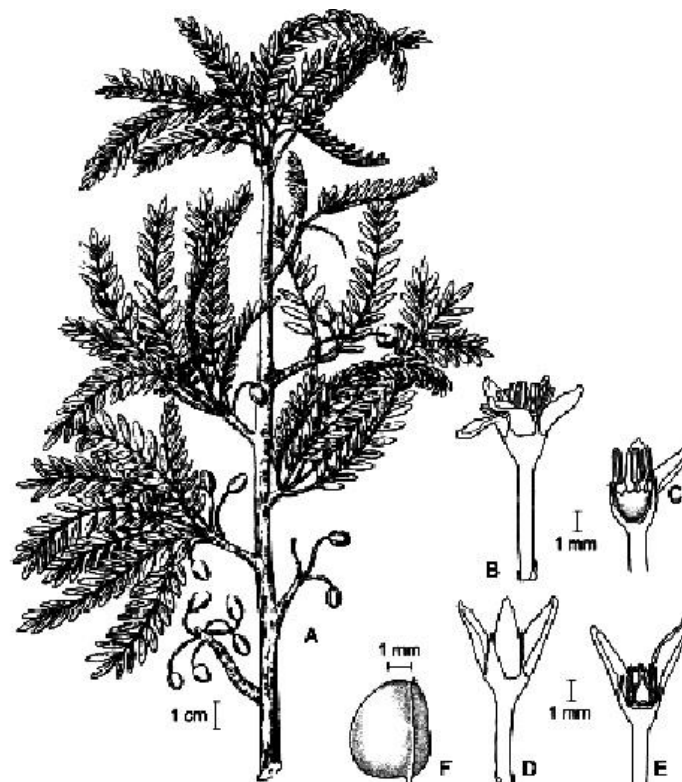


Figura 3. *Bursera morelensis* Ramírez. A. rama con hojas y frutos; B. flor masculina; C. flor masculina desprovista de 2 pétalos y de 5 estambres; D. flor femenina en vista externa; E. flor femenina desprovista de un pétalo y de varios estaminodios; F. hueso. (Tomado de Rzedowski *et al.*, 2004).

b) Datos etnobotánicos

B. morelensis es conocida comúnmente como: “cuajote”, “palo colorado”, “palo mulato”, “xixote” y “aceitillo”. En San Rafael Coxcatlán se usa para combatir infecciones causadas por hongos y bacterias en la piel, en cuyo caso se utiliza la resina untada directamente sobre el área afectada. También se utiliza la corteza para la curación de heridas; la forma de uso es macerada en alcohol o en infusión las cuales se colocan en forma de compresas sobre las lesiones.

En todos los casos su aplicación o vía de administración es local y el tiempo de administración varía, dependiendo del tipo de herida y la profundidad de la misma. Generalmente se suspende su aplicación hasta observar los efectos deseados.

c) Información taxonómica

Reino Plantae

Phylum Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Orden Sapindales

Familia Burseraceae

Género Bursera

Especie *B. morelensis*

d) Hábitat

B. morelensis es una especie muy vistosa, debido a su corteza de color rojizo intenso. Permanece sin hojas entre noviembre y mayo, con frecuencia es una especie dominante en el bosque tropical caducifolio y se encuentra sobre diferentes tipos de sustrato, en altitudes entre 500 y 1 500 m.s.n.m. (Rzedowski *et al.*, 2004).

e) Distribución

B. morelensis es muy abundante en muchos parajes de la porción oriental de la cuenca del Balsas, sobre todo en los estados de Guerrero, Morelos y Puebla. En Oaxaca se extiende también hacia las cuencas de los ríos Tehuantepec y Papaloapan, y además prospera en forma dispersa en los cañones labrados por los afluentes del río Pánuco en San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro e Hidalgo (Rzedowski *et al.*, 2004).

Antecedentes de estudios sobre el género *Bursera* y *B. morelensis*

El género *Bursera* ha sido ampliamente estudiado en cuanto a su composición química y sus propiedades biológicas. Rzedowski *et al.*, (2004) mencionaron que todas las especies del género *Bursera* producen aceite esencial lo que proporciona a las plantas una gran variedad de aromas que permiten en el campo reconocer las especies que conviven en una localidad determinada. El aceite esencial está principalmente constituido por terpenos los cuales sirven a las plantas como mecanismo de defensa contra herbívoros (Becerra *et al.*, 2001). Sin embargo, la presencia y cantidad de los diferentes terpenos que forman parte de los aromas, varían entre las poblaciones de la misma especie, a este respecto Zúñiga *et al.*, (2005) realizaron un análisis por GC-EM para identificar los principales constituyentes de varias especies del género *Bursera* y encontraron monoterpenos, principalmente el α -terpineol, el terpinen-4-ol, α -tujeno, el linalol y el limoneno que se encuentran con mayor frecuencia y en mayor abundancia. Estos autores, también señalaron la presencia de sesquiterpenos e hidrocarburos.

Por otra parte, Noge *et al.*, (2011) reportaron monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y alcanos en las hojas de *Bursera velutina* Bullock, de los cuales el 2-feniletanol fue uno de los constituyentes volátiles más abundantes.

En relación a la actividad biológica de los constituyentes del género *Bursera*, Zúñiga *et al.*, (2005) reportaron actividad antiinflamatoria de algunos componentes volátiles. En el trabajo de Becerra (2003) se menciona que los terpenos producidos por las especies del género se encuentran en la resina y sirven a las especies como repelentes contra insectos, siendo tóxicos para ellos. Por otra parte, Queiroga *et al.*, (2007) reportaron que el linalool, obtenido de las hojas de *Bursera aloexylon*, posee actividad antimicrobiana, al inhibir el crecimiento de *Rhodococcus equi* y *Staphylococcus epidermidis*.

Otros metabolitos secundarios en el género son los lignanos, cuya propiedad biológica principal es la de actuar como antitumorales (cuadro 1).

Además de lo mencionado, también existen estudios en los que se ha evaluado la actividad biológica de los extractos crudos de especies del género

Bursera, de los cuales se han reportado efectos antimicrobiano y antitumoral, principalmente (cuadro 2).

En cuanto a la especie *B. morelensis*, que es el objeto de estudio de este trabajo, al igual que para otras especies del género se ha reportado la presencia de metabolitos secundarios como los lignanos, tal es el caso de Jolad *et al.*, (2006) quienes aislaron dos lignanos con actividad citotóxica, estos corresponden a la desoxipodofilotoxina y la 5'-desmetoxidesoxipodofilotoxina. Uno de estos metabolitos lo describieron como nuevo componente en la especie, al que denominaron morelensina y corresponde a la 5'-desmetoxidesoxipodofilotoxina.

Cuadro 1. Metabolitos secundarios con efecto citotóxico y antitumoral de algunas especies del género *Bursera*.

Especie	Metabolito (s) aislado (s)	Actividad biológica	Referencia
<i>B. ariensis</i>	- Bilignano: ariensina.	Citotóxica	Hernández <i>et al.</i> , 1983.
<i>B. fagaroides</i>	- Podofilotoxinas tipo lignano.	Citotóxica	Rojas <i>et al.</i> , 2012
<i>B. klugii</i>	- 2 lignanos: sapelinas A y B.	Citotóxica	Jolad <i>et al.</i> , 1977.
<i>B. microphylla</i>	- Desoxipodofilotoxina. - β -Sitosterol (no activo).	Antitumoral	Bianchi <i>et al.</i> , 1968.
	- Lignano: lignan, 3-(3,4-metilenodioxibenzil)-4-(3'',4'',5-trimethoxibenzil) tetrahidrofurano (burseran).	Antitumoral	Cole <i>et al.</i> , 1968.
<i>B. permollis</i>	- Desoxipodofilotoxina. - β -peltatin metil éter. - Picro- β -metil éter peltanina. - Dehidro- β -peltatin metil eter. - Nemosina (no activo).	Citotóxica	Wickramaratne <i>et al.</i> , 1995.
<i>B. simaruba</i>	- Picropoligamaina.	Antitumoral	Sergio y Luis, 1992.
<i>B. tonkinensis</i>	- 4'-demethyldeoxyodofolotoxina.	Citotóxica	Jutiviboonsuk <i>et al.</i> , 2005.

Cuadro 2. Actividad biológica de los extractos crudos de algunas especies del género *Bursera*.

Especie	Extracto	Parte de la planta	Actividad biológica	Referencia
<i>B. arida</i>	Hexánico	Aérea	Antibacteriana, sobre <i>Staphylococcus aureus</i> .	Canales et al., 2005
<i>B. copallifera</i>	Hexánico, acetato de etilo y metanólico	Hojas	Insecticida, sobre larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> .	Cárdenas et al., 2012
<i>B. fagaroides</i>	Hidroalcohólico	Hojas	Antitumoral.	Reynoso et al., 2008
	Etanólico	Corteza	Amebicida, sobre <i>Entamoeba histolytica</i> .	Rosas et al., 2008
	Hidroalcohólico	Corteza	Citotóxica.	Rojas et al., 2012
	Etanólico	Corteza	Aglutinante e inmovilizante sobre espermatozoides humanos.	Huacuja et al., 1990
<i>B. graveolens</i>	Hidroalcohólico	Aérea	Antiinflamatoria.	Manzano et al., 2009
<i>B. lacifolia</i>	Hexánico, acetato de etilo y metanólico	Hojas	Insecticida sobre larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> .	Cárdenas et al., 2012
<i>B. lunanii</i>	Aceites esenciales	Frutos y tallos Frutos	Antibacteriana sobre <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i> .	Junor et al., 2007
<i>B. simaruba</i>	Etanólico	Corteza	Antibacteriana sobre <i>Bacillus subtilis</i> , <i>S. aureus</i> y <i>Micrococcus luteus</i> .	Rojas y Rodríguez, 2008
	Aceites esenciales	Frutos y tallos Frutos	Antibacteriana sobre <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i> .	Junor et al., 2007
<i>B. tomentosa</i>	Éter de petróleo y metanólico	Corteza, hojas y flores	Citotóxica.	Robles et al., 2010

Debido a la importancia que las especies del género *Bursera* tienen para México, al ser endémicas, y considerando que algunas de ellas son utilizadas como medicinales en algunas regiones de México, resulta necesario avalar científicamente su uso medicinal, como es el caso de *B. morelensis*, la cual se utiliza en la localidad de San Rafael Coxcatlán para curar lesiones de la piel; sin embargo, aún no se tienen trabajos reportados dirigidos a corroborar este efecto.

Hipótesis

Si la corteza de la especie *B. morelensis* es utilizada por los habitantes de SRC para aliviar lesiones de la piel, entonces la corteza de esta especie posee compuestos químicos con propiedades cicatrizantes, efecto que se favorece además, por la acción antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana de tales compuestos químicos.

Objetivos

Objetivo general

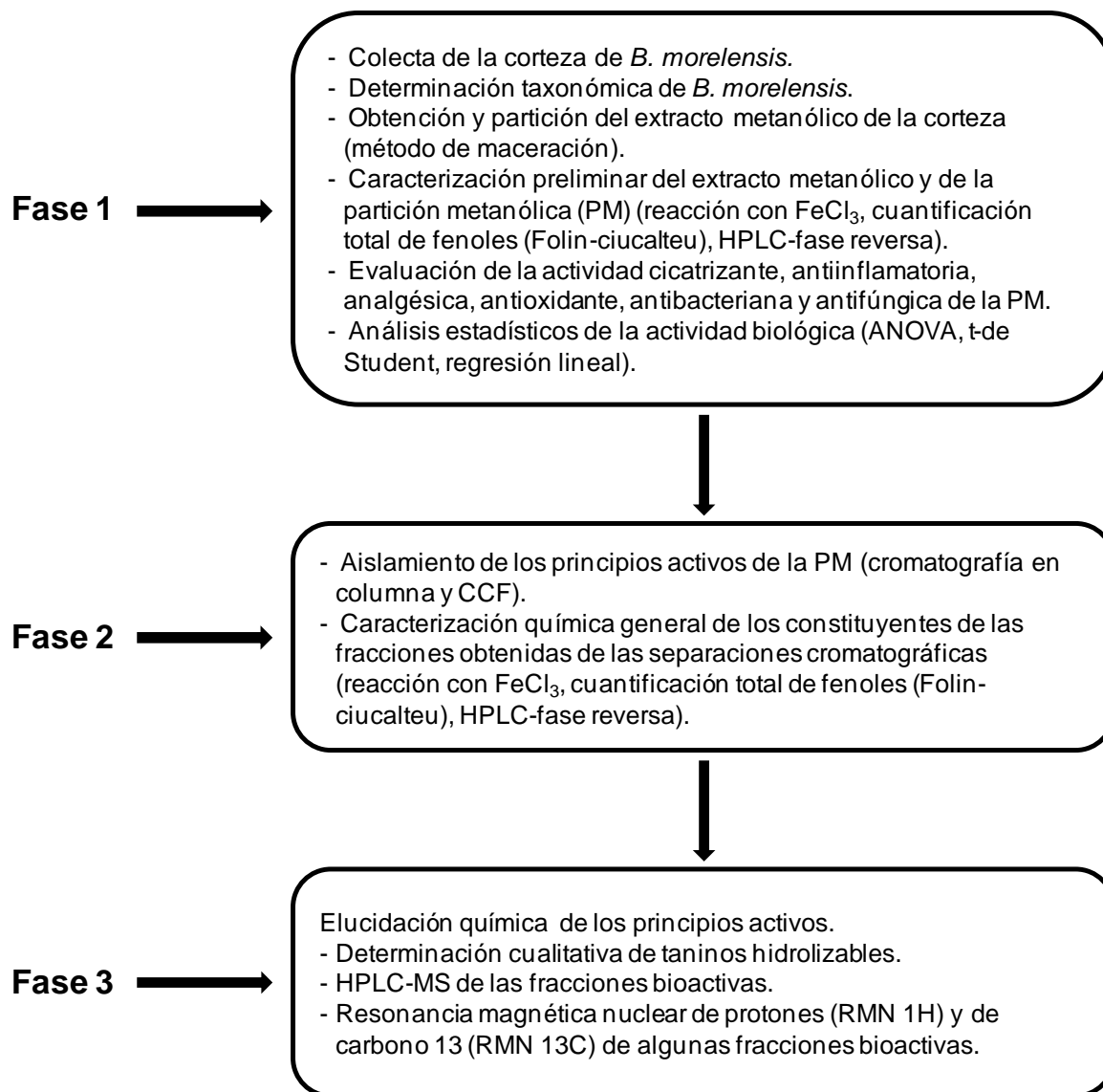
- Evaluar el efecto cicatrizante, antiinflamatorio, analgésico, antioxidante y antimicrobiano de la fracción metanólica y de algunos compuestos químicos de la corteza de *B. morelensis* de San Rafael, Coxcatlán, Puebla.

Objetivos particulares

- Obtener el extracto metanólico (M) de la corteza de *B. morelensis*.
- Realizar la partición del extracto metanólico con metanol y hexano para obtener las fracciones correspondientes: metanol (PM: partición metanólica) y hexano (PH: partición hexánica).
- Evaluar la actividad cicatrizante, antiinflamatoria, analgésica, antioxidante y antimicrobiana de la PM.
- Aislar los compuestos químicos bioactivos de la PM.
- Evaluar la actividad cicatrizante, antioxidante y antimicrobiana de los compuestos químicos aislados.
- Caracterizar químicamente los metabolitos bioactivos.

Material y métodos

Para lograr los objetivos mencionados este trabajo se dividió en tres fases, las cuales se muestran en el siguiente diagrama.



Fase 1. Colecta de la corteza, obtención del extracto metanólico, de la partición metanólica (PM), caracterización química general de la PM y evaluación de la actividad biológica de la PM.

1.1. Estudio fitoquímico

a) Material vegetal y extractos

Para el estudio fitoquímico, la corteza de *B. morelensis* se colectó en el mes de agosto de 2007, en SRC, las muestras se tomaron de diferentes individuos con la finalidad de no alterar de manera importante su fisiología. La determinación taxonómica de la planta la realizó el Dr. Oswaldo Téllez Valdés, del Laboratorio de Recursos Naturales de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FES Iztacala, UNAM. Asimismo, se depositó un ejemplar en el herbario IZTA de la misma Facultad, donde se le asignó el número de registro IZTA 42123.

Se obtuvo el extracto metanólico, a partir de 646.4 g de corteza seca y fragmentada, para ello se utilizó el método de maceración (apéndice I) (Domínguez, 1973).

Una vez obtenido el extracto, se efectuó un fraccionamiento preliminar para obtener los constituyentes más polares. Para tal fraccionamiento, el extracto se disolvió en 500 mL de metanol y el mismo volumen de hexano. La mezcla se colocó en un embudo de separación y se obtuvieron dos fases, correspondientes a la de metanol y a la de hexano. El exceso de solvente se destiló a presión reducida para obtener la fracción soluble en metanol (polar) y la soluble en hexano (no polar). Las fracciones resultantes se denominaron como se indica a continuación:

- Extracto metanólico crudo: **M**
- Fracción soluble en metanol: **PM**
- Fracción soluble en hexano: **PH**

Las fracciones se almacenaron en la oscuridad a 4 °C, hasta su utilización para las pruebas biológicas.

b) Caracterización preliminar del extracto metanólico (M) y de la partición metanólica (PM) de la corteza de *B. morelensis*

La caracterización química preliminar de los constituyentes del extracto metanólico y de la PM se realizó de la siguiente forma: primero se llevó a cabo un análisis cualitativo para detectar la presencia de compuestos fenólicos en las muestras mediante la reacción con cloruro férrico (Dey y Harbone, 1989).

Posteriormente se realizó la cuantificación total de fenoles, para ello se efectuó una reacción colorimétrica de óxido-reducción. Como agente oxidante se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu (apéndice II) (Singleton y Rossi, 1965) y ácido gálico como estándar de referencia. Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco y se reportaron en porcentaje.

Finalmente, se efectuó el análisis de las muestras mediante perfiles cromatográficos en HPLC-fase reversa, para ello se utilizó un equipo Hewlett Packard, modelo 1100 con bomba cuaternaria, detector de arreglo de diodos (DAD), columna Allsphere ODS-1, 25 cm de largo, diámetro 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm, temperatura de horno 23 °C, velocidad de flujo en gradiente (0-5 min 1ml/min; 5-7.5 min 1.5 ml/min; 7.5-20 min 1.5 ml/min) y fase móvil isocrática consistente con una mezcla: MeOH:AcOH:H₂O (30:5:65). El análisis de los picos en los cromatogramas se determinó en el espectro UV, a 260 nm, con el software Chemstation A.09.03.

1.2. Actividad biológica

a) Animales

La actividad cicatrizante de la PM de la corteza de *B. morelensis* se evaluó en un modelo *in vivo*, para ello se utilizaron animales procedentes del Bioterio de la FES Iztacala, UNAM. Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria se utilizaron ratas machos de la especie *Ratus norvegicus*, cepa Wistar, de 260 a 320 g de peso corporal. Para las pruebas de evaluación del efecto analgésico y cicatrizante

se utilizaron ratones machos de la especie *Mus-musculus*, cepa CD-1, de 25 a 30 g de peso corporal.

Durante el período de experimentación de cada prueba los animales se mantuvieron en condiciones estándar de temperatura, humedad e iluminación (22 ± 1 °C, alternando ciclos de 12 h luz-obscuridad), con alimento y agua *ad libitum*.

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

b) Actividad cicatrizante

• *Método tensiométrico*

El efecto cicatrizante de la PM se evaluó mediante el método tensiométrico (Vargas, 2007) con ligeras modificaciones (apéndice III). En este ensayo se utilizaron ratones machos *Mus musculus*, cepa CD-1 (25 a 30 g de peso corporal), se les depiló el dorso y 24 horas después se hicieron heridas incisionales. Posteriormente, se aplicaron los tratamientos de la PM en gel de carbopol, a diferentes concentraciones (5, 10, 20 y 30 %) cada 12 horas durante cinco días. Como fármaco de referencia se utilizó neosporín dérmico (ND), que es el fármaco genérico del Cicatrin[®], utilizado en los trabajos de Arroyo *et al.* (1999) y Guillermo *et al.* (2005), los cuales se tomaron como referencia para la estandarización de las pruebas de cicatrización; este fármaco es utilizado para tratar heridas de intervenciones quirúrgicas. Como control negativo se utilizó gel de carbopol. Finalmente se sacrificaron a los animales y se midió la fuerza de tensión, en gramos, necesaria para abrir las heridas cicatrizadas o en proceso de reparación, para ello se utilizaron dinamómetros calibrados en 100 y 500 g. Los resultados se reportaron en porcentaje de cicatrización.

• *Análisis histopatológico*

Para conocer la evolución de la cicatrización en los grupos experimentales se hicieron cortes de los tejidos obtenidos de las heridas en proceso de cicatrización. Los cortes se hicieron en el Laboratorio de Histología de la Unidad de

Morfofisiología y Función de la FES Iztacala, con la colaboración del Biól. José del Carmen Benítez Flores y la M. en C. María del Rosario González Valle.

Las muestras se prepararon de acuerdo con técnica histológica estándar, fueron teñidos con hematoxilina-eosina (apéndice IV) y se observaron en el microscopio a 10X y 40X, tomando en cuenta el grado de regeneración del tejido, para ello se consideró la cantidad de vasos de neoformación, fibras de colágeno y proliferación celular (queratinocitos, neutrófilos y fibroblastos).

- ***Estudio de regeneración total***

Una vez evaluada la actividad cicatrizante de la PM, y tomando en cuenta los resultados del método tensiométrico y el estudio histopatológico mencionados, se efectuó un segundo ensayo para determinar el tiempo en que las diferentes concentraciones de la PM regeneran el tejido en las heridas experimentales.

Para este ensayo se realizó una prueba macroscópica y una microscópica; la prueba macroscópica consistió en observar el grado de evolución de las heridas en los grupos experimentales a través del tiempo, hasta la total regeneración del tejido; la prueba microscópica consistió en el estudio histopatológico de las heridas experimentales, para ello se hicieron cortes histológicos de los tejidos obtenidos en las heridas reparadas o en proceso de reparación, para ello se utilizó el método histológico estándar H&E (apéndice IV). En este caso, los tratamientos fueron aplicados durante 10 días y se utilizó Recoverón (acexamato de sodio) como fármaco de referencia. Los resultados se reportaron cualitativamente, tomando en cuenta los grupos experimentales en que la regeneración del tejido fue más evidente en el lapso de tiempo del estudio.

c) Actividad antiinflamatoria

En la determinación de la actividad antiinflamatoria de la PM se utilizaron ratas Wistar machos (260 a 320 g de peso corporal). Los métodos utilizados fueron: edema plantar por carragenina y migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal (apéndices V y VI respectivamente) (Vázquez *et al.*, 1996).

d) Efecto analgésico

El efecto analgésico de la PM se determinó sobre ratones macho *Mus musculus*, cepa CD-1 (25 a 30 g de peso corporal), el método utilizado fue el de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético, que consiste la administración intraperitoneal de ácido acético y el posterior registro del número de contorsiones que el animal exhibe durante 20 minutos. Las sustancias a evaluar se administraron una hora antes del ácido acético (apéndice VII) (Atta y Alkofahi, 1998).

e) Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó mediante el método de DPPH (2,2-difenilpicril-hidracilo) que consiste en una reacción de óxido reducción, en la que el radical libre estable DPPH es reducido por la transferencia de electrones de un compuesto o sustancia antioxidante. La reacción consiste en el desvanecimiento del color violeta intenso, característico del DPPH, hasta la formación de un tono amarillo claro, que se lleva a cabo por la interacción de éste con un compuesto antioxidante que le cede electrones. La reacción se midió espectrofotométricamente a 515 nm y los resultados se reportaron en porcentaje de reducción del DPPH (apéndice VIII) (Método modificado de Murillo, 2006).

f) Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de la PM se evaluó sobre cinco cepas de bacterias Gram positivas y diez Gram negativas (cuadro 3). Se efectuó una evaluación cualitativa para determinar las especies de bacterias susceptibles al extracto, para ello se utilizó el método de difusión en agar de Kirby-Baüer (apéndice IX).

Posteriormente, mediante una evaluación cuantitativa, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM), para ello se utilizó el método de dilución en agar (apéndice X) (Métodos modificados de Koneman *et al.*, 1985).

Cuadro 3. Cepas bacterianas utilizadas para los bioensayos.

<i>Bacillus subtilis</i> *	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922**
<i>Sarcina lutea</i> *	<i>Salmonella desinteriae</i> **
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12398*	<i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430**
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538*	<i>Vibrio cholerae</i> INDRE 206 agua**
<i>Staphylococcus epidermidis</i> *	<i>Vibrio cholerae</i> caso clínico**
<i>Enterobacter aerogenes</i> **	<i>Vibrio cholerae</i> CDC V 12 (Tor)**
<i>Enterobacter agglomerans</i> ATCC 27155**	<i>Vibrio cholerae</i> No. 01**

* Gram positiva; ** Gram negativa.

Para evaluar el efecto del extracto sobre la cinética de crecimiento en la población bacteriana, se utilizó una cepa Gram positiva y una Gram negativa; se monitoreó el crecimiento de las poblaciones al ser expuestas a diferentes concentraciones del extracto (1/2 CMI, CMI, y CBM) durante 24 horas, de acuerdo con el método propuesto por Kubo *et al.*, 1993 y modificado por Ávila, 1996 (apéndice XI).

g) Actividad antifúngica

La evaluación de la actividad antifúngica se realizó sobre cinco cepas de hongos filamentosos y cuatro levaduriformes (cuadro 4). Las evaluaciones cualitativa y cuantitativa sobre hongos filamentosos, se efectuaron con los métodos de inhibición del crecimiento radial y el de dilución en agar (apéndices XII y XIII) (Métodos modificados de Wang y Bun, 2002); para las levaduras se utilizaron los métodos de difusión y dilución en agar (apéndices IX y X) (Métodos modificados de Koneman *et al.*, 1985).

Cuadro 4. Especies fúngicas utilizadas para los bioensayos.

Hongos filamentosos	Levaduras
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida albicans</i> caso clínico
<i>Fusarium sporotrichoides</i> ATCC NRL3299	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
<i>F. moniliforme</i>	<i>Candida albicans</i> ATCC 14065
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Rhizoctonia solani</i>	

1.3. Procesamiento de los datos

Los datos obtenidos en la determinación de la actividad biológica se analizaron estadísticamente mediante el software Statistica versión 6.0. En todos los casos, los datos de las pruebas tuvieron una distribución normal.

Para las pruebas in vivo (cicatrizante, antiinflamatoria y analgésica) se calculó la media y el error estándar de la media (E.E.M.); para determinar la significancia entre los tratamientos aplicados, se utilizó la prueba “t de Student” para una $p < 0.05$.

Por otra parte, para analizar los resultados de la actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica se efectuó un ANOVA unifactorial y un análisis de regresión lineal, este último para conocer la concentración que reduce en un 50 % el radical DPPH y las concentraciones que inhiben el crecimiento de los microorganismos.

Fase 2. Aislamiento de los principios activos de la PM, caracterización química general de las fracciones obtenidas de la PM y evaluación de la actividad biológica de las fracciones de la PM.

2.1. Estudio fitoquímico

a) Aislamiento de los principios activos

Para el fraccionamiento de la PM de la corteza de *B. morelensis* se realizaron dos cromatografías en columna, la primera se efectuó a partir de 85 g de muestra; se utilizó sílica gel (Sigma S6503, 10-40 μ) como fase estacionaria, la fase móvil para la primera cromatografía consistió en mezclas de acetato de etilo y metanol, para la segunda se utilizaron mezclas de cloroformo y metanol, en ambos casos las mezclas se agregaron en gradientes de menor a mayor polaridad.

Por otra parte, la separación por placa fina se efectuó en cromatofolios de gel de sílice Merck (Kieselgel 60), la fase móvil para estas separaciones consistió en mezclas de hexano, acetato de etilo, cloroformo y metanol, considerando la

polaridad de las fracciones a separar y analizar; en todos los casos las bandas de los cromatogramas se revelaron con luz UV y sulfato cérico.

b) Caracterización general de los constituyentes de las fracciones obtenidas de las separaciones cromatográficas

La caracterización química general de los constituyentes de las fracciones separadas de ambas cromatografías se realizó en tres fases, la primera consistió en la detección de compuestos fenólicos mediante la reacción con cloruro férrico. En la segunda se llevó a cabo la cuantificación de los compuestos fenólicos totales utilizando el reactivo de Folin-Cuicalteu (apéndice II) y la tercera consistió en el análisis de las fracciones mediante HPLC-fase reversa, cuyas condiciones cromatográficas fueron las mismas que las descritas para el análisis de la PM (pág. 22).

2.2. Actividad biológica

En esta fase se evaluaron las actividades antioxidante y antibacteriana de las fracciones de ambas cromatografías. Por otra parte, el efecto cicatrizante se evaluó solo en algunas fracciones, debido al bajo rendimiento de algunas de ellas.

La actividad antioxidante se evaluó mediante el método de DPPH y la actividad antibacteriana se determinó mediante el método de difusión en agar de Kirby-Baüer (apéndices VIII y IX). El efecto cicatrizante se evaluó mediante el método tensiométrico (apéndice III) y mediante la determinación de la cantidad de hidroxiprolina, como un indicador de la cantidad de colágeno en las heridas experimentales, para ello se utilizó el método de Woessner (1961) modificado por Gawronska-Kozak *et al.*, (2006) (apéndice XIV).

Fase 3. Elucidación general de los principios activos de las fracciones de la PM con actividad biológica.

3.1. Elucidación química de los principios activos

La última fase del presente trabajo consistió en la elucidación de los compuestos químicos de algunas fracciones activas. Las fracciones que se analizaron fueron: C1-3, C1-6 y C2-9, ya que mostraron mayor actividad biológica y de ellas se obtuvo un buen rendimiento.

- *Determinación cualitativa*

Se efectuó una caracterización general de los constituyentes de las fracciones seleccionadas que consistió en la determinación de la presencia de taninos, así como de la naturaleza de los mismos (hidrolizables o condensados) (apéndice XV).

- *Resonancia magnética nuclear de protones (RMN ¹H)*

La determinación de la estructura química de los constituyentes de las fracciones mencionadas se efectuó mediante técnicas de resonancia magnética nuclear de protones (RMN ¹H), para ello se empleó un equipo Varian Unity (300 MHz) usando DMSO como disolvente. Cabe mencionar que la muestra C1-3 se analizó, además, RMN ¹³C en un equipo Bruker-Avance (F) (75 MHz), en este caso se utilizó CD₃OD como disolvente.

Para conocer con mayor exactitud la complejidad de las fracciones, así como el peso molecular de sus constituyentes, se efectuó HPLC acoplada con espectrometría de masas (HPLC-MS) en un cromatógrafo Agilent 1200. Se utilizó una columna Synergi Max-RP, 150X2 mm, tamaño de partícula 4 μm. La fase móvil fue en gradiente MeOH/H₂O inicial 60/40, 20 min 100/0, con una velocidad de flujo 0.2 mL/min. Detector de masas ESI-trampa de iones Bruker Esquire 6000, nebulizador 10 psi, gas de secado 5 L/min, temperatura de secado 350 °C, target 400 m/z, scan 50-100 m/z.

Resultados

Fase 1

1.1. Estudio fitoquímico

a) Datos etnobotánicos de *B. morelensis*

Cuadro 5. Datos generales de *B. morelensis*.

Familia	Burseraceae
Nombre científico	<i>Bursera morelensis</i> Ramírez
Nombre común	Aceitillo
Número de registro	IZTA 42123
Parte utilizada	Corteza
Forma de uso	Maceración en alcohol
Fecha de colecta	Agosto de 2007
Lugar de colecta	San Rafael, Coxcatlán, Puebla

b) Extracción

Se obtuvieron 150.4 g de extracto metanólico crudo que corresponden al 23.28 % de rendimiento total, con respecto a los 646 g de corteza a partir de la cual se obtuvo el extracto. Por otra parte, la partición metanólica (PM) mostró el mayor rendimiento con 118.2 g, correspondientes al 18.29 % (cuadro 6).

Cuadro 6. Rendimiento del extracto metanólico (corteza de *B. morelensis*).

Extracto	Rendimiento (g)	Rendimiento (%)
PM	118.2	18.29
PH	9.9	1.53

El rendimiento en g se determinó a partir de 128.1 g de extracto metanólico crudo. El rendimiento en porcentaje se determinó con respecto a 646 g de corteza seca y fragmentada. PM: partición metanólica; PH: partición hexánica.

c) Caracterización preliminar del extracto metanólico

- **Presencia y determinación total de fenoles en la PM**

La reacción con cloruro férrico, efectuada al extracto metanólico y a la PM, reveló la presencia de compuestos fenólicos, que al ser cuantificados se determinó un contenido total de fenoles de 456.15 y 504.54 mg/g de extracto, para el extracto metanólico y la PM respectivamente.

- **Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-fase reversa)**

La cromatografía líquida de alta resolución, efectuada al extracto metanólico y la PM, mostró ocho picos que, de acuerdo con el perfil cromatográfico, corresponden a los mismos componentes con diferente concentración, en cuyo caso los constituyentes de la PM se encuentran en mayor concentración (figura 4).

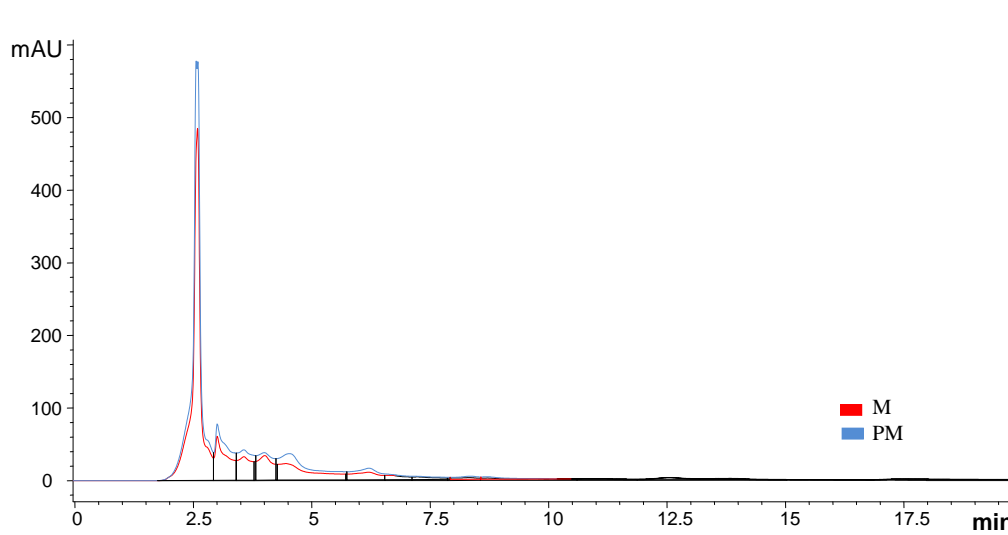


Figura 4. Comparación por HPLC-fase reversa (DAD, $\lambda=260$ nm) del extracto metanólico (M) y la PM de *B. morelensis*.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la cuantificación total de fenoles y el perfil cromatográfico, efectuados al extracto metanólico y la PM, se determinó que ésta última posee una mayor concentración de compuestos fenólicos, por lo cual se decidió realizar todo el estudio fitoquímico y las pruebas biológicas únicamente con esta partición.

La figura 5 muestra el cromatograma de la PM, donde se observa que el pico número uno, que aparece en un TR de 2.58 min, fue el más abundante (área = 6875). En cuanto a la naturaleza de los constituyentes, se observan patrones de absorción en UV característicos de fenilpropanoides, tratándose en su mayoría de flavonoides, lo cual fue evidente para los picos 4 a 8 (área total = 3879.7; 29.58%). Sin embargo, los constituyentes 1 a 3 se encuentran en mayor abundancia (área total = 9237; 70.42%) (cuadro 7).

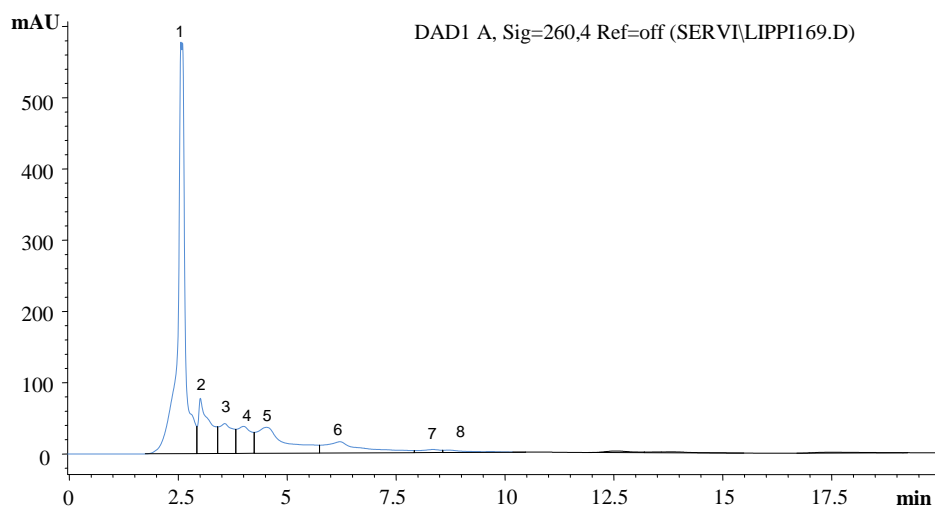


Figura 5. HPLC-fase reversa de la PM (DAD, $\lambda=260$ nm).

Cuadro 7. Datos del HPLC-fase reversa de la PM. DAD ($\lambda=260$ nm).

No. pico	t_R (min)	UV λ_{max} (nm)	Área
1	2.578	240 y 278 ^{fp}	6875.0
2	3.014	276 ^{fp}	1428.4
3	3.574	238 y 278 ^{fp}	933.6
4	4.001	238, 278 y 336 ^{flv}	870.0
5	4.534	238, 278 y 330 ^{flv}	1754.4
6	6.201	238, 304 y 318 ^{flv}	976.3
7	8.328	238, 286 y 332 ^{flv}	138.5
8	8.734	238, 282 y 330 ^{flv}	140.5

Simbología: t_R : tiempo de retención; λ_{max} : absorbancia máxima; fp: fenilpropanoide; flv: flavonoide.

1.2. Actividad biológica

a) Efecto cicatrizante

- *Método tensiométrico*

Respecto a la actividad cicatrizante de la PM, todas las concentraciones evaluadas (5, 10, 20 y 30 %) mostraron efecto, lo cual fue evidente ya que requirieron mayor fuerza de tensión para abrir las heridas en proceso de cicatrización, comparadas con los controles [heridas sin tratamiento (ST) y vehículo (V)].

El efecto máximo de cicatrización se observó en el tratamiento con gel al 20 %, en cuyo caso las heridas requirieron 121.0 ± 3.31 g para ser abiertas, lo que corresponde al 44.16 % de cicatrización. Los resultados no mostraron un efecto dependiente de la dosis, debido a que la concentración del 30 % requirió 96.0 ± 3.99 g para abrir la herida (35.04 % de cicatrización), este valor es menor que el obtenido por el tratamiento del 20 %.

El grupo al que se le administró gel al 5% de la PM requirió menor fuerza de tensión para abrir las heridas (72.0 ± 3.38 g correspondientes con 26.28% de cicatrización), en comparación con todos los tratamientos evaluados. El porcentaje de cicatrización del tratamiento mencionado es mayor que el que mostró el fármaco de referencia (ND) que requirió 68.6 ± 3.83 g para abrir la herida, lo cual corresponde al 25.04 % de cicatrización (cuadro 8 y figura 6).

Cuadro 8. Efecto de la PM sobre la curación de heridas en piel de ratón.

Tratamiento	Fuerza de tensión (g)	Cicatrización (%)
Sin tratamiento	27.4 ± 1.77	10.0
Vehículo (gel)	$46.2 \pm 3.69^*$	16.86
5 % (PM)	$72.0 \pm 3.38^*$	26.28
10% (PM)	$113.0 \pm 6.43^*$	41.24
20 % (PM)	$121.0 \pm 3.31^*$	44.16
30 % (PM)	$96.0 \pm 3.99^*$	35.04
Neosporin dérmico	$68.6 \pm 3.83^*$	25.04
Piel intacta	$274 \pm 11.20^*$	100.00

Valor promedio (g \pm E.E.M.). n=5 en cada grupo. Estadísticamente significativo por t-Student
*p < 0.05.

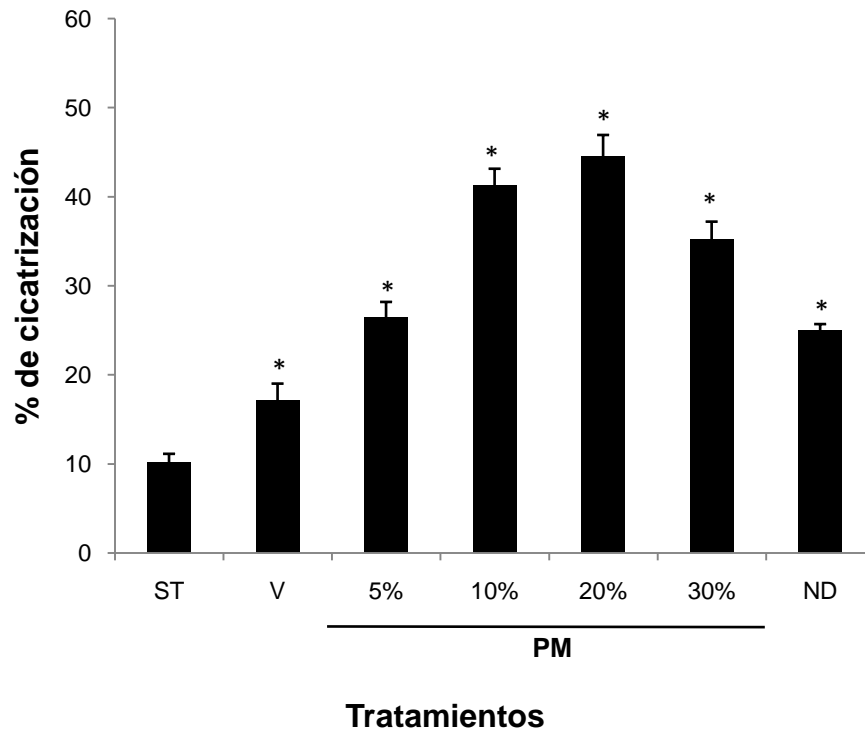


Figura 6. Efecto de la PM de *B. morelensis* sobre la piel de ratón lesionada. ST: sin tratamiento; V: vehículo (gel); ND: neosporín dérmico. n=5 en cada grupo. *p < 0.01.

• *Análisis histopatológico*

De las secciones estudiadas en el examen histopatológico, en las muestras de piel intacta se observaron todas las capas de la piel (epidermis, dermis e hipodermis), tejido muscular y los anexos, entre ellos una gran cantidad de folículos pilosos y glándulas sebáceas. En la epidermis se distinguen todos los estratos que la constituyen (basal, espinosa, granulosa y córnea); en la dermis se distinguen las capas papilar y reticular, folículos pilosos y las glándulas sebáceas asociadas con ellos (figura 7a).

Por otra parte, la regeneración del tejido fue mayor en las heridas de piel tratadas con las diferentes concentraciones de la PM de *B. morelensis* (figuras 9 y 10), así como en las del fármaco de referencia usado (ND) (figura 8b), las cuales no mostraron edema, congestión o cambios inflamatorios, comparadas con los controles (sin tratamiento y vehículo) (figuras 7b y 8a).

Por debajo de las heridas tratadas con la PM y el fármaco de referencia, se observó mayor cantidad de vasos en neoformación (angiogénesis) y un incremento en el depósito de tejido conectivo (neodermis). En las muestras mencionadas, la densidad celular fue claramente mayor (fibroplasia) y la organización histológica fue más favorable, en comparación con las heridas de los controles (figuras 7 a 10).

En las muestras tratadas con las concentraciones al 20 y 30 % de la PM se observó una mayor cantidad de vasos en neoformación y mayor densidad celular (tejido de granulación), en comparación con las otras concentraciones, lo cual es evidente por la presencia de una mayor cantidad de fibroblastos y fibras, así como una menor densidad de neutrófilos (figura 10).

Por lo tanto, la regeneración del tejido fue mayor en las lesiones de los animales tratados con las diferentes concentraciones de la PM de *B. morelensis*, así como con el fármaco de referencia usado.

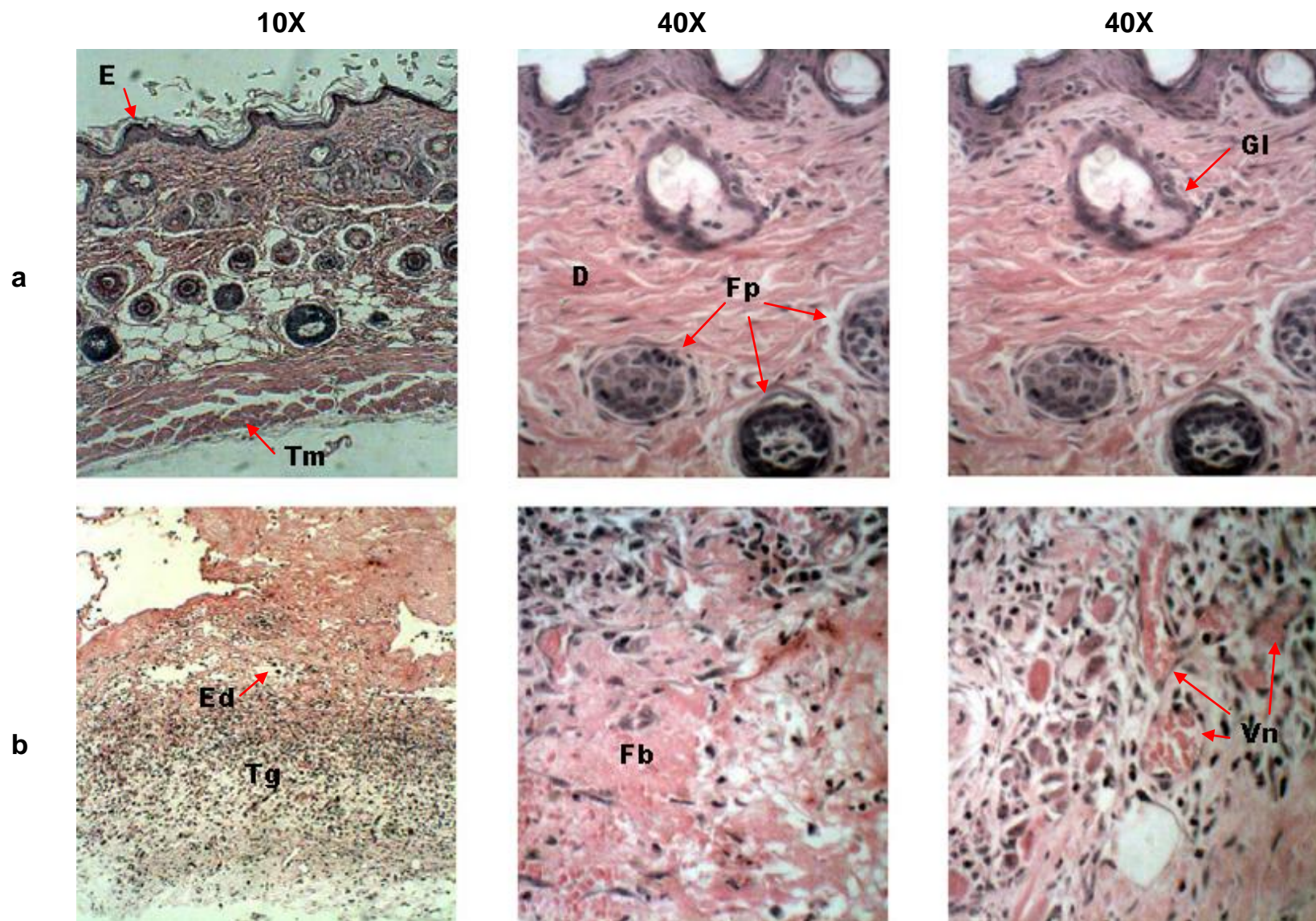


Figura 7. Micrografías de: a) piel intacta, b) sin tratamiento. Muestras tomadas después de 5 días de la lesión. La región mostrada representa la regeneración debajo de la cicatriz. (H&E). Simbología de las estructuras: E: epidermis, Tm: tejido muscular, D: dermis, Fp: folículo piloso, Gl: glándula, Tg: tejido de granulación, Ed: Edema, Fb: fibrina, Vn: vasos de neoformación.

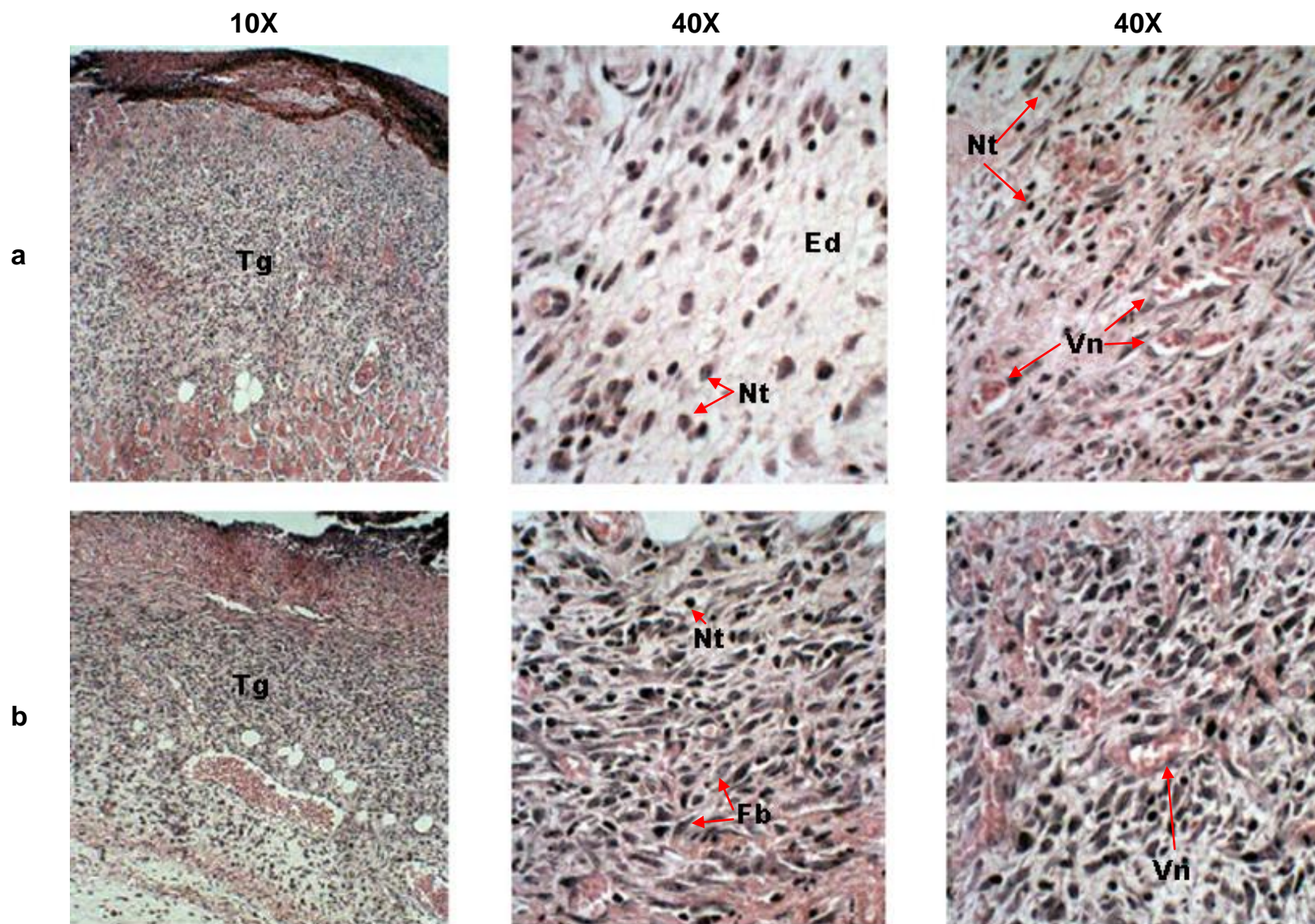


Figura 8. Micrografías de: a) vehículo (gel de carbopol), b) neosporin dérmico. Muestras tomadas después de 5 días de la lesión. La región mostrada representa la regeneración debajo de la cicatriz. (H&E). Simbología de las estructuras: Tg: tejido de granulación, Ed: Edema, Vn: vasos de neoformación, Nt: neutrófilos, Fb: Fibroblastos.

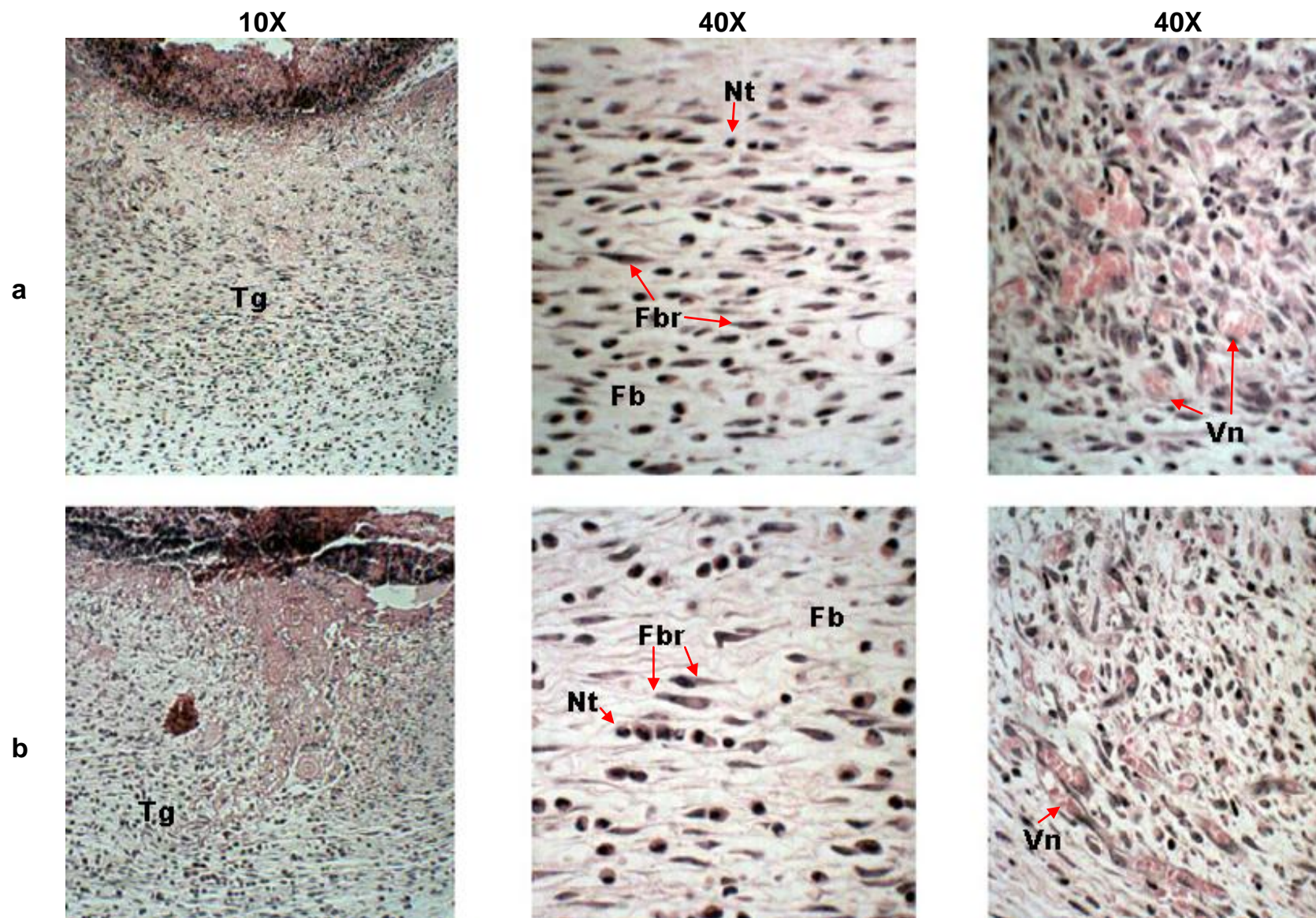


Figura 9. Micrografías de: a) 5 % de la PM, b) 10 % de la PM. Muestras tomadas después de 5 días de la lesión. La región mostrada representa la regeneración debajo de la cicatriz. (H&E). Simbología de las estructuras: Tg: tejido de granulación, Nt: neutrófilos, Fbr: fibroblastos, Fb: fibrina, Vn: vasos de neoformación.

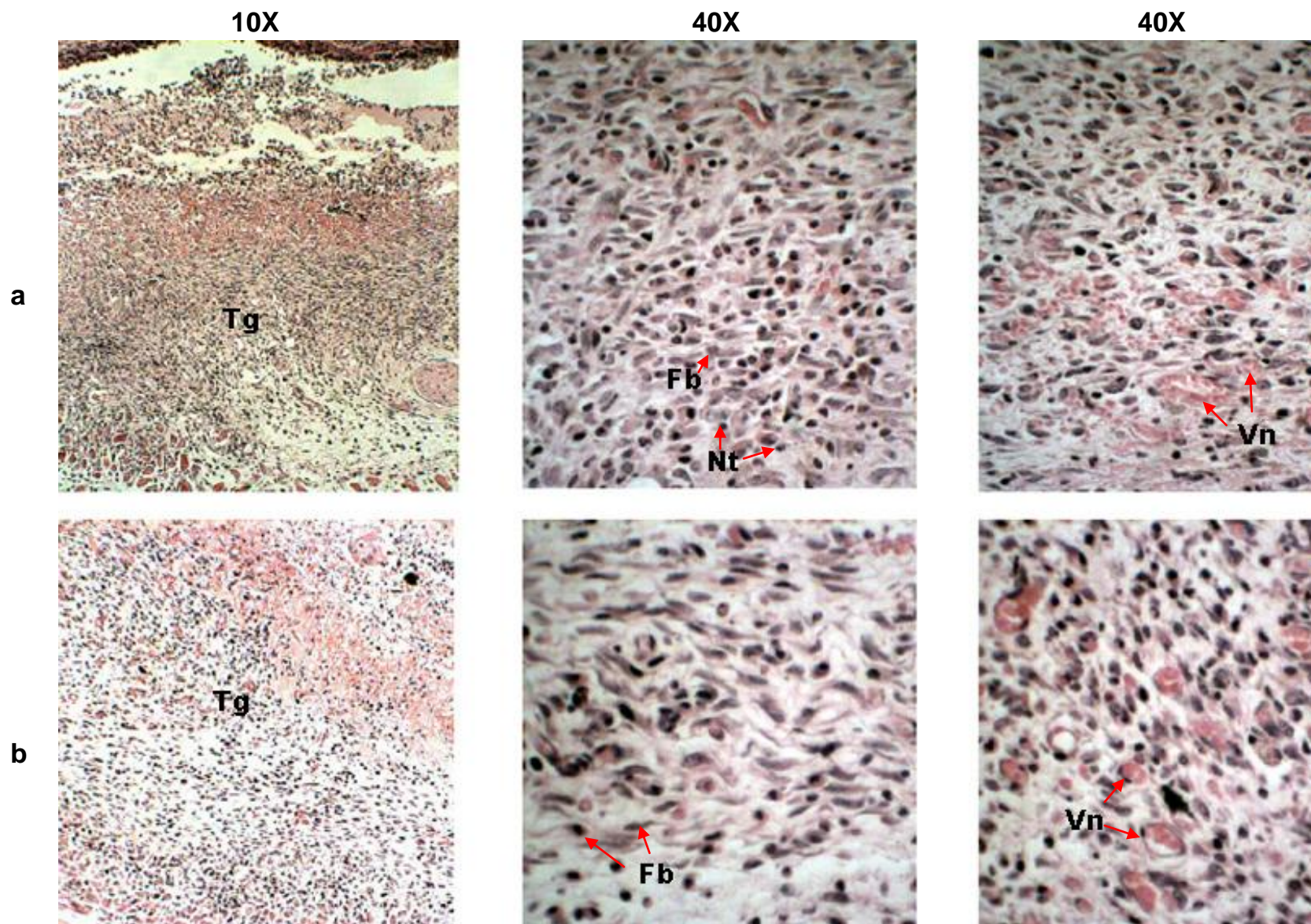


Figura 10. Micrografías de: a) 20 % de la PM, b) 30 % de la PM. Muestras tomadas después de 5 días de la lesión. La región mostrada representa la regeneración debajo de la cicatriz. (H&E). Simbología de las estructuras: Tg: tejido de granulación, Nt: neutrófilos, Fb: fibroblastos, Fb: fibrina, Vn: vasos de neoformación.

- ***Estudio de regeneración total***

Observación macroscópica

En el segundo ensayo efectuado para evaluar la actividad cicatrizante de la PM, en el que se permitió la regeneración total de tejido, se puso en evidencia mediante observación macroscópica, la formación de la costra entre los días 5 y 6 en las cicatrices de los grupos tratados con la PM.

Por otra parte, en los grupos control y fármaco de referencia (Recoverón) no se observó la presencia de costra. Al término del periodo de diez días, los grupos del 5% de la PM, control y fármaco de referencia mostraron cicatrices más estéticas, en comparación con los grupos a los que se les administró la PM al 10 y 20 %, en cuyo caso aun mostraron costra y heridas abiertas (figura 11). Ninguno de los grupos mostró proceso inflamatorio crónico o infeccioso.

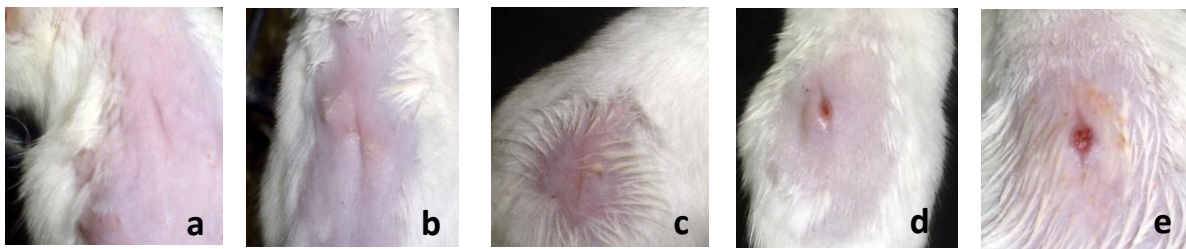


Figura 11. Cicatriz a los 10 días de tratamiento; a: control, b: recoveron, c: 5 % PM, d: 10 % PM, e: 20 % PM.

Observación microscópica (análisis histopatológico)

De las secciones estudiadas en los cortes histológicos de 10 días de evolución, en el grupo control se observó la epidermis aun en regeneración, lo cual fue evidente por un adelgazamiento de la misma en el sitio de la lesión y remanentes del corte. Además, la regeneración de la dermis, en el grupo mencionado, aún no era total (figura 12a).

En los grupos experimentales y fármaco de referencia (Recoverón) se observó el estrato córneo y la epidermis engrosada, especialmente en el grupo tratado con la PM al 10 % (figuras 12b, 12c, 13a y 13b).

En todos los grupos se observó la presencia de vasos sanguíneos, fibras de colágeno, ausencia o poca cantidad de folículos pilosos y glándulas sebáceas, así como infiltrado celular abundante (fibroblastos, linfocitos, neutrófilos y plasmocitos, principalmente) en la dermis papilar.

El grupo tratado con el 5% de la PM mostró una mayor regeneración del tejido, observándose una total regeneración de las capas constituyentes de la piel (epidermis y dermis), presencia de folículos pilosos y glándulas sebáceas. Además se observaron células satélite debajo de la dermis, característica que solo fue evidente en este grupo (figura 12c).

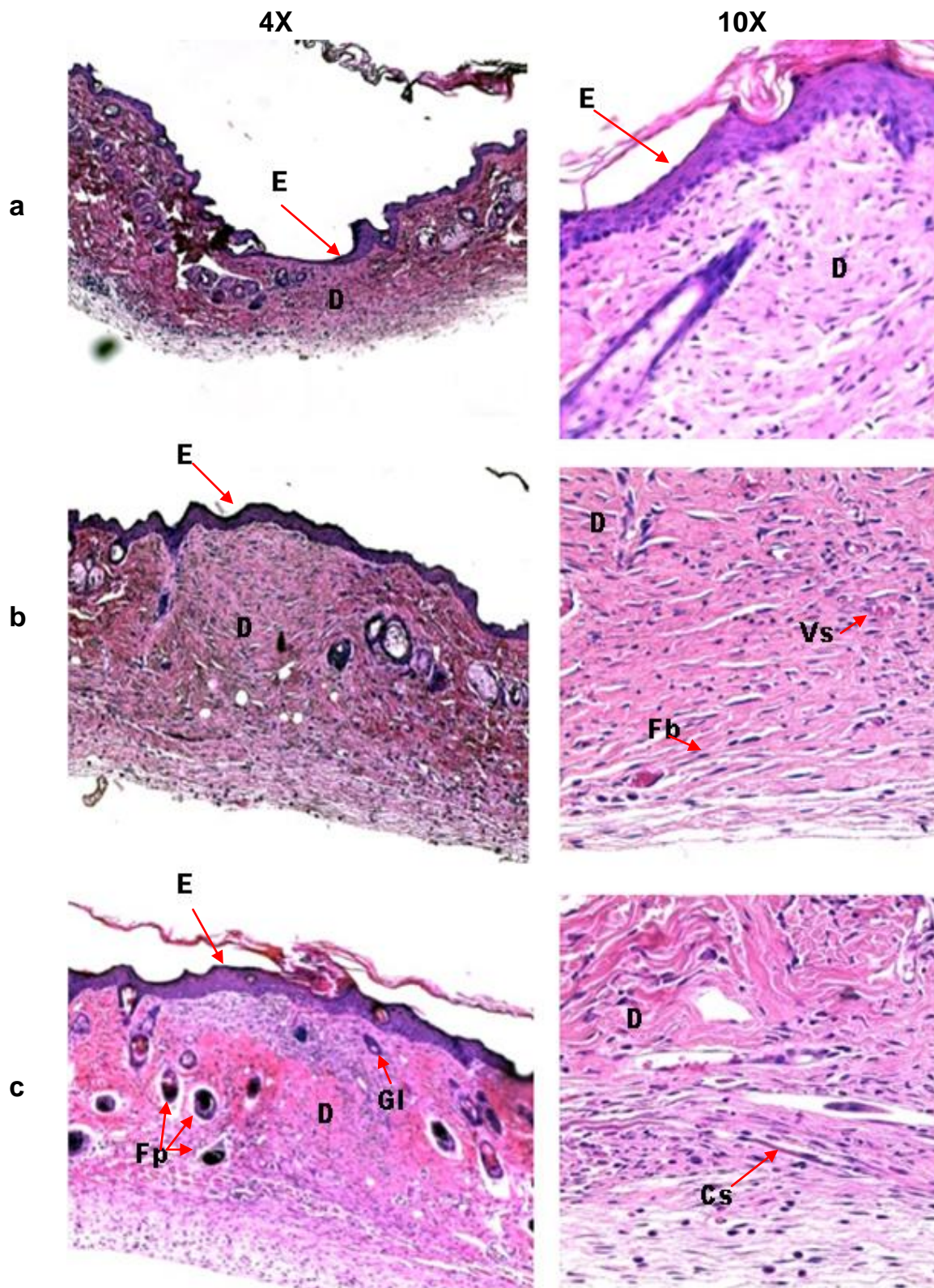


Figura 12. Micrografías de las heridas en reparación tratadas con la PM de *B. morelensis*, después de 10 días de la lesión. a) vehículo, b) recuperación, c) 5 % de la PM. La región mostrada representa la región debajo de la cicatriz. (H&E). Simbología de las estructuras: E: epidermis, D: dermis, Fb: fibroblastos, Vs: vasos sanguíneos, Fp: folículo piloso, Gl: glándula, Cs: célula satélite.

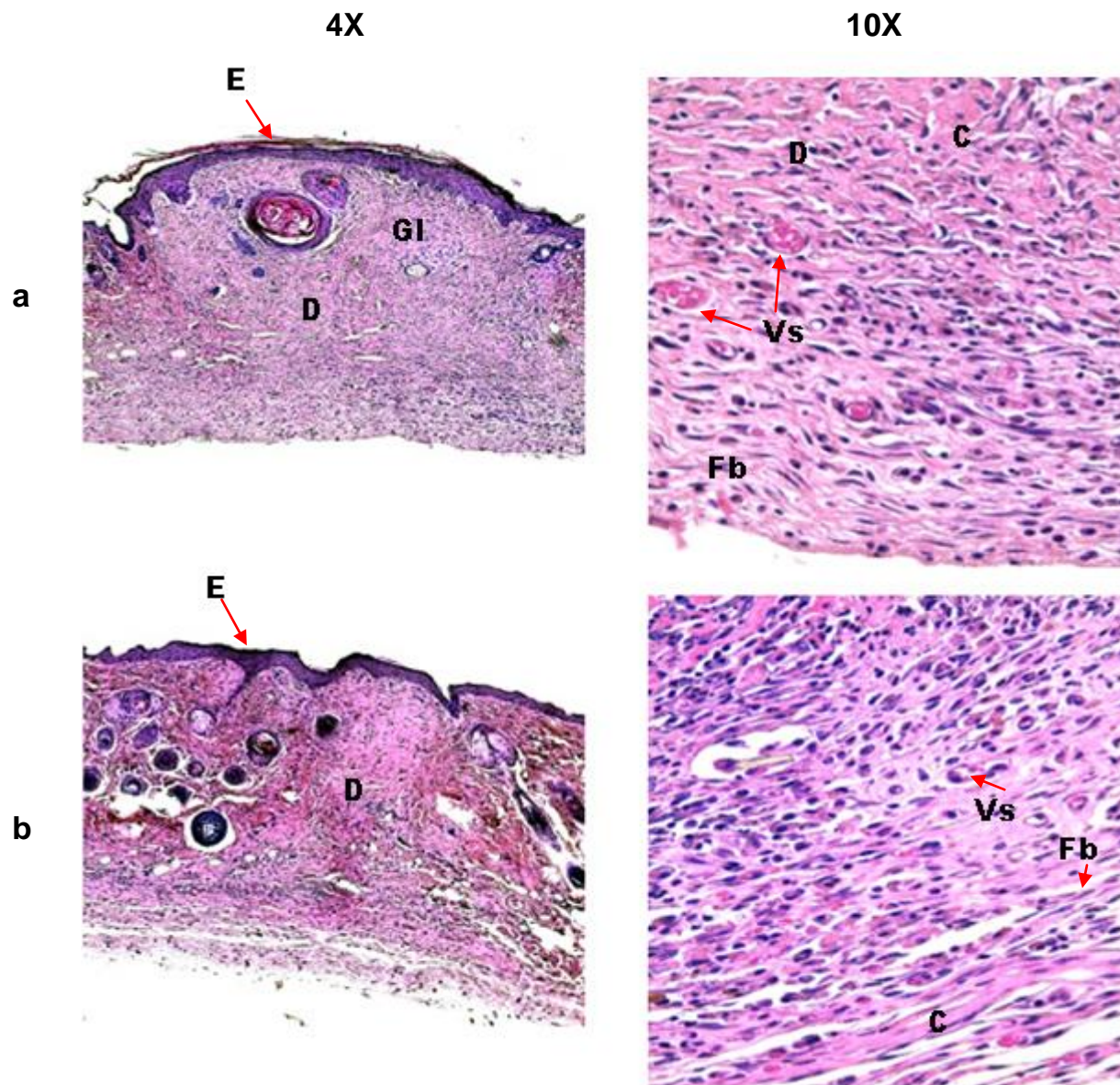


Figura 13. Micrografías de las heridas en reparación tratadas con la PM de *B. morelensis*, después de 10 días de la lesión. a) 10 % de la PM, b) 20 % de la PM. La región mostrada representa la región debajo de la cicatriz. (H&E). Simbología de las estructuras: E: epidermis, D: dermis, Fb: fibroblastos, C: colágeno, Vs: vasos sanguíneos, Gl: glándula.

b) Actividad antiinflamatoria

• *Inhibición del edema plantar producido por administración de carragenina*

En la determinación del edema plantar producido por carragenina, la PM disminuyó el edema con las dosis administradas (25 y 50 mg/Kg) después de cuatro horas de la inducción del edema (figura 14). El grupo al que se le administraron 50 mg/kg mostró incremento en el volumen plantar de 79.32 ± 18.52 μ L, mientras que el grupo tratado con 25 mg/kg presentó un incremento de volumen de 109.8 ± 25.24 μ L. El menor edema se observó en el grupo al que se le administró indometacina, el cual fue de 59.5 ± 12.12 μ L de Δ volumen.

En cuanto al porcentaje de inhibición de edema, calculado después de cuatro horas de la administración de la carragenina, se observó que la dosis de 50 mg/kg causó una inhibición de 57.9 %, lo cual es muy similar al mostrado por la indometacina, con la que se obtuvo 68.42 %.

Con el análisis estadístico se determinó que hay diferencias significativas en el efecto de incremento de volumen entre los tratamientos de las dosis de la PM y la indometacina, comparadas con el vehículo; también se determinó que no hay diferencias significativas entre la dosis de 50 mg/kg de la PM con la indometacina.

• *Migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal*

En cuanto al efecto de la PM sobre la migración de neutrófilos, se observó que ambas dosis (25 y 50 mg/kg) disminuyeron el número de neutrófilos que migran a la cavidad peritoneal mediante un efecto dependiente de la dosis. Estadísticamente, hubo diferencias significativas en el efecto de la migración de neutrófilos, entre la dosis de 50 mg/kg y la dexametasona, con respecto al vehículo.

La dosis de 50 mg/Kg de la PM, disminuyó la migración de neutrófilos 28.01 %, mientras que la de 25 mg/Kg mostró una disminución de la migración de 10.77 % (figura 15).

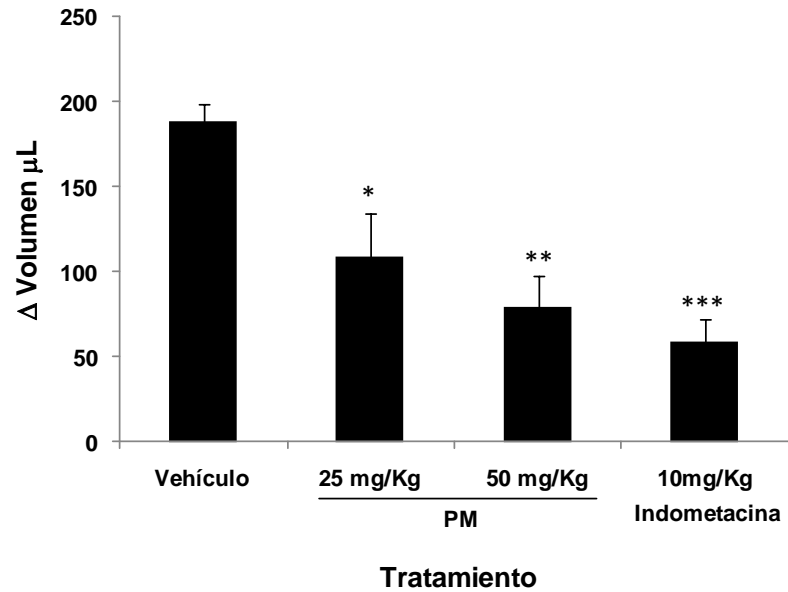


Figura 14. Efecto de la PM sobre el edema plantar por carragenina en rata después de 4 h de la inducción del edema por carragenina. Valor promedio (μL edema \pm E.E.M.). $n=5$. * $p = 0.03$, ** $p = 0.0006$, *** $p = 0.0004$.

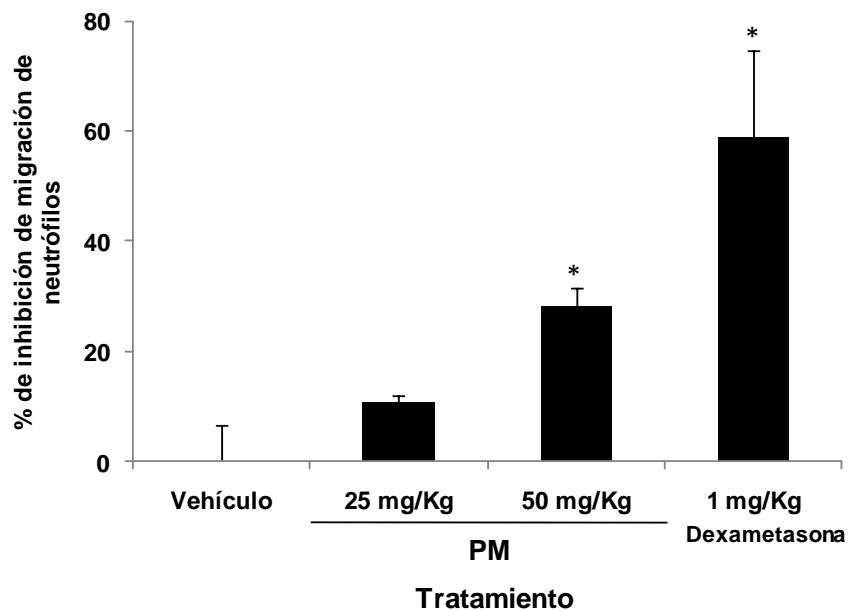


Figura 15. Efecto de la PM sobre la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal. Valor promedio (% de inhibición de la migración de neutrófilos \pm D.E.M.). $n=5$. * $p = 0.0006$.

c) Efecto analgésico

Los resultados del efecto analgésico mostraron que la dosis de 50 mg/Kg de la PM y el fármaco de referencia (indometacina) disminuyeron significativamente el número de contorsiones abdominales, tras un periodo de observación de 20 minutos. Ambos tratamientos mostraron diferencias significativas respecto al control (vehículo). Por otra parte, entre la dosis de 25 mg/Kg y el vehículo no hubo diferencias significativas en cuanto al número de respuestas (contorsiones) (figura 16).

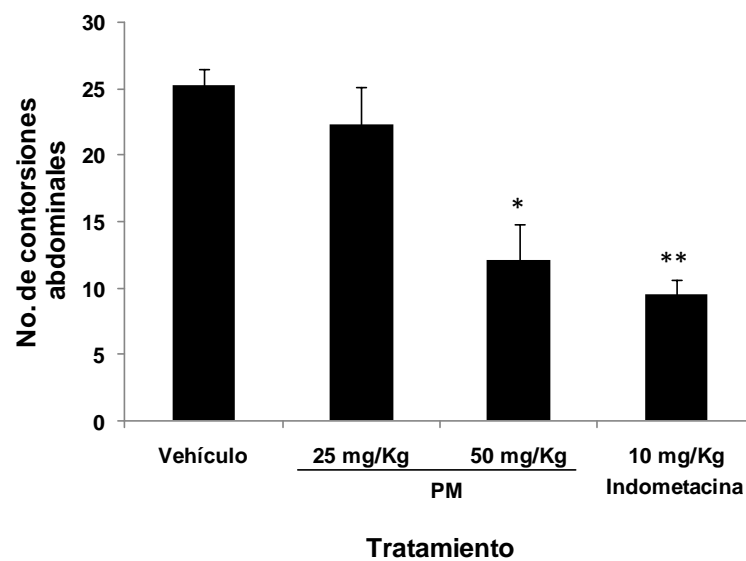


Figura 16. Efecto de la PM sobre las contorsiones abdominales totales, acumuladas durante un lapso de observación de 20 minutos. Valor promedio (No. de contorsiones \pm E.E.M.). $n=8$. * $p = 0.001$, ** $p = 0.0006$.

d) Actividad antioxidante

La PM mostró capacidad reductora del radical DPPH, aumentando la actividad antioxidante con respecto a la concentración, el máximo efecto se observó en la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, con un porcentaje de reducción de 79.84; este valor es menor que el de la quercetina que mostró un porcentaje de reducción de 88.86 en la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ (figura 17).

Con el análisis de regresión lineal se determinó que la capacidad antioxidante media (CA_{50}) de la PM es de 3.05 $\mu\text{g/mL}$, mostrando una mayor actividad reductora sobre el DPPH, comparada con la quercetina, ya que la CA_{50} de ésta fue de 4.45 $\mu\text{g/mL}$. Aun así, no se encontraron diferencias significativas en el efecto de la PM, comparado con la quercetina ($p < 0.05$).

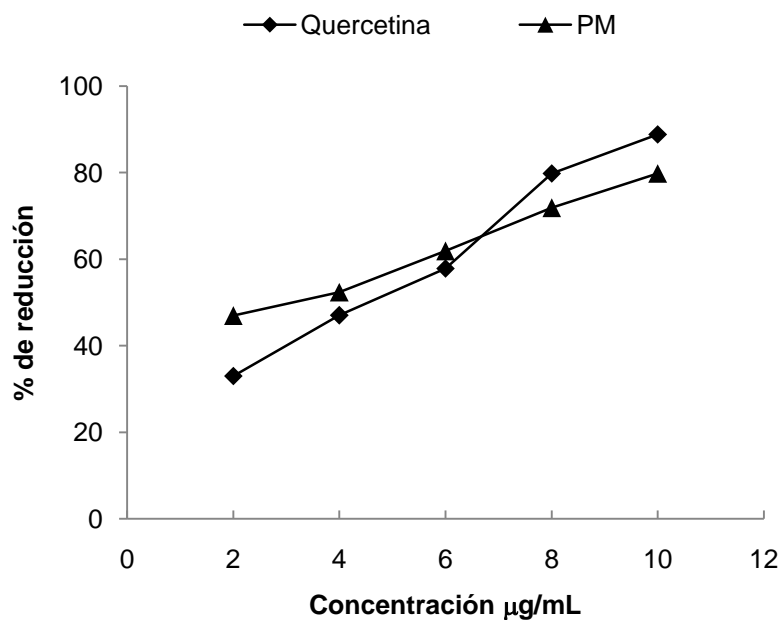


Figura 17. Efecto antioxidante de la PM. Porcentaje de reducción del DPPH (equivalente a porcentaje de decoloración del DPPH). Valores promedio de absorbancia \pm DE. * $p < 0.05$.

e) Actividad antibacteriana

• Evaluación cualitativa

La PM en la concentración evaluada (2 mg/sensidisco) mostró actividad sobre siete cepas bacterianas (cinco Gram positivas y dos Gram negativas), con halos de inhibición entre 9 y 11 mm de diámetro. Los resultados de la actividad antibacteriana de la PM mostraron diferencias significativas comparados con el control ($p < 0.05$) (cuadro 9).

Cuadro 9. Actividad antibacteriana de la PM (prueba cualitativa).

Bacteria	PM	Cloranfenicol
<i>B. subtilis</i> ⁺	9.00 ± 0.00	28.50 ± 0.71
<i>S. aureus</i> ⁺	10.67 ± 0.57	27.00 ± 1.41
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 ⁺	10.33 ± 0.57	27.00 ± 1.41
<i>S. epidermidis</i> ⁺	10.67 ± 0.57	22.00 ± 0.50
<i>S. lutea</i> ⁺	11.00 ± 0.00	23.57 ± 0.75
<i>V. cholerae</i> cc ⁻	11.00 ± 0.00	27.33 ± 2.30
<i>Y. enterocolitica</i> ⁻	10.67 ± 0.57	27.00 ± 0.00

Halos de inhibición (mm); valor promedio de tres repeticiones; el extracto fue evaluado con una concentración de 2 mg/sensidisco; cloranfenicol: 5 µg/sensidisco.

Simbología: PM partición metanólica; + Gram positiva; - Gram negativa.

• Evaluación cuantitativa

En la evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana, las bacterias Gram positivas fueron las más susceptibles a la PM. La especie *S. lutea* fue la más susceptible, ya que su crecimiento fue inhibido con las menores CMI y CBM (0.125 y 0.25 mg/mL, respectivamente). Las bacterias menos susceptibles fueron las Gram negativas *V. cholerae* cc y *Y. enterocolitica*, debido a que la CBM fue de 2.0 y >2.0 mg/mL respectivamente (cuadro 10).

Cuadro 10. Actividad antibacteriana de la PM (prueba cuantitativa).

Bacteria	CMI (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>B. subtilis</i> ⁺	0.5	1.0
<i>S. aureus</i> ⁺	0.5	1.0
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 ⁺	0.5	1.0
<i>S. epidermidis</i> ⁺	0.5	1.0
<i>S. lutea</i> ⁺	0.125	0.250
<i>V. cholerae</i> cc ⁻	1.0	2.0
<i>Y. enterocolitica</i> ⁻	1.0	>2.0

Simbología: CMI: concentración mínima inhibitoria; CBM: concentración bactericida mínima; + Gram positiva; - Gram negativa.

- ***Cinética de proliferación bacteriana***

La figura 18a muestra el efecto de diferentes concentraciones de la PM sobre la especie *S. aureus*. Se observa que las tres concentraciones (1/2 CMI, CMI y CBM), aplicadas al inóculo bacteriano, causaron disminución del crecimiento de la población bacteriana, no así el control, el cual no mostró disminución del crecimiento de la población. También se observa que el efecto máximo (inhibición total en el crecimiento bacteriano), fue a las 24 horas después de aplicar los tratamientos, a diferencia del control, que a las 24 horas mostró el mayor crecimiento en la población bacteriana.

Concentraciones iguales o menores a la CMI, produjeron efecto bacteriostático, mientras que la CBM produjo un efecto bactericida, provocando la muerte del 99.9 % de la cepa *S. aureus*, después de 24 h de exponer a la bacteria a la concentración mencionada de la PM. Se observó que a las 12 horas aun hubo crecimiento bacteriano y posteriormente ocurrió una caída drástica en las UFC, llegando a eliminarlas totalmente, a las 24 h.

La figura 18b muestra la disminución de la población bacteriana de *V cholerae* cc, al ser incubada con dos de las concentraciones evaluadas (CMI y CBM), comparadas con el tratamiento control y la concentración de la mitad de la CMI, en donde se observa crecimiento bacteriano a través del tiempo (h).

La CMI produjo un efecto bacteriostático en el crecimiento de *V. cholerae* cc, mientras que la CBM es una concentración suficiente para disminuir el crecimiento bacteriano a partir de la primera hora de aplicar el tratamiento y tres horas después hubo una eliminación del 99.9 % de las UFC, mostrando el efecto bactericida de la CBM.

El efecto de la CBM de la PM sobre el crecimiento de *S. aureus* y *V cholerae* cc, reflejan curvas de supervivencia de tipo impactos múltiples, en las que en las primeras horas no hay cambios significativos en cuanto al número de supervivientes y posteriormente se observa una curva lineal con pendiente negativa.

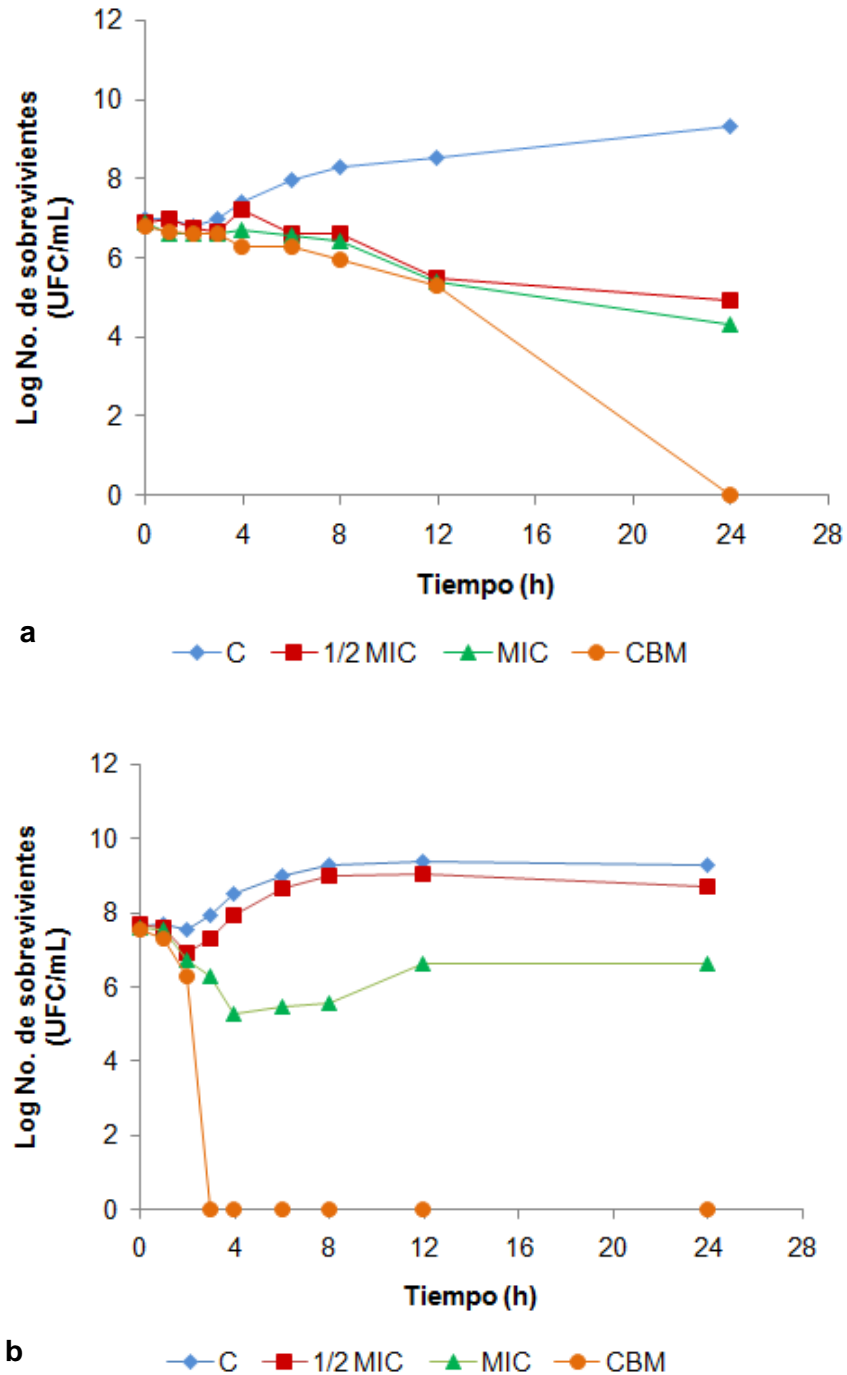


Figura 18. Efecto de diferentes concentraciones de la PM sobre el crecimiento en la población bacteriana. a) PM sobre *S. aureus*, b) PM sobre *V. cholerae* cc. Simbología: C: control, CMI: concentración mínima inhibitoria, CBM: concentración bactericida mínima, UFC: unidades formadoras de colonias, h: horas.

f) Actividad antifúngica

- **Evaluación cualitativa**

En cuanto a la actividad antifúngica, la PM mostró inhibición del crecimiento radial sobre *T. mentagrophytes* (cuadro 11).

- **Evaluación cuantitativa**

En la evaluación cuantitativa se obtuvo que la PM inhibió el crecimiento de *T. mentagrophytes* al 100 %, en una concentración de 1.5 mg/mL (cuadro 12).

Con el análisis de regresión lineal se obtuvo la concentración inhibitoria media (CI_{50}) y la concentración fungicida mínima (CFM) de la PM, las cuales corresponden con 0.78 y 1.5 mg/mL, respectivamente. Estas concentraciones son mayores que las mostradas por el control (ketoconazol), el cual mostró valores de CI_{50} y CFM de 0.875 y 0.872 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Cuadro 11. Resultados de actividad antifúngica de la PM (prueba cualitativa).

Hongo	PM	Ketoconazol
<i>A. niger</i>	-	+
<i>F. moniliforme</i>	-	+
<i>F. sporotrichum</i>	-	+
<i>T. mentagrophytes</i>	+	+
<i>R. solani</i>	-	+

Inhibición del crecimiento radial; PM: 2 mg/sensidisco, Ketoconazol: 7 μg /sensidisco.

Cuadro 12. Porcentaje de inhibición de la PM sobre *T. mentagrophytes* (prueba cuantitativa).

Concentración (mg/mL)	PM (% Inhibición)
0.00	0.00
0.13	7.69
0.25	7.69
0.50	33.31
0.75	48.69
1.00	64.07
1.50	100.00
2.00	100.00

Fase 2.

2.1. Estudio fitoquímico

a) Aislamiento de los principios activos

De la primera cromatografía en columna se obtuvieron 280 alícuotas de 100 mL cada una. Las alícuotas similares se agruparon mediante CCF y se obtuvieron 11 fracciones.

Las fracciones C1-3 y C1-4 de la primera cromatografía fueron similares, lo cual se corroboró mediante CCF. De ellas se realizó una segunda cromatografía, para continuar con el aislamiento, obteniendo un total de 142 alícuotas de 50 mL cada una, las cuales se agruparon mediante CCF para obtener un total de 12 fracciones. Las características de obtención, así como el rendimiento de las fracciones mencionadas se muestran en los cuadros 13 y 14.

Cuadro 13. Fracciones de la primera cromatografía en columna de la PM.

Fracción	Alícuotas	Fase móvil	Rendimiento (g)
C1-1	1-3	AcOEt	1.85
C1-2	4-15	AcOEt y AcOEt:MeOH (9:1)	1.85
C1-3	16	AcOEt:MeOH (9:1)	1.02
C1-4	17-36	AcOEt:MeOH (9:1); (8:2)	4.84
C1-5	37-57	AcOEt:MeOH (8:2)	1.84
C1-6	58-100	AcOEt:MeOH (7:3)	6.85
C1-7	101-151	AcOEt:MeOH (7:3)	7.47
C1-8	152-169	AcOEt:MeOH (7:3); (6:4)	2.41
C1-9	170-213	AcOEt:MeOH (6:4)	7.56
C1-10	214-259	AcOEt:MeOH (6:4); (5:5)	14.86
C1-11	260-280	MeOH	7.76

Cromatografía realizada a partir de 85 g de la PM.

Cuadro 14. Fracciones de la segunda cromatografía en columna

Fracción	Alícuotas	Fase móvil	Rendimiento (g)
C1-1	1-16	Cloroformo	0.03
C2-2	17-18	Cloroformo y Cloroformo:MeOH (9:1)	0.03
C2-3	19-30	Cloroformo:MeOH (9:1); (8:2)	0.13
C2-4	31-37	Cloroformo:MeOH (8:2)	0.11
C2-5	38-40	Cloroformo:MeOH (8:2)	0.20
C2-6	41-62	Cloroformo:MeOH (8:2); (7:3)	0.86
C2-7	63-86	Cloroformo:MeOH (7:3)	0.73
C2-8	87-101	Cloroformo:MeOH (7:3); (6:4)	0.41
C2-9	102-108	Cloroformo:MeOH (6:4)	0.50
C2-10	109-123	Cloroformo:MeOH (6:4); (5:5)	0.62
C2-11	124-134	Cloroformo:MeOH (5:5)	0.55
C2-12	135-142	Cloroformo:MeOH (5:5) y MeOH	0.51

Cromatografía realizada a partir de 5.5 g de las fracciones C1-3 y C1-4, derivadas de la cromatografía 1.

b) Caracterización general de los constituyentes de las fracciones obtenidas de las separaciones cromatográficas

La reacción con cloruro férrico reveló la presencia de compuestos fenólicos en todas las fracciones. El análisis del contenido total de fenoles mostró que las fracciones de la cromatografía 1 presentaron mayor porcentaje de fenoles totales, en comparación con las de la cromatografía 2 (figura 19). La fracción número tres de la primer cromatografía mostró el mayor contenido de fenoles (80.32 %).

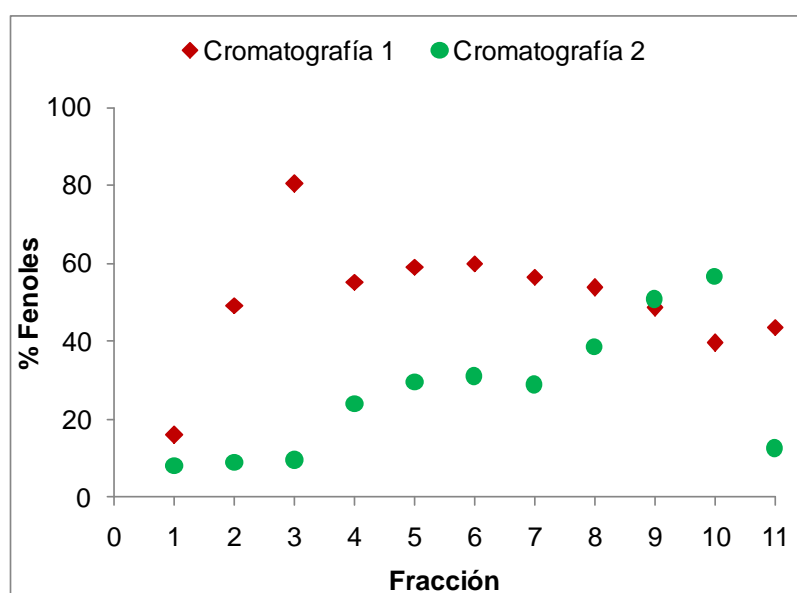


Figura 19. Contenido total de fenoles de las fracciones de las cromatografías realizadas a la PM de *B. morelensis*.

En el análisis por HPLC-fase reversa de las fracciones de ambas cromatografías se observaron entre 3 y 12 picos en los cromatogramas. Las fracciones más sencillas de la cromatografía 1 fueron la 6, 7, 8 y 10, cada una constituida por tres compuestos. De la segunda cromatografía, las fracciones más sencillas fueron la 2 y 8, mostrando únicamente dos constituyentes (cuadros 15 y 16).

Cuadro 15. Tiempos de retención (min) de los constituyentes químicos de las fracciones de la cromatografía 1. HPLC-fase reversa. DAD ($\lambda=260$ nm).

No. constituyente	Fracción										
	C1-1	C1-2	C1-3	C1-4	C1-5	C1-6	C1-7	C1-8	C1-9	C1-10	C1-11
1	2.669	2.672	2.672	2.665	2.590	2.593	2.594	2.599	2.609	2.611	2.622
2	3.233	3.229	3.235	3.232	3.134	3.035	3.039	3.051	3.059	3.064	3.058
3	4.144	4.134	4.151	4.125	4.488	3.126	3.119	4.508	3.153	3.150	3.844
4	4.897	4.888	4.914	4.521	4.907				3.787		4.512
5	5.294	5.274	5.323	4.910	5.160				4.473		5.202
6	5.826	5.830	5.864	5.739	5.969				5.167		5.505
7	6.890	6.868	6.935	6.871	8.172						5.990
8	7.573	7.558	7.592	9.308							7.013
9	8.423	8.399	8.188								8.246
10	12.467	12.490	12.042								
11			12.542								

Cuadro 16. Tiempos de retención (min) de los constituyentes químicos de las fracciones de la cromatografía 2. HPLC-fase reversa. DAD ($\lambda=260$ nm).

No. constituyente	Fracción										
	C2-1	C2-2	C2-3	C2-4	C2-5	C2-6	C2-7	C2-8	C2-9	C2-10	C2-11
1	2.420	2.610	2.119	2.597	2.594	2.596	2.586	2.585	2.580	2.588	2.587
2	2.615	4.442	2.620	3.030	3.112	3.109	3.047	3.010	2.997	3.041	3.039
3	3.309		4.271	3.758	3.757	3.750	4.435		4.315	3.747	3.729
4	3.856		5.363	4.352	4.006	4.347				4.358	4.318
5	4.128		6.075	5.013	4.325	4.693				6.733	6.657
6	4.861		6.384	5.632	4.946	4.988					
7	5.348		10.801	10.175	5.528	5.637					
8	6.105		11.648		6.684	7.753					
9	6.336		13.551		7.621	9.939					
10	7.012				8.828						
11	10.935				9.834						
12	11.778										

2.2. Actividad biológica

a) Actividad antioxidante

En la evaluación de la actividad antioxidante todas las fracciones de la cromatografía 1 mostraron la capacidad de reducir al radical DPPH, con una CA_{50} entre 3.05 y 11.48 $\mu\text{g/mL}$ (figura 20). La fracción menos activa fue la C1-1, ya que presentó una CA_{50} de 11.48 $\mu\text{g/mL}$.

Por otra parte, de la segunda cromatografía, ocho fracciones mostraron actividad antioxidante (figura 21). La fracción C2-9 mostró la CA_{50} menor, con 1.48 $\mu\text{g/mL}$, siendo esta la más activa. Finalmente, la fracción C2-4 fue la menos activa con una CA_{50} de 15.17 $\mu\text{g/mL}$.

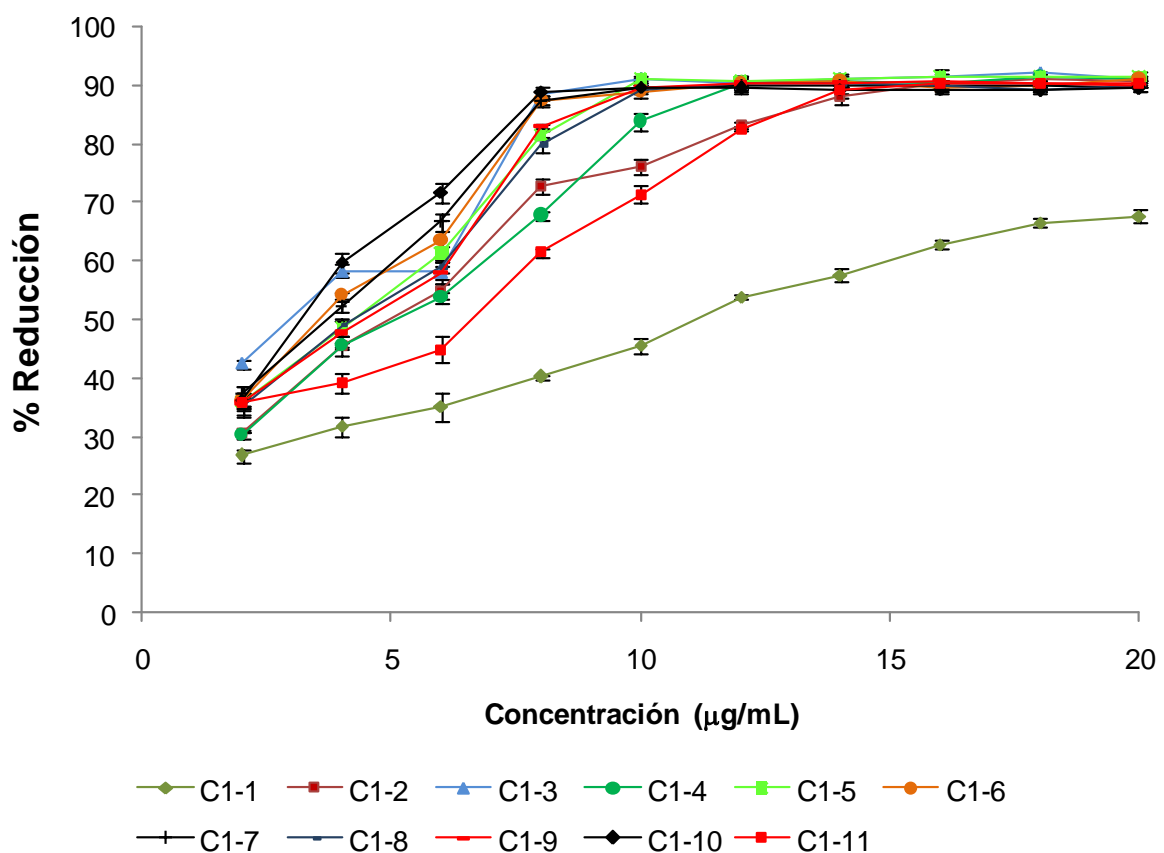


Figura 20. Efecto antioxidante de las fracciones de la cromatografía 1. % Reducción: Porcentaje de reducción del DPPH (equivalente al porcentaje de decoloración del DPPH).

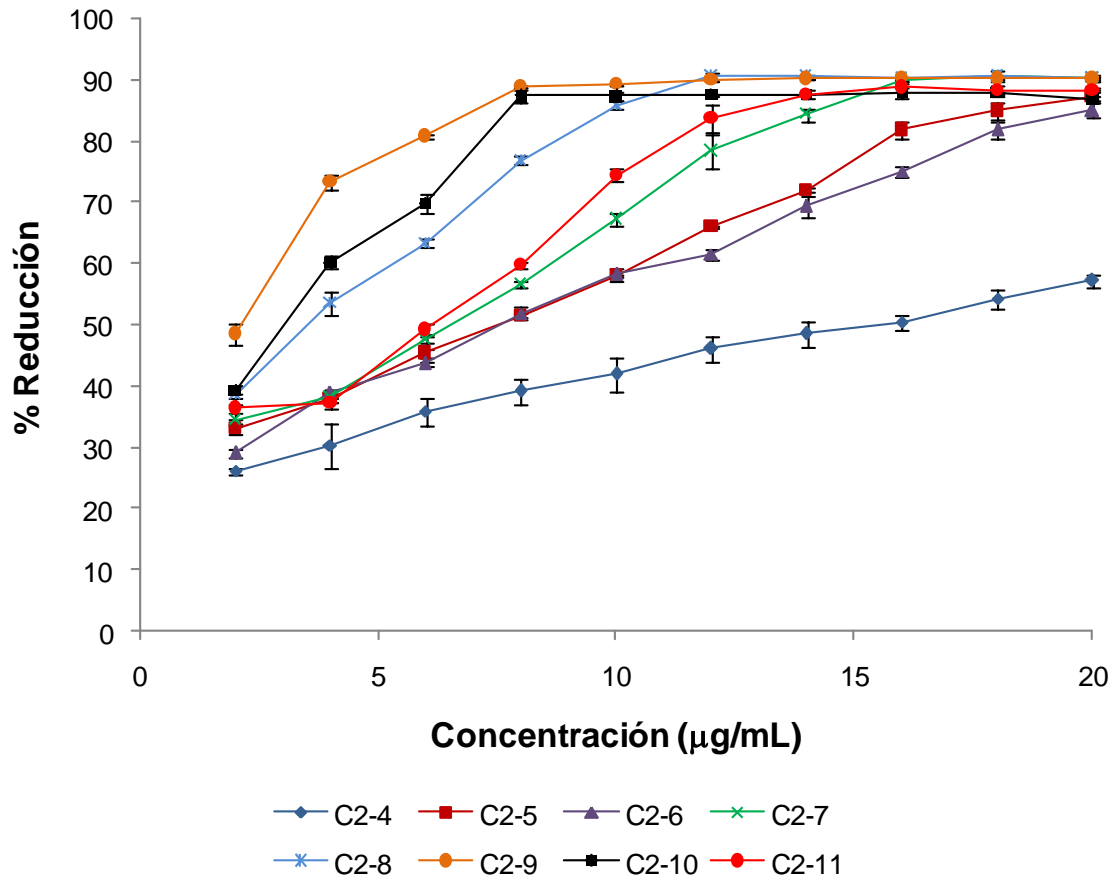


Figura 21. Efecto antioxidante de las fracciones de la cromatografía 2. % Reducción: Porcentaje de reducción del DPPH (equivalente al porcentaje de decoloración del DPPH).

b) Actividad antibacteriana

Los resultados de la actividad antibacteriana de las fracciones de la cromatografía 1 mostraron que todas ellas inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, excepto la fracción C1-1. Las fracciones C1-3 y C1-4 presentaron los halos de inhibición mayores (12.33 ± 0.57 y 12.66 ± 0.57 mm). La fracción que mostró los halos de inhibición menores fue la C1-11 (8.00 ± 0.00 mm) (figura 22a).

Por otra parte, seis fracciones de la segunda cromatografía inhibieron el crecimiento de *S. aureus*. La fracción C2-9 fue la que mostró los halos de inhibición mayores (10.00 ± 0.00 mm), mientras que la fracción C2-5 presentó los menores (6.33 ± 0.57 mm) (figura 22b). En ambos experimentos, el control positivo mostró halos de inhibición muy superiores a los obtenidos por las fracciones evaluadas (24.00 ± 1.00 mm).

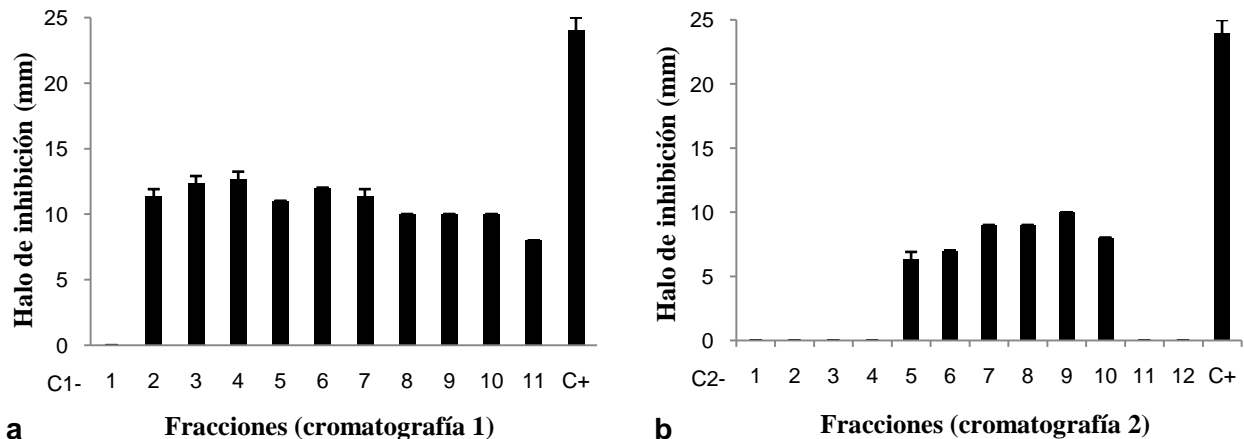


Figura 22. Actividad antibacteriana de las fracciones de las cromatografías sobre *S. aureus*. Simbología. C+: control positivo (cloramfenicol). Los sensibilizadores fueron impregnados con 2 mg de cada una de las fracciones. Los del control positivo se impregnaron con 25 μ g. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.

- ***Correlación entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante y antibacteriana***

Una vez determinado el contenido total de fenoles de las fracciones, los resultados se compararon con los obtenidos de la actividad antibacteriana y antioxidante de éstas; se observó una correlación entre el contenido total de fenoles y la actividad biológica (figuras 23 y 24; cuadro 17).

La actividad antibacteriana de las fracciones de la PM sobre *S. aureus* mostró una relación directa con el contenido de fenoles totales (figura 23) con un coeficiente de correlación de 0.67 y 0.44 para las cromatografías 1 y 2 respectivamente.

Las fracciones con mayor contenido de fenoles mostraron halos de inhibición mayores, siendo las fracciones C1-3 y C1-4 las que mostraron los mayores halos de inhibición (12.66 ± 0.57 y 12.33 ± 0.57 respectivamente), tales fracciones revelan un contenido total de fenoles de 80 y 55 % respectivamente (figura 23a y cuadro 17).

De la cromatografía 2 la fracción C2-9 mostró los halos mayores de inhibición (10 mm), el contenido de fenoles de esta fue de 50 % (figura 23b y cuadro 17). En las fracciones C1-1, C2-1 a C2-4 y C2-11 no se observó efecto antibacteriano, las fracciones mencionadas tienen un contenido total de fenoles entre 7 a 23 %.

Por otra parte, la actividad antioxidante de las fracciones mostró un comportamiento similar, debido a que las fracciones con mayor contenido de fenoles mostraron valores de CA_{50} menores, lo cual quiere decir que se requiere menor cantidad de sustancia para producir el efecto. La correlación mayor entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante la mostraron las fracciones de la cromatografía 1 con un coeficiente de correlación de -0.87. En la cromatografía 2, aunque se observó una relación directa entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante, la correlación fue pobre, con un coeficiente de correlación de -0.59.

La fracción que presentó el mayor efecto antioxidante fue la C1-3 que, como ya se mencionó, contiene 80 % de compuestos fenólicos y mostró una CA_{50} de 3.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (figura 24a y cuadro 17).

De la segunda cromatografía el mayor efecto antioxidante fue observado en la fracción C2-9 con una CA_{50} de 1.43 $\mu\text{g/mL}$ (figura 24b y cuadro 17). Finalmente, las fracciones C2-1 a C2-3 no mostraron efecto antioxidante, tales fracciones poseen un contenido total de fenoles entre 7 a 9 %.

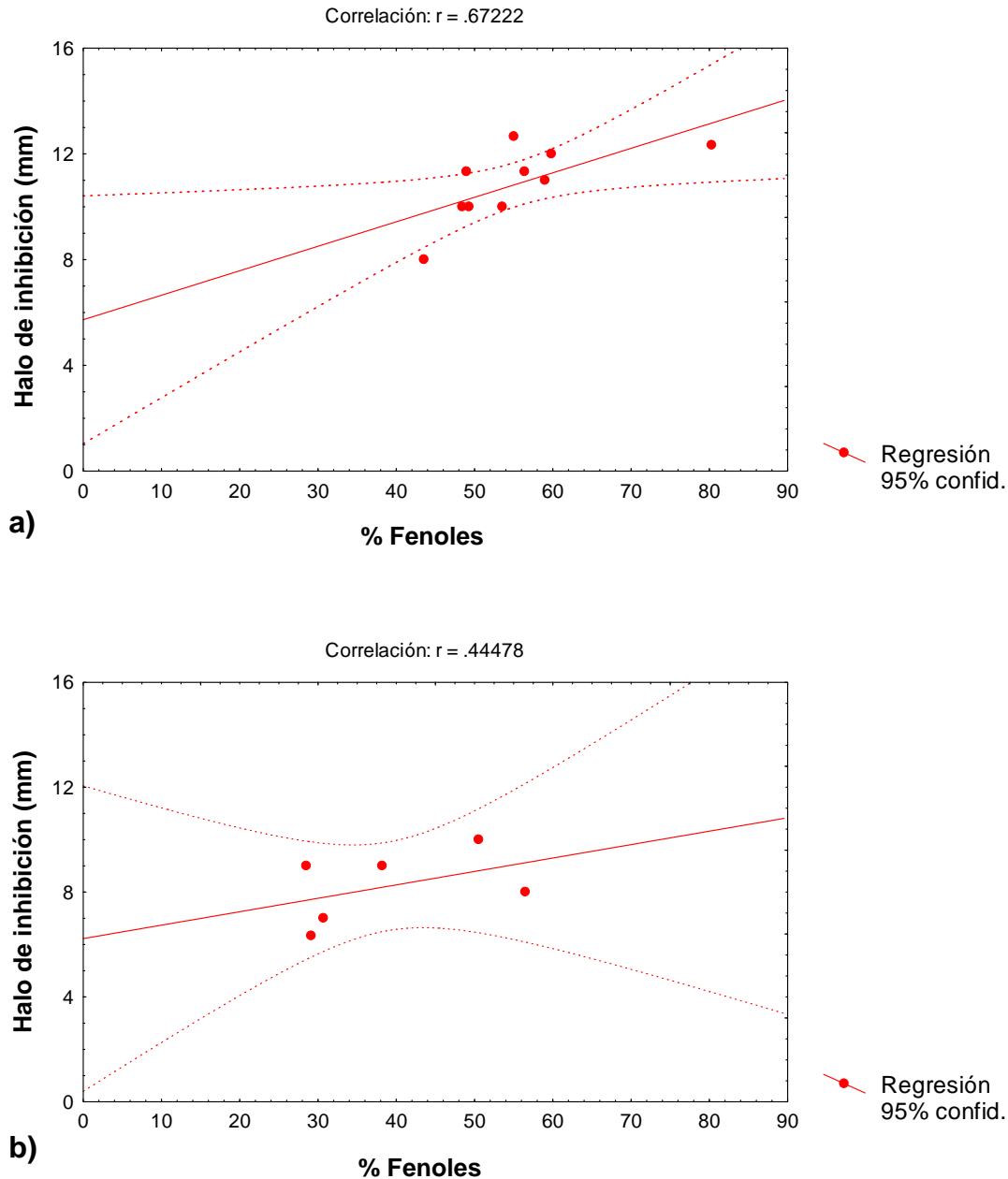


Figura 23. Relación entre el contenido total de fenoles y la actividad antibacteriana (sobre *S. aureus*). a) Fracciones de la cromatografía 1, b) Fracciones de la cromatografía 2.

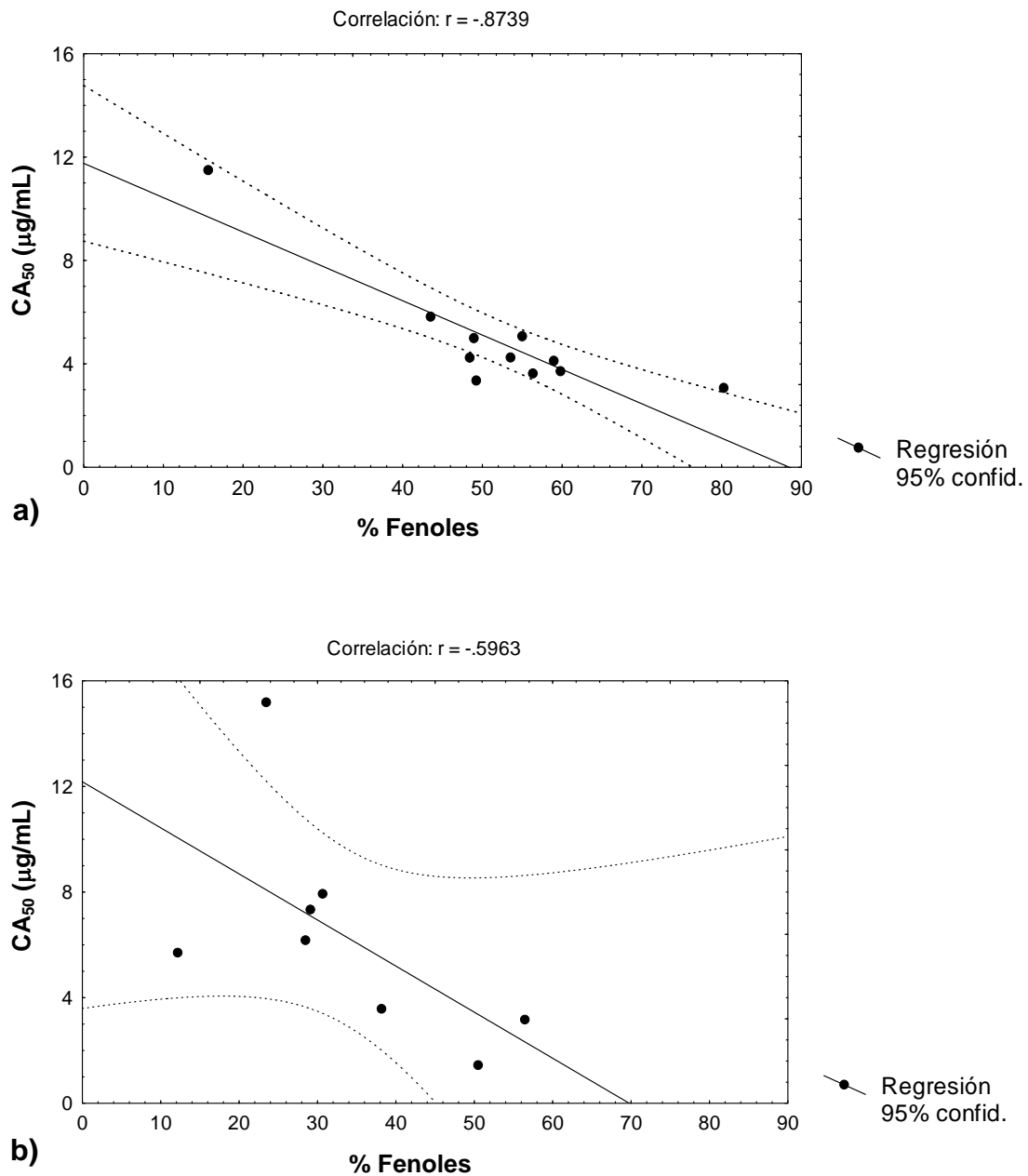


Figura 24. Relación entre el contenido total de fenoles y la actividad antioxidante (reducción del radical DPPH). a) Fracciones de la cromatografía 1, b) Fracciones de la cromatografía 2.

Cuadro 17. Porcentaje de fenoles de las fracciones obtenidas por cromatografía de la PM de *B. morelensis* y su relación con la actividad antibacteriana (sobre *S. aureus*) y con la actividad antioxidante (reducción del radical DPPH).

Fracción	% Fenoles	Halo de inhibición (mm)	CA ₅₀ (µg/mL)
C1-1	15.68	Na	11.48
C1-2	48.99	11.33 ± 0.57	4.98
C1-3	80.32	12.33 ± 0.57	3.05
C1-4	55.05	12.66 ± 0.00	5.05
C1-5	59.02	11.00 ± 0.00	4.10
C1-6	59.85	12.00 ± 0.57	3.70
C1-7	56.41	11.33 ± 0.57	3.61
C1-8	53.59	10.00 ± 0.00	4.23
C1-9	48.47	10.00 ± 0.00	4.22
C1-10	49.30	10.00 ± 0.00	3.34
C1-11	43.56	8.00 ± 0.00	5.81
C2-1	7.64	Na	Na
C2-2	8.68	Na	Na
C2-3	9.21	Na	Na
C2-4	23.51	Na	15.17
C2-5	29.15	6.33 ± 0.57	7.32
C2-6	30.72	7.00 ± 0.00	7.92
C2-7	28.52	9.00 ± 0.00	6.16
C2-8	38.24	9.00 ± 0.00	3.56
C1-9	50.56	10.00 ± 0.00	1.43
C1-10	56.51	8.00 ± 0.00	3.15
C1-11	12.23	Na	5.69

Simbología: CA₅₀: Capacidad antioxidante media, Na: No activa.

c) Efecto cicatrizante

• Método tensiométrico

Respecto a la actividad cicatrizante, todas las fracciones evaluadas mostraron efecto, ya que requirieron mayor fuerza de tensión para abrir las heridas en proceso de cicatrización, comparadas con el grupo control (gel) (figura 25a).

Tanto la PM como las fracciones mostraron mayor efecto cicatrizante en comparación con el fármaco de referencia. El efecto máximo se observó en el tratamiento con la PM y la fracción C1-3, en cuyo caso las heridas requirieron 173 ± 3.38 y 170 ± 4.17 g respectivamente, para ser abiertas, lo que corresponde al 63.14 y 62.04 % de cicatrización ($p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente).

- **Determinación de hidroxiprolina**

En la determinación de hidroxiprolina, las muestras tomadas de los grupos de ratones a los que se les administró la PM y las fracciones C1-3, C1-6 y C2-9 mostraron una mayor concentración equivalente con este aminoácido, en comparación con el control ($p < 0.01$) (figura 25b). La PM y las fracciones C1-3 y C1-6 mostraron mayor concentración de hidroxiprolina que el fármaco de referencia, sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos mencionados. La PM mostró mayor concentración de hidroxiprolina con 157.39 ± 17.45 mg por gramo de tejido seco, lo que corresponde con 15.74 % de hidroxiprolina.

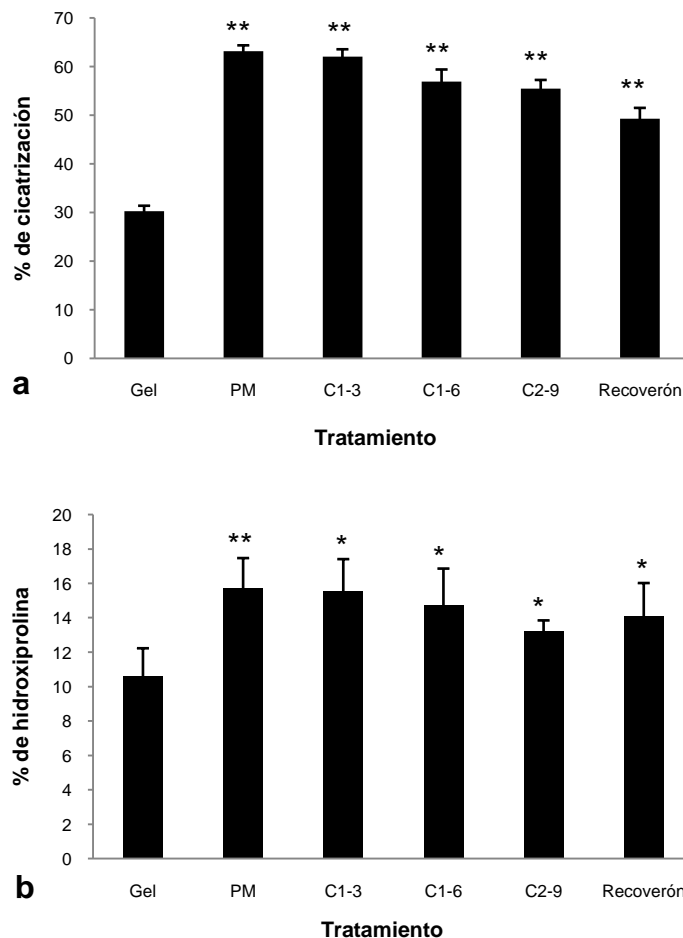


Figura 25. Efecto de la PM y algunas fracciones de *B. morelensis* en piel de ratón lesionada, después de 10 días de tratamiento. a) Método tensiométrico: porcentaje de cicatrización, b) Determinación de hidroxiprolina. Los tratamientos PM, C1-3, C1-6, y C2-9 se administraron al 1% en gel. $n=5$ en cada grupo. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Fase 3.

a) Elucidación de la estructura química de los constituyentes de las fracciones

- *Determinación cualitativa*

La prueba cualitativa para determinar taninos fue positiva a taninos hidrolizables para todas las fracciones analizadas.

- *HPLC-MS de las fracciones C1-3, C1-6 y C2-9*

Los análisis por HPLC-MS revelaron que la fracción más compleja es la C1-3 que posee 20 constituyentes (figura 26a), mientras que las fracciones C1-6 y C2-9 poseen 14 (figuras 26b y 26c respectivamente). Cabe mencionar que la PM posee 24 constituyentes (figura 26d) siendo, como era de esperar, la más compleja de las muestras analizadas.

La PM y la fracción C1-3 mostraron 16 constituyentes similares entre sí, lo cual fue evidente al comparar los TR y los pesos moleculares de estos. Por otra parte, la fracción C1-6 mostró 12 compuestos presentes en la PM (cuadro 18).

- *RMN ¹H de las fracciones C1-3, C1-6 y C2-9 y RMN ¹³C de la fracción C1-3*

Los espectros de RMN ¹H permitieron conocer, de manera parcial, la naturaleza química de los constituyentes de las fracciones, debido a que, al ser una mezcla de compuestos, los espectros indican únicamente las señales principales de tales constituyentes.

El espectro de RMN ¹H de la fracción C1-3 mostró las siguientes señales: a δ 6.6-7.0 ppm se reveló la presencia de protones aromáticos. El espectro también mostró señales de protones de azúcares a δ 3.3 y δ 5.7-5.95 ppm, estas últimas corresponden con los protones anoméricos (figura 27).

Por otra parte, el espectro de RMN ¹H de la fracción C1-6 mostró las señales de protones aromáticos a δ 6.0-7.1 ppm; las señales de los protones de azúcares se observaron a δ 3.3-4.1 ppm. Además, el protón anomérico de los azúcares se observó a δ 4.5 ppm (figura 28).

Finalmente, el espectro de RMN ^1H de la fracción C2-9 mostró las señales de protones aromáticos a $\delta 6.6-7.0$ ppm; las señales correspondientes a los azúcares se observaron a $\delta 3.6-3.8$ y $\delta 3.9-4.1$ ppm y el protón anomérico se observó a $\delta 5.1$ y $\delta 5.3$ ppm (figura 29).

Por otra parte, en el espectro de RMN ^{13}C de la fracción C1-3 se observó la señal del carbono anomérico a $\delta 99.39$ ppm. Además, dos carbonilos correspondientes a dos unidades de galoilo fueron evidentes a $\delta 167.6$ y $\delta 170.58$ ppm. Las señales correspondientes a los carbonos aromáticos se observaron a $\delta 110$, $\delta 115-125$, $\delta 130-139$, $\delta 145-146$ ppm, respectivamente (figura 30).

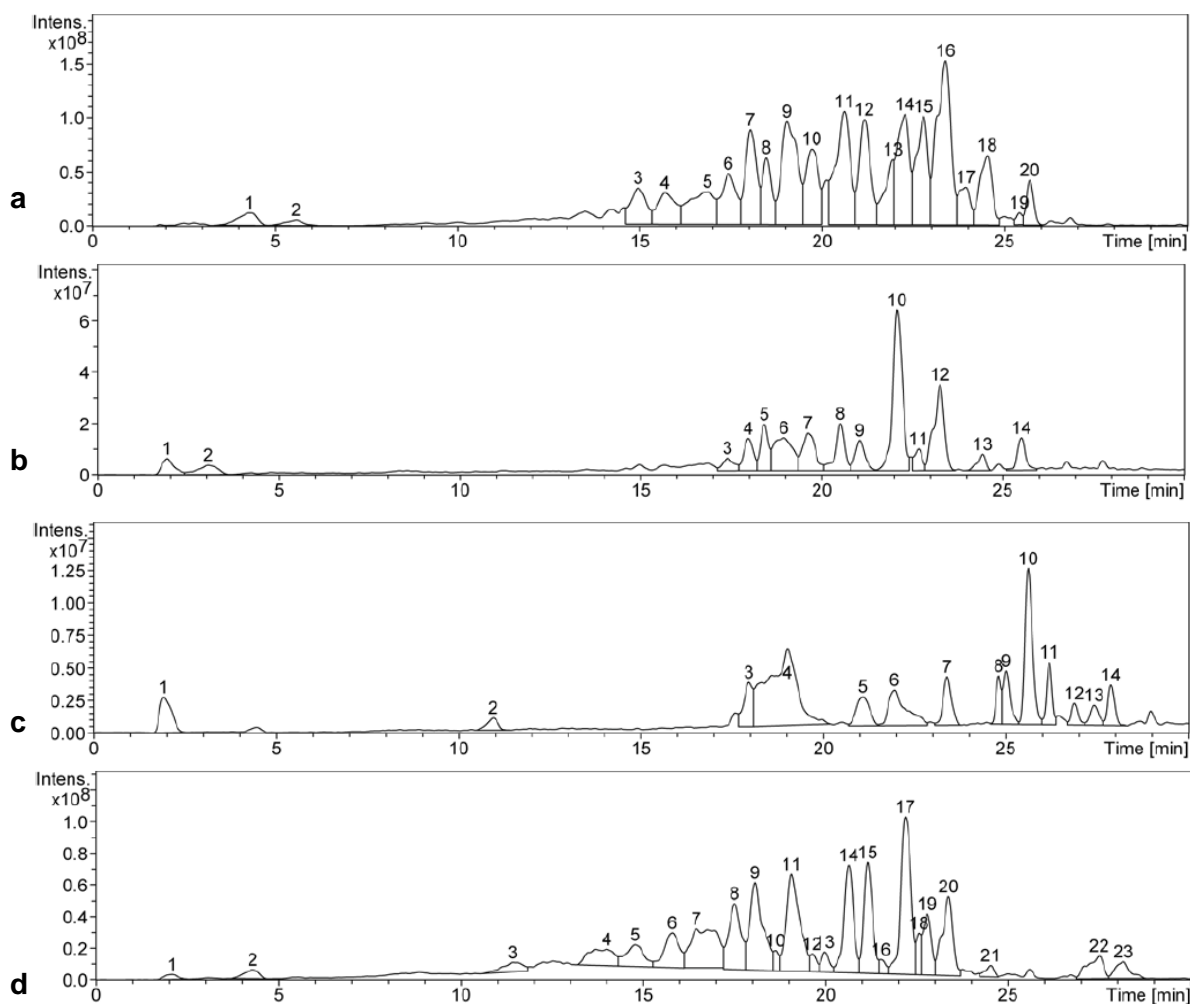


Figura 26. HPLC-MS. a) fracción C1-3, b) fracción C1-6, c) fracción C2-9, d) PM.

Cuadro 18. Tiempo de retención, abundancia y peso molecular de los constituyentes químicos de las fracciones C1-3, C1-6, C2-9 y la PM. HPLC-MS (ESI-trampa de iones).

No. Compuesto	TR (min)				Área				Peso molecular			
	C1-3	C1-6	C2-9	PM	C1-3	C1-6	C2-9	PM	C1-3	C1-6	C2-9	PM
1	4.3 ^a	1.9	1.9	2.1	4.15X10 ⁸	1.47X10 ⁸	6.13X10 ⁷	8.03X10 ⁷	251.1 ^a	365.1	365.1	487.2
2	5.6	3.0	10.9	4.3 ^d	1.71X10 ⁸	1.40X10 ⁸	1.95X10 ⁷	1.64X10 ⁸	251.1	251.1	247.1	251.1 ^d
3	14.9 ^a	17.4 ^b	17.9	11.4	1.00X10 ⁹	1.11X10 ⁸	5.90X10 ⁷	2.44X10 ⁸	535.5 ^a	535.5 ^b	301.1	549.5
4	15.7 ^a	18.0 ^b	19.0	14.0	1.02X10 ⁹	2.36X10 ⁸	3.29X10 ⁸	5.15X10 ⁸	533.5 ^a	517.5 ^b	421.3	549.5
5	16.9 ^a	18.4 ^b	21.1	14.8 ^d	1.45X10 ⁹	2.83X10 ⁸	5.66X10 ⁷	4.88X10 ⁸	533.5 ^a	519.5 ^b	639.5	535.5 ^d
6	17.4 ^a	18.9 ^b	21.9 ^c	15.8 ^d	1.31X10 ⁹	4.74X10 ⁸	9.34X10 ⁷	6.57X10 ⁸	533.5 ^a	421.3 ^b	517.4 ^c	533.5 ^d
7	18.0 ^a	19.6 ^b	23.4	16.5 ^d	1.88X10 ⁹	3.66X10 ⁸	6.01X10 ⁷	1.29X10 ⁹	517.5 ^a	519.5 ^b	363.3	533.5 ^d
8	18.5 ^a	20.5 ^b	24.8	17.5 ^d	1.08X10 ⁹	3.22X10 ⁸	3.68X10 ⁷	9.89X10 ⁸	519.5 ^a	517.5 ^b	589.6	533.5 ^d
9	19.0 ^a	21.0 ^b	25.0	18.1 ^d	2.92X10 ⁹	2.25X10 ⁸	5.52X10 ⁷	1.39X10 ⁹	517.5 ^a	517.5 ^b	381.3	517.5 ^d
10	19.7 ^a	22.1 ^b	25.6	18.6 ^d	1.71X10 ⁹	1.15X10 ⁹	1.75X10 ⁸	1.23X10 ⁸	519.5 ^a	501.5 ^b	803.6	515.4 ^d
11	20.6 ^a	22.7 ^b	26.2	19.1 ^d	2.90X10 ⁹	1.28X10 ⁸	5.36X10 ⁷	1.57X10 ⁹	517.5 ^a	499.5 ^b	645.7	517.5 ^d
12	21.2 ^a	23.3 ^b	26.9	19.6 ^d	2.10X10 ⁹	6.83X10 ⁸	2.18X10 ⁷	1.40X10 ⁸	517.5 ^a	501.5 ^b	493.4	515.5 ^d
13	21.9 ^a	24.4 ^b	27.4	20.0	1.06X10 ⁹	1.02X10 ⁸	2.56X10 ⁷	1.90X10 ⁸	517.5 ^a	501.5 ^b	469.4	533.5
14	22.3 ^a	25.5 ^b	27.9	20.6 ^d	2.41X10 ⁹	2.06X10 ⁸	4.07X10 ⁷	1.26X10 ⁹	501.5 ^a	413.5	521.5	517.5 ^d
15	22.8 ^a			21.1 ^d	2.19X10 ⁹			1.16X10 ⁹	499.5 ^a			517.5 ^d
16	23.4 ^a			21.5 ^d	4.07X10 ⁹			1.06X10 ⁸	501.5 ^a			515.4 ^d
17	23.9			22.2 ^d	7.86X10 ⁸			1.96X10 ⁹	499.5			501.5 ^d
18	24.5 ^a			22.6	1.52X10 ⁹			2.27X10 ⁸	501.5 ^a			499.5 ^d
19	25.4			22.8 ^d	1.21X10 ⁸			6.44X10 ⁸	711.6			499.5 ^d
20	25.7			23.4 ^d	5.82X10 ⁸			1.03X10 ⁹	541.5			501.5 ^d
21				24.5 ^d				1.22X10 ⁸				501.5
22				27.5				4.39X10 ⁸				623.5
23				28.2				2.85X10 ⁸				707.6

Simbología: TR: tiempo de retención; PM: partición metanólica; a: componentes de la fracción C1-3 similares a los de la PM; b) componentes de la fracción C1.6 similares a los de la PM; c: componentes de la fracción C2-9 similares a los de la PM; d: componentes de la PM similares a los de la fracción C1-3.

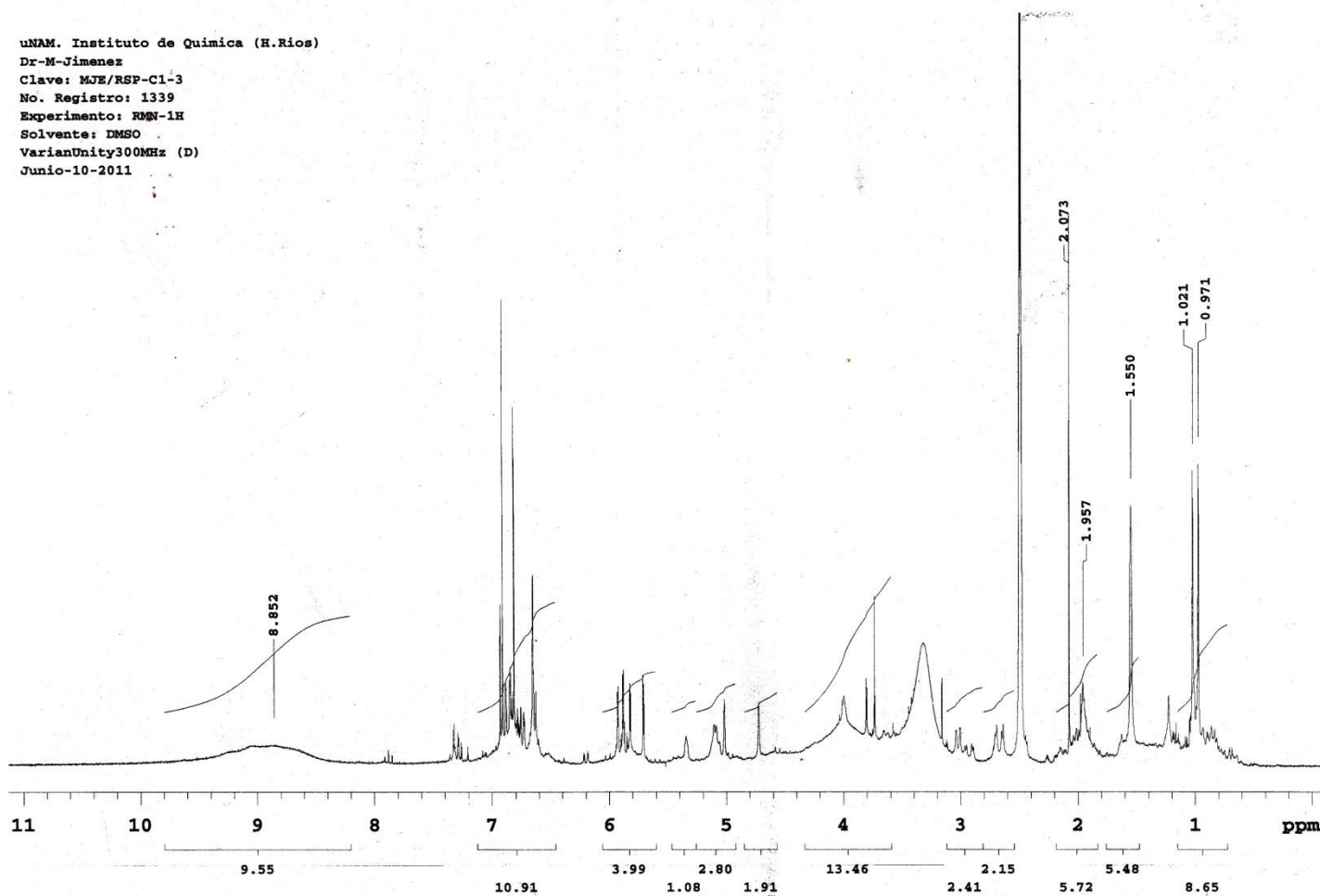


Figura 27. Espectro de RMN ^1H de la fracción C1-3.

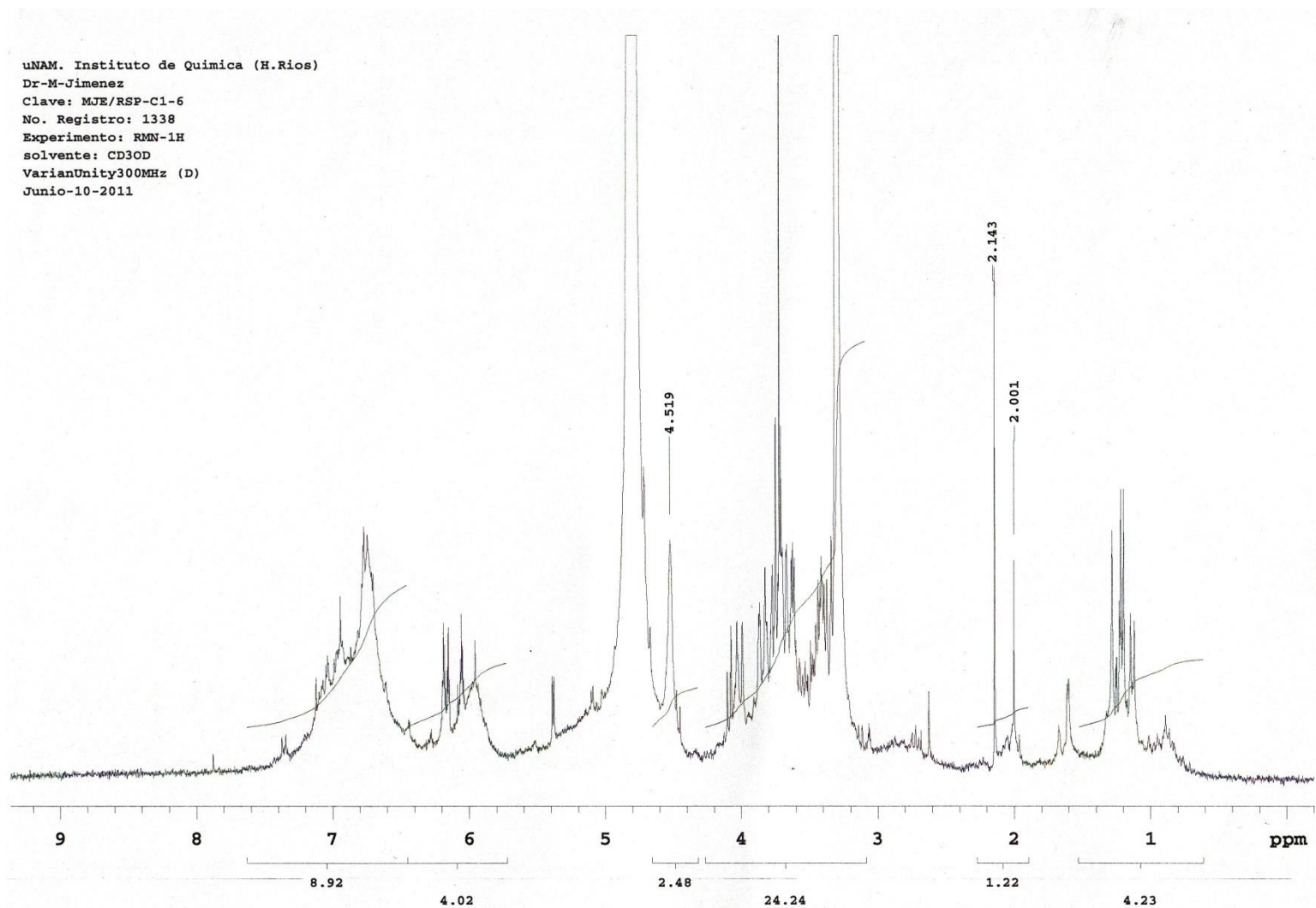


Figura 28. Espectro de RMN ^1H de la fracción C1-6.

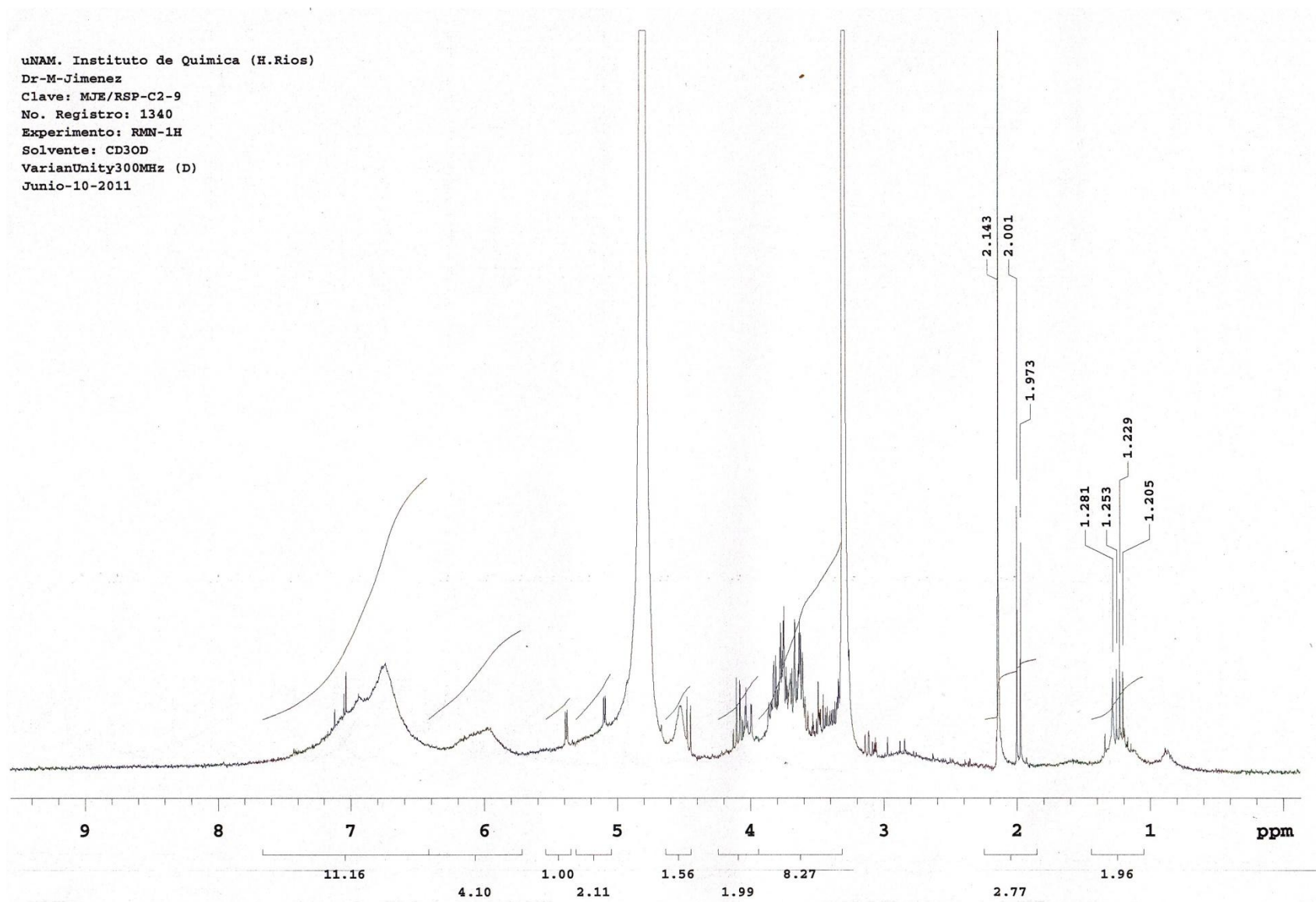


Figura 29. Espectro de RMN ^1H de la fracción C2-9.

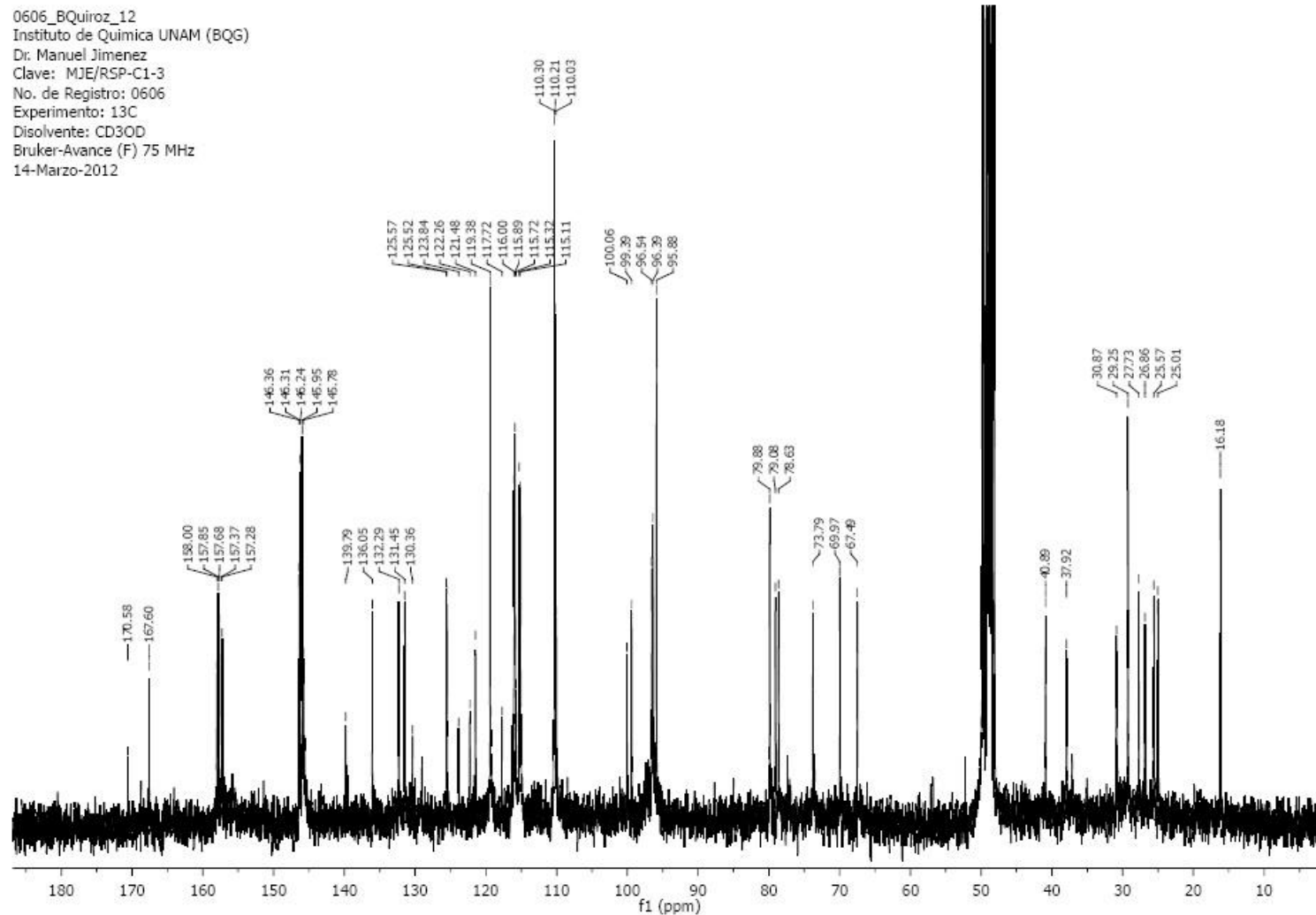


Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción C1-3.

- ***Estructuras probables de los taninos hidrolizables en la fracción C1-3***

En relación a las señales observadas en los espectros de RMN de la fracción C1-3, estas se compararon con las que caracterizan la estructura base de los taninos hidrolizables, aunque en los espectros de RMN de la fracción C1-3 cambian otras señales que no fueron identificadas, ya que la fracción es una mezcla.

La estructura base de los taninos hidrolizables consiste en ésteres de ácido gálico y elágico con un azúcar (generalmente glucosa) (figura 31). Los taninos hidrolizables de la corteza de *B. morelensis*, probablemente sólo cuentan con dos unidades de galoilo lo cual puede proponerse por las dos señales de carbonilo observadas en el espectro de RMN ^{13}C y por el peso molecular de la mayoría de los constituyentes de la fracción (cuadro 18), que en este caso es de 501.5, 517.5 y 533.5 m/z.

Considerando que los análisis para determinar el peso molecular se realizaron mediante HPLC-MS (ESI-trampa de iones) (cuadro 18), y tomando en cuenta que los resultados del método mencionado se refieren al peso molecular de aductos que incluyen la molécula del tanino hidrolizable correspondiente e iones de H^+ y de Na^+ $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^+$, las estructuras propuestas para los taninos hidrolizables de *B. morelensis* se explican a continuación:

En el caso de los taninos con peso molecular de 501.5 m/z, el pico base puede representar un aducto formado por una pentosa (probablemente ribosa) con dos unidades de galoilo, un H^+ y dos Na^+ $[\text{M}+\text{H}+2\text{Na}]^+$ $[454+1+(2\times 23)]$ (figura 32a). Para los taninos con peso molecular de 517.5 m/z, el pico base probablemente esté formado por un aducto constituido por una molécula de ramnosa, dos unidades de galoilo, tres H^+ y dos Na^+ $[\text{M}+3\text{H}+2\text{Na}]^+$ $[468+3+(2\times 23)]$ (figura 32b). En este caso, la estructura propuesta incluye una molécula de ramnosa, que además en el espectro de RMN ^1H tiene un doblete centrado en $\delta 0.99$ ppm, que corresponde con un metilo de la ramnosa.

Finalmente, los taninos con peso molecular encontrado a 533.5 m/z, pueden estar formados por una molécula de glucosa, dos unidades galoilo, tres H^+ y dos iones Na^+ $[\text{M}+3\text{H}+2\text{Na}]^+$ $[484+3+(2\times 23)]$ (figura 32c).

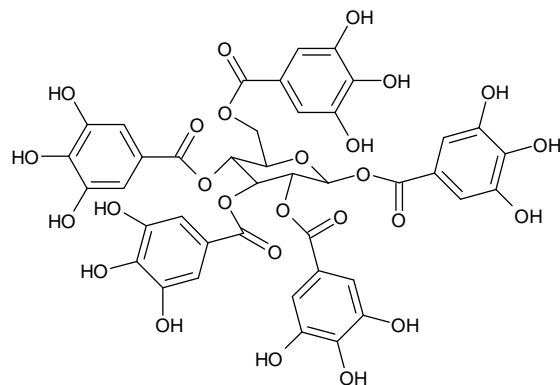


Figura 31. Estructura base de taninos hidrolizables (Penta-O-galoil- β -D-glucosa)

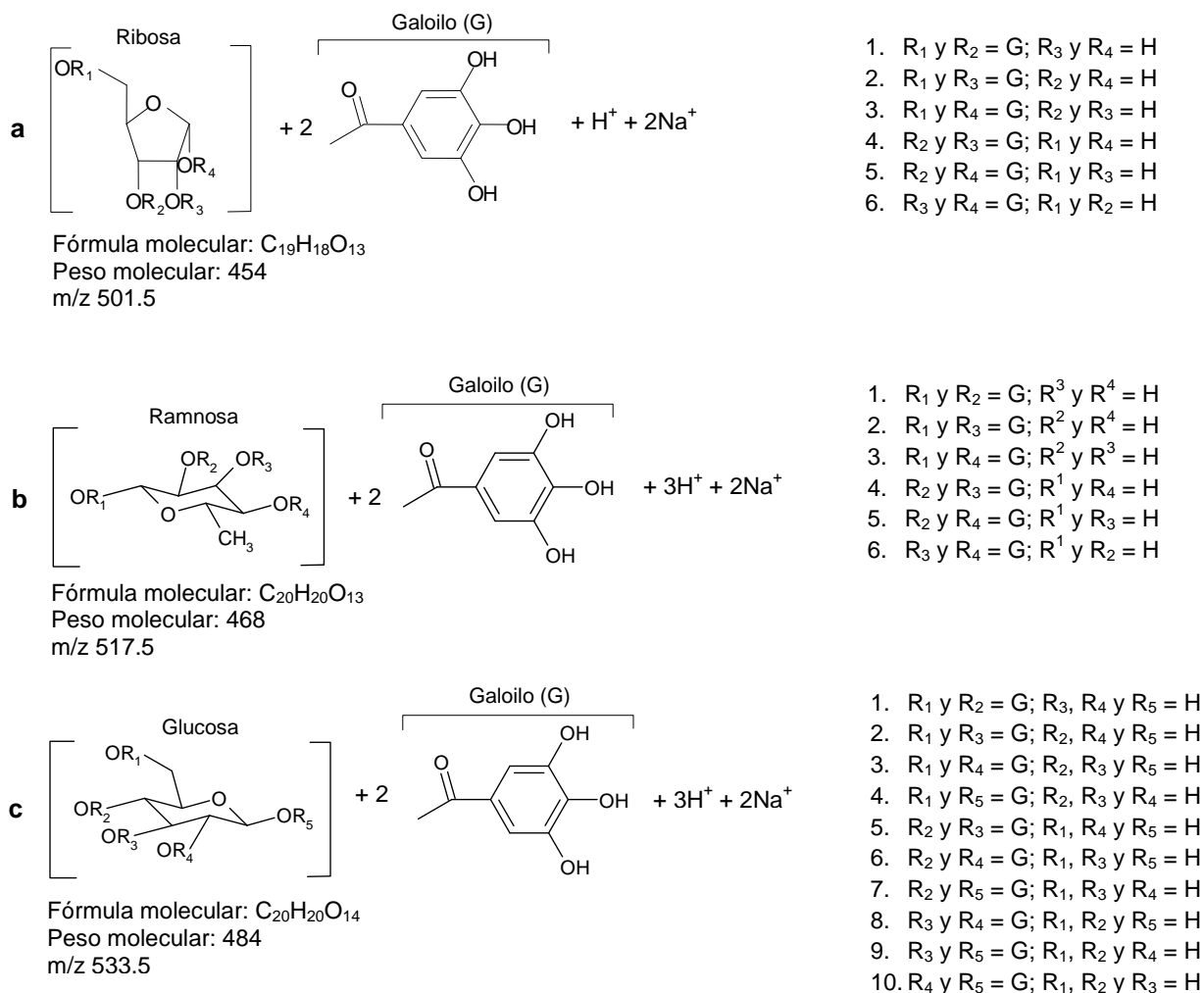


Figura 32. Estructuras probables de los taninos hidrolizables en la fracción C1-3.

Discusión

Las plantas medicinales se utilizan desde la antigüedad para tratar enfermedades y mantener la salud (López y Arroyo, 2008), muchas de ellas han mostrado potencial terapéutico como promotoras de la curación de heridas (Sadaf *et al.*, 2006). En la localidad de San Rafael Coxcatlán la corteza de la especie *Bursera morelensis* es utilizada como cicatrizante. En el presente trabajo se comprobó que la partición metanólica (PM) de la corteza de *B. morelensis* y algunas de las fracciones obtenidas de ella poseen actividad cicatrizante, antiinflamatoria, analgésica, antioxidante y antimicrobiana, y que tales actividades biológicas se deben a su alto contenido de compuestos fenólicos.

Las concentraciones de la PM mostraron mayor porcentaje de cicatrización que el fármaco de referencia. El tratamiento con la concentración al 20 % de la PM fue la más efectiva, ya que las heridas en proceso de reparación tratadas con esta concentración requirieron mayor fuerza para ser abiertas, en comparación con las demás concentraciones incluida la del 30 %, lo que indica que el efecto cicatrizante de la PM no fue dependiente de la dosis y que la aplicación de una concentración alta del extracto puede estar afectando algún mecanismo involucrado en la reparación, lo que fue evidente en el análisis histológico, en donde se observó mayor cantidad de tejido de granulación en los cortes histológicos de las heridas tratadas con el 20 % de la PM, en comparación con las del 30 % (figura 10).

El incremento en la fuerza necesaria para abrir la herida en proceso de reparación, mostrada en los tratamientos evaluados de la PM, probablemente se deba al incremento en la síntesis de colágeno por los fibroblastos, ya que se ha reportado un efecto similar en la evaluación de la actividad cicatrizante con otras especies vegetales, tales como *Aloe vera* L. y *Centella asiatica* L., de las cuales se reportó un incremento en el contenido de colágeno en heridas hechas en ratas y tratadas con los extractos etanólicos de tales especies, en ambos casos se observó un incremento en la fuerza tensil, necesaria para abrir la herida (Chithra *et al.*, 1998; Suguna *et al.*, 1996). Asimismo, se ha reportado una fuerte correlación

entre la formación de fibras de colágeno y la aceleración en la curación de las heridas (Abu-Al-Basal, 2001), debido a que el incremento en el contenido de colágeno contribuye a la reparación (Chinthra *et al.*, 1998).

Este comportamiento fue observado en el tejido de granulación en las muestras histológicas de las heridas tratadas con la PM, donde la mayor cantidad de fibroblastos y acumulación de fibras (probablemente de colágeno) demuestran una aceleración del proceso de cicatrización, comparado con los controles. Asimismo, se observó disminución de la presencia de exudado inflamatorio, lo que corrobora una mayor reparación en las heridas.

La prueba de cicatrización, en la que se permitió la regeneración total del tejido, mostró que a los diez días los animales de los grupos control, fármaco de referencia y 5 % de la PM presentaron la herida cerrada, en comparación con los que fueron tratados con el 10 y 20 % de la PM, en cuyo caso aun mostraron evidencia de costra (figura 11). Este efecto puede deberse a que, en concentraciones altas la PM puede afectar algún mecanismo involucrado en la reparación, lo que causa que la regeneración del tejido sea más lenta. Lo anterior fue evidente en el análisis histológico, en donde se observó la epidermis engrosada y poca o nula presencia de folículos pilosos y glándulas sebáceas en los grupos tratados con el 10 y 20 % de la PM (figura 13).

También se observó la presencia de células satélite debajo de la dermis (figura 12c) en los cortes histológicos de las heridas a las que se les administró la PM al 5 % (a los 5 y 10 días de tratamiento), lo que indica regeneración muscular en el tejido, tales células son la causa de la capacidad de regeneración del músculo esquelético y, con frecuencia, después de una lesión en el tejido muscular se activan y proliferan para originar mioblastos, que son las células encargadas de la formación de tejido muscular (Ross y Pawlina, 2008). El grupo experimental mencionado no presentó costra a los 10 días después del inicio del tratamiento, se observó una cicatriz estética, epidermis y dermis casi regeneradas en su totalidad, así como folículos pilosos y glándulas sebáceas en neoformación. La presencia de estas estructuras sugieren que los tejidos de la piel se han

recuperado y proceden a cubrir con tejido adiposo y pelo la zona restablecida (Méndez *et al.*, 2008).

Al fraccionar la PM, esta mostró mayor efecto cicatrizante que las fracciones evaluadas (C1-3, C1-6 y C2-9), tanto en el porcentaje de cicatrización como en el porcentaje de hidroxiprolina en el tejido de las heridas experimentales, aunque estadísticamente no hubo diferencias significativas en los efectos mencionados (figura 24). Lo que sugiere que existe sinergismo de potencia entre los constituyentes de la PM, lo que favorece la cicatrización de las heridas, pero a medida que se van separando los constituyentes el efecto disminuye.

La hidroxiprolina es un aminoácido muy importante para la síntesis de fibras de colágeno, ya que estabiliza la estructura de la triple hélice del colágeno (MacKay and Miller, 2003). Por esta razón, el contenido de hidroxiprolina se ha usado como un indicador para determinar la velocidad de síntesis del contenido de colágeno (Reddy *et al.*, 2008). Al medir el contenido de este aminoácido, se determinó que la PM y las fracciones cromatográficas incrementaron la producción de colágeno, teniendo un efecto superior al Recoverón.

Cabe mencionar que el proceso de reparación de las heridas agudas profundas se lleva a cabo en un lapso de 21 a 30 días (Calderón, 2001), sin embargo, en el presente trabajo se evaluó la actividad cicatrizante durante los primeros cinco y diez días después del daño, debido a que durante los primeros días existe una mayor velocidad de reparación de la herida, durante este lapso se llevan a cabo los procesos de hemostasis, inflamación y proliferación, posteriormente las heridas continúan con sus etapas normales de acumulación y remodelación de colágeno, para, finalmente, alcanzar una resistencia de aproximadamente el 80 %, con respecto a la piel intacta (Kumar *et al.*, 2005).

En el proceso de reparación de las heridas la respuesta inflamatoria del organismo es inmediata y puede agravarse por infección microbiana. El infiltrado inflamatorio contiene neutrófilos que destruyen a los patógenos mediante la fagocitosis, así como por la liberación de proteasas y especies reactivas de oxígeno (ERO). Sin embargo, una acumulación en exceso de neutrófilos en el sitio

de la lesión, debida a infección microbiana, induce la liberación excesiva de ERO que puede causar estrés oxidativo en el sitio de la lesión y con ello una serie de efectos negativos en todas las fases de reparación de la herida. En el tejido dañado, los neutrófilos activan la producción de ERO a través de la enzima NADPH oxidasa asociada a su membrana; las ERO producen a su vez peroxidación de lípidos de membrana y daño a las proteínas integrales de membrana del edotelio y de los fibroblastos en neoformación (Companioni, 1995; López et al., 2003). En el presente trabajo se evaluó la actividad antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana de la PM, en todos los casos se obtuvieron resultados positivos que tienen implicaciones en el proceso de reparación de las heridas, haciéndolo más eficiente.

En el efecto antiinflamatorio, la PM mostró disminución del edema plantar inducido por carragenina (57.9 %) y disminución del número de neutrófilos que migran a la cavidad peritoneal (28.01 %) en las dosis evaluadas (25 y 50 mg/kg), mediante un efecto dependiente de la dosis (figuras 14 y 15). Por lo anterior, la PM de *B. morelensis* puede utilizarse como un agente antiinflamatorio potencial, probablemente como un fitofármaco, ya que la dosis necesaria para disminuir el edema es relativamente baja, comparada con otros trabajos donde se evalúa la actividad antiinflamatoria de otras especies vegetales, donde se utilizan dosis mucho mayores, tal es el caso de Tillán *et al.*, (2002), quienes evaluaron extractos de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) y utilizaron dosis del extracto etanólico de hasta 1000 mg/kg de peso, obteniendo un efecto de inhibición del edema de 64.69 %. Por otra parte Vázquez *et al.*, (1996) evaluaron la inhibición de la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal de extractos obtenidos de *Aloe vera* con dosis mayores a las probadas en este trabajo, (hasta 600 mg/kg del extracto etanólico), obteniendo un efecto máximo de 48 % de inhibición de la migración de neutrófilos.

El mecanismo de acción antiinflamatoria de la PM puede atribuirse a la inhibición de algunos mediadores químicos de la inflamación como las prostaglandinas y los leucotrienos, ya que Vinegar *et al.*, (1969) y Heller *et al.*, (1998), mencionan que el desarrollo del edema plantar en rata, después de la

inyección de carragenina, se debe a la liberación de mediadores químicos como las prostaglandinas. Así mismo, Higgs *et al.*, (1979) mencionan que los agentes antiinflamatorios que tienen un efecto sobre la inhibición de la migración de neutrófilos poseen un mecanismo de acción sobre la vía de liberación del ácido araquidónico, que es el sustrato por el cual se sintetizan las prostaglandinas.

Otra evidencia que indica que probablemente la PM actúa sobre la inhibición de las prostaglandinas, es que estas moléculas, además de desempeñar un papel en la quimiotaxis de los neutrófilos y los fibroblastos en la inflamación aguda (Kumara *et al.*, 2007), son las responsables de la fiebre y el dolor (Pradilla *et al.*, 2004). En tal caso, un compuesto que inhiba la síntesis de prostaglandinas puede ser considerado un analgésico. En el presente trabajo la PM mostró actividad analgésica al disminuir el número de contorsiones abdominales en los ratones, mediante un efecto dependiente de la dosis (figura 16). La administración de 50 mg/kg de peso disminuyó significativamente el número de contorsiones, comparadas con el control.

Durante el proceso inflamatorio los leucocitos del infiltrado inflamatorio liberan ERO, que en cantidad excesiva pueden dañar la matriz extracelular (MEC) recién formada en la herida (Mensah *et al.*, 2001), además de tener una serie de efectos negativos en todas las fases de la reparación y causar daño a los fibroblastos (Phan *et al.*, 2001). En este trabajo los resultados de la actividad antioxidante, mostraron que la PM puede disminuir la cantidad de ERO en la herida, ya que mostró efecto antioxidante sobre el radical DPPH con una CA_{50} menor que la mostrada por la quercetina (3.05 $\mu\text{g/mL}$ (PM); 4.45 $\mu\text{g/mL}$ (quercetina)) (figura 17). Por otra parte, todas las fracciones de la primera cromatografía y ocho de la segunda mostraron reducción del radical DPPH, de esta última la fracción C2-9 presentó la CA_{50} menor (1.43 $\mu\text{g/mL}$). Cabe destacar que varias fracciones, de ambas cromatografías mostraron una CA_{50} menor que el estándar de referencia (quercetina), ya que éste posee una CA_{50} de 4.45 $\mu\text{g/mL}$ (figura 21). Estos resultados indican que la mezcla de constituyentes de las fracciones evaluadas es más efectiva que el estándar de referencia, lo que sugiere que los constituyentes de las fracciones pueden estar actuando de manera sinérgica.

Los resultados de la actividad antioxidante son relevantes, al relacionarlos con el probable efecto cicatrizante de las fracciones obtenidas de las cromatografías, debido a que las ERO pueden interferir en el proceso de cicatrización produciendo efectos dañinos en las células y tejidos (Aliyeva *et al.*, 2004), tales como lipoperoxidación de los fosfolípidos de las membranas, daños al DNA y a las proteínas, incluyendo inactivación de enzimas, entre ellas las antioxidantes. A este respecto, se ha mencionado que la aplicación tópica de compuestos con propiedades antioxidantes muestran una mejora significativa en la curación de las heridas y en la protección a los tejidos contra el daño oxidativo (Thiem y Grosslinka, 2003).

Como se mencionó anteriormente, la cicatrización también puede verse afectada por agentes microbianos. La actividad antibacteriana de la PM contribuye con la cicatrización mediante la eliminación de los agentes patógenos que pueden causar infección en la herida. En el presente trabajo se encontró que las bacterias Gram positivas, que con frecuencia son agentes causales de infecciones de la piel, fueron las más susceptibles, las cuales mostraron valores de CMI de 0.5 mg/mL y de CBM de 1.0 mg/mL (cuadro 10). Aunque estas concentraciones pueden parecer altas, comparadas con las requeridas en los fármacos alópatas utilizados para inhibir el crecimiento bacteriano, tales como el cloranfenicol que inhibe el crecimiento de las poblaciones bacterianas en concentraciones de 1-4 µg/mL, se han reportado estudios en los cuales, algunos compuestos fenólicos conocidos, que se sabe que poseen actividad antibacteriana, presentan valores de CMI muy similares a los obtenidos por la PM, tal es el caso del p-cresol y el 2,6-dimetilfenol, los cuales presentan valores de CMI sobre *S. mutans* de 2.0 mg/mL. Así mismo, la CMI del carvacrol y el timol sobre *S. mutans* es de 0.25 mg/mL (Greenberg *et al.*, 2008).

En las curvas de supervivencia bacteriana, la PM mostró su actividad bactericida en un tiempo menor sobre *V. cholerae* cc, ya que disminuyó su población en 99.9% tres horas después de aplicar el tratamiento (CBM de la PM) al inóculo bacteriano. A diferencia de *S. aureus*, cuya población decae en 99.9 % a las 24 horas después de aplicar el tratamiento (figura 18). Para ambas bacterias

se presentó una curva de supervivencia de tipo impactos múltiples, lo que sugiere que la PM puede actuar sobre varios mecanismos involucrados en la proliferación celular bacteriana y provocar alteraciones en distintas vías metabólicas, antes de perder su viabilidad.

La actividad antibacteriana de las fracciones se evaluó sobre *S. aureus*, debido a que esta es una de las bacterias que produce infecciones en las heridas de la piel con mayor frecuencia (Brunicardi *et al.*, 2006; Vowden *et al.*, 2008). Los resultados mostraron que todas las fracciones de la cromatografía 1 inhibieron el crecimiento de la bacteria, excepto la fracción C1-1, y mostraron halos de inhibición mayores que los obtenidos por las fracciones de la segunda cromatografía (figura 22). Estos resultados indican que probablemente los constituyentes de las fracciones de la cromatografía 1 actúen sinérgicamente sobre el crecimiento bacteriano mostrando su actividad.

El control positivo (cloranfenicol) mostró los halos de inhibición mayores, en una concentración mucho menor (25 µg/disco), en comparación con las fracciones de las dos cromatografías (2 mg/disco), lo anterior se debe a que éste es un antibiótico de amplio espectro muy potente, del cual se conoce bien su mecanismo de acción que consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas, este efecto es producido en concentraciones de 8 µg/mL (Goodman y Gilman, 1996).

En cuanto a la actividad antifúngica la CI_{50} y la CFM de la PM, fueron de 0.78 y 1.5 mg/mL respectivamente. Estas concentraciones son mayores que las mostradas por el fármaco de referencia (ketoconazol), el cual mostró valores de CI_{50} y CFM de 0.875 y 0.972 µg/mL respectivamente (cuadro 12). Lo anterior puede explicarse porque el ketoconazol es un antimicótico de amplio espectro, constituido por un solo compuesto y la PM es una mezcla de compuestos, entre los cuales hay interacciones que probablemente estén afectando la actividad por antagonismo de sus constituyentes; o bien que el o los constituyentes responsables de la actividad se encuentren en concentración muy baja.

La actividad antimicrobiana (antibacteriana y antifúngica) se relaciona directamente con el proceso de cicatrización debido a que, al inhibir el crecimiento

de los microorganismos en la herida, se prevé la infección de la misma, lo que permite que el proceso de reparación de la piel se lleve a cabo de manera adecuada.

En lo referente al estudio fitoquímico, la PM mostró que 50 % de sus constituyentes son compuestos fenólicos, además las fracciones resultantes de las separaciones cromatográficas también revelaron la presencia de un alto porcentaje de compuestos fenólicos (hasta 80 % de fenoles en la fracción C1-3 y 56 % en la fracción C2-10) (figura 19) los cuales corresponden a fenilpropanoides, principalmente flavonoides.

Por otra parte, los análisis por HPLC-MS (ESI-trampa de iones), RMN ^1H y RMN ^{13}C , efectuados a las fracciones más activas, revelaron que éstas están constituidas por una mezcla de taninos hidrolizables. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Dey y Harbone (1989), quienes mencionan que los fenoles son un grupo de compuestos encontrados en abundancia en las cortezas vegetales, estos pueden ser fenoles simples, ácidos fenólicos, cumarinas, estilbenos, flavonoides, lignanos y taninos.

Los resultados del análisis por HPLC-MS (ESI-trampa de iones) revelaron que sus constituyentes poseen un peso molecular entre 251 y 711 m/z (cuadro 18), este rango se encuentra dentro del reportado para taninos hidrolizables (Otero e Hidalgo, 2004). Cabe hacer notar que tanto la PM como la fracción C1-3 fueron las más complejas, al presentar un mayor número de constituyentes y que esa complejidad les proporciona mayor efecto biológico relacionado con una mayor actividad cicatrizante, antibacteriana y antioxidante; estas actividades se deben a un efecto sinérgico entre los constituyentes de la mezcla.

Los análisis de los espectros de RMN ^1H y de RMN ^{13}C de la fracción C1-3 mostraron señales características similares con la estructura base de los taninos hidrolizables (figura 31). En este caso se trata de moléculas de azúcar con dos unidades de galactosa (figura 32), lo cual fue evidente en el espectro de RMN ^{13}C (que muestra dos señales de carbonilo). Estas señales concuerdan con el peso molecular obtenido por HPLC-MS, correspondientes con aductos que incluyen una

molécula de tanino hidrolizable más iones H^+ y de Na^+ $[M+H+Na]^+$; al efectuar los análisis por HPLC-MS con la técnica ESI-trampa de iones, el peso molecular resultante incluye los iones mencionados con las moléculas analizadas en una interacción débil, no covalente.

Los pesos moleculares encontrados con la técnica empleada, sugieren que los taninos hidrolizables en la fracción C1-3 incluyen azúcares como ribosa, ramnosa o glucosa con dos unidades de galoilo. Además, los pesos moleculares de los constituyentes de la fracción C1-3 concuerdan con algunos de la fracción C1-6 y de la PM (cuadro 18), lo que indica que las muestras mencionadas poseen compuestos similares a los que se proponen, dado el análisis que hemos hecho, aunque la estructura precisa de estos componentes en las fracciones activas queda por ser confirmada, debido a que estos análisis se efectuaron considerando que son mezclas, pero finalmente se puede establecer que son taninos hidrolizables de los tipos mostrados en la figura 32.

Los resultados del presente trabajo contribuyen al conocimiento fitoquímico de *B. morelensis*, debido a que los flavonoides y taninos no habían sido reportados previamente en esta especie ni en el género *Bursera*, sólo se había mencionado la existencia de lignanos en varias especies del género, incluyendo a *B. morelensis* (Jolad *et al.*, 2006), así como a *B. tonkinensis* (Jutiviboonsuk *et al.*, 2005); *B. microphylla* (Cole *et al.*, 1968), *B. permollis* (Wickramaratne *et al.*, 1995), *B. klugii* (Jolad *et al.*, 1977) y *B. schlechtendalii* (McDoniel and Cole., 1972).

La constitución química de la PM proporciona la actividad biológica de la corteza de *B. morelensis*, particularmente el efecto cicatrizante así como otras actividades biológicas estrechamente relacionadas con el proceso de curación de heridas (antiinflamatoria, analgésica, antioxidante, antibacteriana y antifúngica). Lo anterior concuerda con lo reportado por De Bruyne *et al.*, (1999), Peterson y Dwyer, (2000), Zuanazzi y Montanha, (2004) y Santos y Mello (2004) quienes mencionan que fenoles vegetales como los taninos y los flavonoides poseen propiedades cicatrizantes, antiinflamatorias, antimicrobianas y antioxidantes.

Los taninos pueden promover la cicatrización de las lesiones de la piel por un efecto indirecto, principalmente por su efecto antioxidante; es decir, actúan estabilizando radicales libres y ERO, lo que promueve la contracción de la herida e incrementa la formación de vasos capilares y la proliferación de fibroblastos (Fernandez *et al.*, 2002) y queratinocitos (Deters *et al.*, 2001). Los taninos también actúan mediante inhibición de la liberación del ácido araquidónico, lo que les proporciona propiedades antiinflamatorias (Okuda, 2005), ya que al inhibir la liberación de este también se inhibe la síntesis de otros mediadores químicos de la inflamación como las prostaglandinas y leucotrienos, por lo cual se inhibe, en cierta medida la formación del edema en el sitio de la lesión, favoreciendo la cicatrización (Ferguson y O'Kane, 2004).

El efecto cicatrizante de los taninos de *B. morelensis* también puede deberse a una respuesta mecánica que permite que se forme una película sobre el tejido aislándolo del ambiente, lo que evita que se infecte, además permite la proliferación celular y la formación de colágeno debajo de la herida.

Las propiedades cicatrizantes de los flavonoides se asocian con la inhibición de algunos mediadores químicos de la inflamación, entre ellos las prostaglandinas, el factor de crecimiento epidermal (EFG), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y el mRNA de ciclooxigenasa-2 (COX-2 mRNA) (Talhouk *et al.*, 2007) con lo que la respuesta inflamatoria es inhibida, favoreciendo la cicatrización.

Por lo mencionado, los constituyentes de la PM pudieron actuar a diferentes niveles en las heridas que experimentalmente se les produjeron a los ratones y el efecto cicatrizante pudo ser el resultado de la suma de las actividades biológicas (antiinflamatoria, analgésica, antioxidante, antibacteriana y antifúngica).

Los resultados del presente trabajo contribuyen con nuevos conocimientos, tanto de la composición química, como del efecto cicatrizante de la especie *B. morelensis*, con lo cual se valida su uso medicinal como cicatrizante.

Conclusiones

- La PM de la corteza de *Bursera morelensis* está constituida por 50 % de compuestos fenólicos cuya naturaleza química corresponde a fenilpropanoides, flavonoides y taninos hidrolizables.
- La composición química de la corteza de *B. morelensis* le confiere su propiedad medicinal como cicatrizante.
- El efecto cicatrizante de las concentraciones evaluadas de la partición metanólica no fue dependiente de la dosis; el tratamiento del 20 % fue el más efectivo y se observó una cicatriz más estética en los grupos tratados con el 5 y 10 % de la PM.
- En las muestras histológicas del grupo al que se le administró la PM se observó una mayor cantidad de fibroblastos y mayor acumulación de fibras lo que demuestra una aceleración del proceso de cicatrización.
- En los cortes histológicos de las heridas a las que se les aplicó la PM al 5 %, se observó la presencia de células satélite debajo de la dermis, lo que indica regeneración del tejido muscular.
- Las heridas a las que se les aplicó la PM mostraron mayor concentración de hidroxiprolina (colágeno) y mayor regeneración del tejido.
- La PM mostró efecto antiinflamatorio mediante la disminución del edema plantar inducido por carragenina y la disminución del número de neutrófilos que migran a la cavidad peritoneal mediante un efecto dependiente de la dosis.
- La PM mostró efecto analgésico mediante disminución del número de contorsiones abdominales en ratón.
- La PM y la mayoría de las fracciones de las cromatografías presentaron actividad antioxidante sobre el radical DPPH con una CA_{50} menor que la mostrada por la quercetina, lo que sugiere que sus constituyentes pueden estar actuando mediante sinergismo de potencia.
- La PM y las fracciones obtenidas de ésta poseen actividad antibacteriana, la especie bacteriana más susceptible a la PM fue *Sarcina lutea*. Las fracciones

mostraron efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus*, que es una de las especies que produce infecciones en las heridas con mayor frecuencia.

- La PM mostró actividad bactericida sobre *Vibrio cholerae* cc y *S. aureus* mediante una curva de supervivencia del tipo de impactos múltiples, provocando alteraciones en distintas vías metabólicas de la estructura celular bacteriana.
- La PM de *B. morelensis* mostró efecto antifúngico sobre *Trichophyton mentagrophytes*.
- El efecto cicatrizante de la corteza de *B. morelensis* así como las actividades biológicas evaluadas (antiinflamatoria, analgésica, antioxidante, antibacteriana y antifúngica) validan su uso medicinal como cicatrizante.

Apéndices

Apéndice I

Método de maceración (Domínguez, 1973).

El método de maceración consiste en la obtención del extracto con solventes orgánicos a partir de material vegetal. Para ello se coloca el material vegetal seco y pulverizado en un matraz y se agrega el solvente apropiado, de acuerdo con el extracto que se desea obtener (hexano, acetato de etilo, metanol, etc.). Se deja reposar durante 24 horas, se filtra el extracto y se evapora el exceso de solvente a presión reducida. La extracción se realiza cuantas veces sea necesario para obtener el máximo rendimiento. Finalmente, se permite que el solvente se evapore totalmente, el extracto se pesa y con ello se determina el rendimiento del extracto, expresándolo en gramos.

Apéndice II

Método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965)

El método de Folin-Ciocalteu se utiliza para determinar los fenoles totales en una muestra orgánica. El reactivo de Folin-Ciocalteu tiene una coloración amarilla que, en presencia de un fenol, se torna azul. La intensidad del color azul se mide espectrofotométricamente a 760 nm. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico que es utilizado como estándar de referencia.

En el presente trabajo el método se llevó a cabo de la siguiente manera: se preparó una curva de calibración con ácido gálico, a partir de una solución estándar con una concentración de 0.2 mg/mL, se tomaron las alícuotas correspondientes para obtener diferentes concentraciones de ácido gálico (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL) para un volumen final de 3 mL.

Para el análisis de fenoles totales en el extracto metanólico, la PM y las fracciones cromatográficas, se prepararon soluciones estándar de cada muestra con una concentración de 0.2 mg/mL. Se colocó una alícuota de 750 µL de cada muestra en tubos de ensayo y se agregaron 2.25 mL de agua destilada, para obtener un volumen final de 3 mL a una concentración de 0.05 mg/mL. Se transfirió 1 mL de cada una de las concentraciones (ácido gálico y sustancia a evaluar) a tubos con 6 mL de agua destilada, posteriormente se adicionaron 500 µL del reactivo Folin-Ciocalteu a cada tubo. Después de cinco minutos de incubación, se añadieron 1.5 mL de una solución de Na₂CO₃ (200 g/L) y agua, hasta completar un volumen de 10 mL. Los tubos se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. Cada concentración se determinó por triplicado.

Después del tiempo de reacción, se determinó la absorbancia a 760 nm y se graficó la concentración contra la absorbancia. Para obtener la curva patrón de ácido gálico, se realizó un análisis de regresión lineal y se interpoló la absorbancia de las muestras a evaluar. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco.

Apéndice III

Método tensiométrico (Vargas, 2007)

El método tensiométrico consiste en medir la fuerza requerida para abrir las heridas en proceso de reparación, para ello se utiliza un dinamómetro y los resultados se obtienen en gramos.

La metodología utilizada para el presente trabajo fue la siguiente: se utilizaron 40 ratones machos *Mus-musculus*, de la cepa CD-1 distribuidos al azar, en ocho grupos con 5 ratones cada uno, se marcaron y se pesaron. El gel, utilizado como vehículo para disolver el extracto, se preparó de acuerdo con el método propuesto por Guillermo *et al.*, 2005, con ligeras modificaciones. En primer lugar, se preparó una suspensión coloidal de Carbopol 940 al 1 % en agua desionizada, para un volumen final de 50 mL, se mezcló perfectamente utilizando para ello una batidora, esta solución coloidal tiene un pH de 3.0. Posteriormente, se le agregaron cinco gotas de propilen glicol y finalmente se neutralizó agregando tres gotas de trietanolamina, homogenizando hasta que adquirió características de gel o pH de 6.5. Con este procedimiento se prepararon los tratamientos con las concentraciones que a continuación se describen, para ello los grupos de ratones se formaron como sigue:

- 1) Sin tratamiento.
- 2) Vehículo (control).
- 3) PM al 5 % en gel (P/V).
- 4) PM al 10 % en gel (P/V).
- 5) PM al 20 % en gel (P/V).
- 6) PM al 30 % en gel (P/V).
- 7) Neosporin dérmico (fármaco de referencia).
- 8) Piel intacta.

Una vez formados los grupos de ratones, se les depiló el dorso con un depilatorio comercial (crema Veet para piel sensible). Después de un reposo de 24 horas se anestesiaron por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (45 mg/Kg de peso). Se realizó una incisión de 1 cm de longitud a todos los animales, con la ayuda de un bisturí estéril, la incisión se efectuó considerando todas las capas de la piel (epidermis, dermis e hipodermis) (figura 33a). Las sustancias a evaluar (extractos y controles) se aplicaron tópicamente sobre las heridas, bajo la forma

de gel, en las concentraciones ya mencionadas, para lo cual se utilizaron jeringas de insulina hasta cubrir la herida en su totalidad, para ello se requirió 0.1 mL, tanto de los tratamientos (extractos) como del control negativo (gel solo) (figuras 33b y 33c). El fármaco de referencia (neosporín dérmico) se aplicó con un hisopo estéril, hasta cubrir la herida en su totalidad. Los tratamientos se aplicaron cada 12 horas, durante cinco días.

Los animales fueron sacrificados en una cámara de CO₂ y posteriormente se midió la fuerza, en gramos, requerida para abrir las heridas en proceso de cicatrización, para ello se utilizaron dinamómetros con escalas de 100 y 500 g. Para lograr la medición se utilizaron ganchos de metal, los cuales fueron insertados en la piel periférica a la herida, de ellos se sujetó el dinamómetro que se tensó hasta observar la apertura de la herida y en ese momento se tomó la lectura. Con los datos se calculó la eficacia de cicatrización en porcentaje, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Eficacia de cicatrización (\%)} = [(GC)/GS] \times 100 \quad \text{Donde: GC = gramos en que abre la piel cicatrizada.}$$

$$\text{GS = gramos para abrir la piel sana.}$$

De los resultados obtenidos se calculó la media de cada uno de los grupos y el E.E.M. Para determinar la significancia entre los tratamientos aplicados, se utilizó la prueba “t de Student” para una $p < 0.05$.

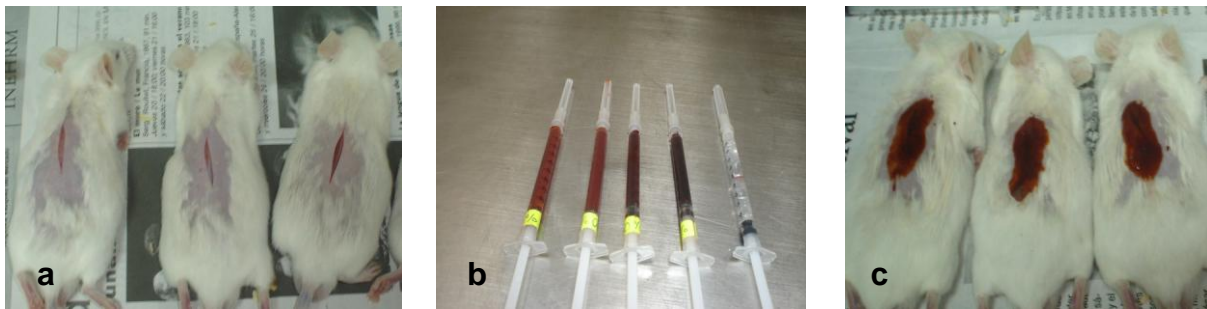


Figura 33. a) Ratones anestesiados donde se observa la incisión que incluye todas las capas de la piel; b) jeringas con los tratamientos de la PM con gel al 5, 10, 20 y 30 % (P/V) y gel solo; c) ratones anestesiados con la incisión hecha y con el tratamiento de la PM en gel al 5%.

Apéndice IV

Estudio histológico (Ross y Pawlina, 2008)

El estudio histológico se efectuó con el método estándar para análisis de muestras histológicas en un experimento por separado. Al igual que para la prueba de cicatrización (apéndice III) se utilizaron ocho grupos de cinco ratones cada uno, a los cuales se les aplicaron los mismos tratamientos y se siguió el mismo protocolo.

Después de sacrificar a los animales se obtuvieron muestras de tejido de las cicatrices experimentales de un área de 2 X 2.5 cm, posteriormente se fijaron en una solución de formaldehído al 10 % con solución salina. Se deshidrataron con soluciones etanólicas al 70, 80, 90, 96 y 100 %, posteriormente se incluyeron en parafina y se cortaron secciones de 5 μ m en un micrótopo, a continuación se hizo el montaje de las muestras en portaobjetos. De cada muestra de piel se montaron tres laminillas con tres secciones de tejido cada una.

De las laminillas se retiró la parafina restante con xilol y se efectuó la tinción con hematoxilina-eosina (H&E), posteriormente se rehidrató el tejido con soluciones de concentraciones decrecientes de etanol (100, 96, 90, 80 y 70%). Finalmente, las muestras se fijaron con entellan (Merck), como medio de montaje y se colocó un cubreobjetos sobre ellas.

Los tejidos se examinaron en un microscopio óptico Olympus 21 con cámara digital. El análisis fue cualitativo considerándose lo siguiente: edema, infiltración de tejido de granulación (leucocitos polimorfonucleares, proliferación de fibroblastos, formación de colágeno), angiogénesis y re-epitelización.

Apéndice V

Edema plantar producido por la administración de carragenina en rata (Vázquez et al., 1996).

El método de edema plantar se utiliza para evaluar las sustancias con actividad antiinflamatoria, se basa en el uso de una sustancia irritante clásica, que causa edema, la carragenina. El modelo involucra la activación de la cascada del ácido araquidónico que da lugar a la síntesis de los principales mediadores de la inflamación: prostaglandinas y tromboxanos. Este método se emplea comúnmente para probar fármacos antiinflamatorios no esteroideos.

El procedimiento se llevó a cabo como se detalla a continuación: para la medición del edema se utilizó un fisiógrafo de mesa, en primer lugar se revisó que el sistema de registro se mantuviera estable, posteriormente se calibró el sistema mediante el uso de volúmenes conocidos de plastilina (esferas de plastilina de 0.5, 1.0 y 2.0 g de peso). Se formaron al azar cuatro grupos de cinco ratas cada uno. Las ratas se marcaron y se pesaron. Posteriormente, se les administraron los tratamientos por vía intraperitoneal. Para este trabajo, se consideraron los siguientes tratamientos:

- 1) Vehículo (control).
- 2) Indometacina (10 mg/Kg de peso) (fármaco de referencia).
- 3) PM (25 mg/Kg de peso).
- 4) PM (50 mg/Kg de peso).

Una hora después de administrarles los tratamientos a los animales, se les inyectó 0.1 mL de carragenina al 1 %, preparada con solución salina estéril al 0.9 %, en la región de la aponeurosis plantar de una de las extremidades posteriores. En la otra extremidad se aplicó un volumen igual de solución salina estéril. Posteriormente, se obtuvo un registro temporal de la formación del edema. El registro consistió en la medición del incremento de volumen en las extremidades tratadas, durante cuatro horas. Las mediciones se tomaron antes y después de aplicar la carragenina, para ello se siguió el método de desplazamiento de mercurio que consiste en medir la presión que ejerce el desplazamiento del mercurio en una columna al introducir las extremidades tratadas con carragenina

(inflamación) y solución salina (control). La columna de mercurio se conectó a un transductor de presión P-1000 A (Narco BioSystems), a su vez interconectado a un amplificador y un sistema de registro, en este caso un fisiógrafo de mesa Mod. DMP-4B (Narco BioSystems).

En el registro previo a la aplicación de carragenina, se tomó en cuenta que las lecturas emitidas por el equipo utilizado, para cada organismo, fueran similares. Posteriormente, se registraron las mediciones, después de aplicar la carragenina, a intervalos de una hora, durante cuatro horas. Finalmente, se determinó la diferencia de volumen, registrada en el fisiógrafo, entre las extremidades posteriores a las que se les administró la carragenina (extremidad derecha: inflamación) y la solución salina (extremidad izquierda: control). La diferencia de volumen entre las extremidades se consideró como el edema producido (en μL).

Apéndice VI

Migración celular a la cavidad peritoneal (Vázquez et al., 1996)

El método de migración celular a la cavidad peritoneal se utiliza para determinar el efecto antiinflamatorio de sustancias o extractos, para ello se hace un conteo de neutrófilos presentes en el líquido peritoneal, extraído después de aplicar un irritante, tomando en cuenta que estas células son las primeras en llegar a una región del cuerpo donde tiene lugar un proceso inflamatorio, ocasionado por un daño tisular físico, químico o biológico. La migración de neutrófilos durante la respuesta inflamatoria resulta, principalmente, de la liberación de factores quimiotácticos por las células residentes, lo cual induce el rodamiento y adhesión de los neutrófilos sobre las células endoteliales.

Para la evaluación de la migración de neutrófilos, se efectuó el siguiente procedimiento: se formaron al azar cuatro grupos de cinco ratas cada uno, se marcaron y se pesaron. Los grupos se integraron como sigue:

- 1) Vehículo (control).
- 2) Dexametasona (1 mg/Kg de peso) (fármaco de referencia).
- 3) PM (25 mg/Kg de peso).
- 4) PM (50 mg/Kg de peso).

Una hora después de aplicar los tratamientos a cada animal, se le administraron 3mL de carragenina (100 µg/mL, preparada en solución salina estéril al 0.9 %) vía intraperitoneal. Después de cuatro horas, los animales se sacrificaron por dislocación cervical, se les lavó la cavidad peritoneal con 10 mL de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), pH= 7.4, conteniendo heparina 5 U/mL y albúmina sérica bovina 0.1 % y se aplicó un masaje en la región abdominal, por espacio de dos minutos aproximadamente. Del líquido peritoneal de cada uno de los animales se recuperaron 5 mL, posteriormente se tomaron muestras de 20 µL, se suspendieron en 400 µL de violeta de genciana diluida en ácido acético, para la cuenta total de leucocitos en la cámara de Neubauer. El volumen restante del lavado peritoneal se centrifugó por tres minutos a 1500 rpm, se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 0.4 mL de seroalbúmina al 0.3 %. Sobre portaobjetos cubiertos con papel filtro, con dos

perforaciones de 5 mm de diámetro, se colocaron una y dos gotas de la suspensión de seroalbúmina en cada perforación. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 h.

Una vez secos, a los portaobjetos se les quitó el papel filtro y se efectuó una tinción sobre las muestras, sumergiendo los portaobjetos en colorante de Wright, durante cinco minutos, posteriormente, se lavaron en agua corriente por tres minutos. En los portaobjetos, así preparados, se hizo el conteo diferencial de leucocitos, que consistió en registrar el número de neutrófilos de los diferentes grupos de leucocitos (por observación microscópica a 100X), para obtener la migración celular hacia la cavidad peritoneal.

Los resultados se expresaron en porcentaje de neutrófilos que migraron a la cavidad peritoneal, registrando el conteo total y diferencial de leucocitos. Finalmente, se calculó la media y el E.E.M. Para determinar la significancia entre los tratamientos aplicados se utilizó la prueba “t de Student” para una $p < 0.05$.

Apéndice VII

Método de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético en ratón (Atta y Alkofahi, 1998)

El método de contorsiones abdominales se utiliza para evaluar el efecto analgésico de las sustancias de interés (compuestos o extractos) y se basa en determinar la eficacia analgésica de una sustancia, después de inducir dolor abdominal, mediante la administración de un irritante.

Para el presente trabajo el método se llevó a cabo de la siguiente manera: se formaron al azar cuatro grupos de ocho ratones cada uno, se marcaron y se pesaron. Los tratamientos se administraron a los animales por vía oral utilizando para ello una cánula. Los tratamientos fueron los siguientes:

- 1) Vehículo (0.1 mL/10 g) (control).
- 2) Indometacina (10 mg/Kg de peso) (fármaco de referencia).
- 3) PM (50 mg/Kg de peso).
- 4) PM (25 mg/Kg de peso).

Después de transcurridos 30 minutos se administró a cada animal, vía intraperitoneal, una solución al 0.6 % de ácido acético (60 mg/Kg de peso). Por ser el ácido acético un compuesto irritante, el propósito de esta operación fue inducir dolor, uno de los síntomas que acompañan al proceso inflamatorio. Como muestra evidente del dolor, el animal exhibió “contorsiones”, las cuales consistieron en comprimir la zona del abdomen contra la superficie de la mesa, proyectando al mismo tiempo las extremidades posteriores hacia atrás (figura 34). El conteo de las contorsiones se efectuó inmediatamente después de administrar el ácido acético, en un periodo de 20 minutos. Con los resultados del conteo de las contorsiones se calculó la media y el E.E.M. Para determinar la significancia entre los tratamientos aplicados, se utilizó la prueba “t de Student” para una $p < 0.05$.

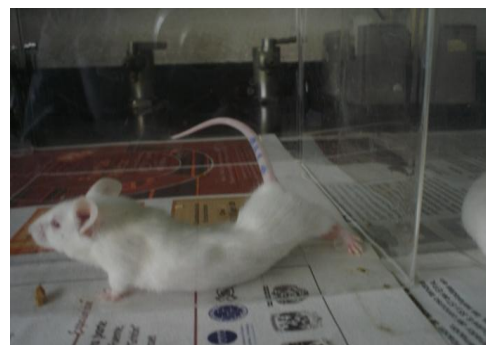


Figura 34. Ratón contorsionándose después de la aplicación de ácido acético (60 mg/Kg de peso corporal).

Apéndice VIII

Reducción del radical DPPH (Método modificado de Murillo, 2006).

El método de reducción del radical DPPH se utiliza para evaluar la actividad antioxidante de las sustancias de interés (compuestos o extractos) y consiste en una reacción de óxido-reducción en la que el radical DPPH se reduce al aceptar un electrón de la sustancia antioxidante. La reacción puede observarse por el cambio de color, de violeta intenso a amarillo claro, que puede medirse espectrofotométricamente a 515 nm.

En el presente trabajo el procedimiento fue el siguiente: en una placa de 96 pozos se adicionaron por triplicado 50 μ l de la PM a diferentes concentraciones (2, 4, 6, 8 y 10 μ g/mL), posteriormente a cada pozo se adicionaron 150 μ L de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final es de 100 μ M. La placa se incubó en la oscuridad y se mantuvo en agitación constante durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se determinó la absorbancia a 515 nm en un lector de ELISA (SLT Spectra ELISA reader). Se determinó el porcentaje de decoloración del DPPH, correspondiente al el porcentaje de reducción. Como estándar de referencia (control positivo) se utilizó quercetina a las mismas concentraciones que los extractos y como control negativo se incluyeron pozos con 200 μ L de metanol. La actividad antioxidante sobre el DPPH se expresó como porcentaje de reducción y se calculó con la siguiente fórmula:

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

Donde:

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

Apéndice IX

Método de difusión en agar de Kirby-Baüer (Método modificado de Koneman et al., 1985).

El método de difusión en agar se utiliza para evaluar cualitativamente la actividad antimicrobiana de sustancias o extractos, los cuales inhiben el crecimiento de los microorganismos al difundirse en el medio que contiene el cultivo de bacterias o levaduras. La inhibición del crecimiento de la población de microorganismos se observa mediante un halo claro en donde no hay microorganismos y representa el espacio en que difundió el extracto o sustancia con actividad antimicrobiana.

Para el presente trabajo el método fue el siguiente: para evaluar la actividad antibacteriana se utilizó como medio de cultivo estándar el agar Mueller-Hinton (Bioxon), para la actividad antifúngica (sobre levaduras) se utilizó como medio de cultivo el agar papa dextrosa; ambos promueven el crecimiento de las poblaciones microbianas a evaluar. Las placas se prepararon con un espesor uniforme de 4 mm de medio de cultivo, lo cual fue importante ya que si es más delgado las sustancias a evaluar tienden a difundir más en dirección lateral, aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; por el contrario, un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

El inóculo de cada especie bacteriana se preparó tocando las superficies convexas de 4 o 5 colonias de microorganismos, se sumergió el asa en 10 mL de caldo Mueller-Hinton, se enjuagó bien en el líquido, para descargar todo el material, y luego se retiró el asa de siembra. Los tubos con los inóculos bacterianos se incubaron a 37 °C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio fuera equivalente al estándar No. 0.5 de McFarland, que equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias por mL.

El cultivo de las bacterias en el medio, se efectuó sumergiendo un hisopo estéril y seco en la suspensión bacteriana, se eliminó el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inoculó la superficie de una placa de agar de Mueller-Hinton a temperatura

ambiente. Es aconsejable, al realizar el cultivo, mantener la tapa de la caja entre abierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar. Finalmente, se sembró mediante estrías en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° después de cada estría. Se permitió que el inóculo se absorbiera en la superficie de la placa y se procedió a aplicar las sustancias, para lo cual se utilizaron sensidiscos de 5 mm de diámetro, hechos de papel Whatman No. 5. Previamente, cada sensidisco se impregnó con 2 mg de las sustancias a evaluar (extracto o PM).

Para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias se colocaron en la superficie del agar manualmente, con la ayuda de una pinza estéril. Como control positivo para los bioensayos, se evaluó la susceptibilidad de las cepas bacterianas a sensidiscos impregnados con 25 µg de cloranfenicol; como control negativo se utilizaron sensidiscos impregnados con 10 µL de los solventes utilizados para la extracción (metanol y hexano), dejándolos evaporar durante 24 horas, al igual que los extractos experimentales.

Las placas se colocaron a 37 °C, sin mayor tensión de CO₂, debido a que en presencia de CO₂, se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del agar, provocando un descenso del pH y el desarrollo de algunos microorganismos es inhibido a pH ácido, lo cual tiende a estrechar falsamente las zonas de inhibición. Asimismo, la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída del pH, produciéndose diferencias en la velocidad de difusión y alteración de la zona de inhibición. Para la interpretación de resultados, la zona de inhibición se midió con una regla calibrada en mm. En todos los casos, la prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio en mm.

Apéndice X

Método de dilución en agar (Método modificado de Koneman et al., 1985).

El método de dilución en agar se utiliza para determinar las concentraciones de los compuestos o extractos que inhiben el crecimiento de los microorganismos de interés (bacterias y levaduras). En bacterias se utiliza para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM); para los bioensayos en levaduras, con éste método se determina la CMI y la concentración fungicida mínima (CFM). La metodología utilizada en este trabajo fue la siguiente.

La evaluación de las concentraciones que inhiben el crecimiento de los microorganismos se llevó a cabo probando diferentes concentraciones del extracto metanólico, la PM y las fracciones obtenidas de las fracciones cromatográficas. Las concentraciones utilizadas fueron 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/mL, las cuales se obtuvieron a partir de una solución patrón, de la que se tomaron las alícuotas que, posteriormente, fueron incluidas en 20 mL de agar Mueller-Hinton a una temperatura de 45 °C con la finalidad de obtener las concentraciones señaladas. Una vez agregada cada concentración del extracto, la mezcla se agitó rápidamente para obtener una dispersión homogénea, se colocaron en cajas petri y se dejaron en reposo, a temperatura ambiente, para permitir la solidificación del agar.

El inóculo consistió en una suspensión de microorganismos; para bacterias tuvo una concentración final de 1.5×10^8 bacterias por mL y para hongos se utilizó un inóculo de 1×10^5 levaduras por mL. Se tomó el inóculo con un hisopo estéril, el cual se sumergió en la suspensión microbiana y se eliminó el exceso de líquido antes de retirarlo, haciéndolo rotar contra la pared interna del tubo que contenía el inóculo, éste se colocó sobre las placas con los extractos a diferentes concentraciones, tocando la superficie del agar por punteo. Este procedimiento se realizó tres veces, las que corresponden a las tres repeticiones.

Como control positivo se utilizaron placas sin extracto y como control negativo se usaron cajas con los diferentes solventes de acuerdo con el volumen de las alícuotas utilizadas.

Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. La interpretación de resultados se realizó considerando como CBM o CFM aquellas concentraciones en la que ya no se observó crecimiento microbiano y como CMI la concentración que antecede a la CBM o a la CFM y que aún mostró crecimiento microbiano, aunque en menor proporción, comparado con el control positivo.

Apéndice XI

Actividad de los extractos herbales sobre la cinética del crecimiento en la población bacteriana (Avila, 1996)

La cinética de crecimiento bacteriano consiste en determinar el comportamiento del crecimiento de los microorganismos a través del tiempo, al ser sometidos a la CBM del extracto, lo que permite determinar el tiempo en que son eliminados por las sustancias o extractos.

La metodología empleada fue la siguiente: el inóculo bacteriano se preparó de acuerdo con el método descrito en el apéndice VIII, a una concentración de 1.5×10^8 bacterias por mL. Los extractos se incluyeron en tubos con caldo Muller-Hinton a una concentración igual a la CBM y sus múltiplos medios, esto es la CMI y la mitad de la CMI. Posteriormente, con una micropipeta se inoculó 0.1 mL de la suspensión bacteriana en los tubos con las diferentes concentraciones del extracto para obtener una concentración bacteriana en cada tubo de aproximadamente 1×10^5 UFC/mL de caldo. Los tubos se incubaron sin presión de CO_2 a 37 °C.

De cada tubo se tomaron muestras cada hora, durante los primeros cuatro tiempos (T_0-0 , T_1-1 , T_2-2 , T_3-3 , T_4-4) (tiempo-horas transcurridas); en los tiempos cinco y seis las muestras se tomaron cada dos horas (T_5-6 , T_6-8). Para el tiempo siete la muestra se tomó después de cuatro horas (T_7-12) y el tiempo ocho se muestreó después de doce horas (T_8-24).

Para determinar las UFC en cada tiempo, se efectuaron dos diluciones de cada concentración en solución salina estéril y se sembraron en placas con agar para permitir su crecimiento, las cuales se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Finalmente, se contó el número de UFC y se graficó el Log del número de sobrevivientes contra el tiempo. A partir de la gráfica obtenida, se determinó el número de impactos necesarios para producir la inactivación o muerte bacteriana, lo cual se logró prolongando la zona lineal de la curva de supervivencia, hasta su inserción con el eje de las ordenadas. De esta manera se pudo determinar si el extracto actúa sobre uno o varios blancos de la estructura bacteriana.

Apéndice XII

Método de inhibición del crecimiento radial (Método modificado de Wang y Bun, 2002).

El método de inhibición del crecimiento radial se utiliza para determinar el efecto inhibitorio de las sustancias o extractos sobre el crecimiento de hongos miceliados.

La metodología utilizada en este trabajo se detalla a continuación: el bioensayo se llevó a cabo en cajas petri (90X15 mm) con 20 mL de agar-papa-dextrosa (APD). En el centro de la placa se colocó el inóculo fúngico que consistió de un botón de micelio de 5 mm de diámetro. Posteriormente, se colocaron discos impregnados con el extracto metanólico, la PM y las fracciones obtenidas de las fracciones cromatográficas, con una concentración de 2 mg/disco. Los discos se colocaron a una distancia de 3 cm del inóculo fúngico. Las placas se incubaron a 28° C durante un lapso de 72 a 96 horas, hasta que el micelio cubrió la superficie del agar. Al ser una prueba cualitativa, los resultados se reportaron como positivo o negativo de acuerdo con la actividad de las sustancias evaluadas.

Apéndice XIII

Método de dilución en agar (hongos) (Método modificado de Koneman et al., 1985).

El método de dilución en agar sobre hongos se utiliza para determinar la concentración de sustancias o extractos, capaz de inhibir el crecimiento del micelio. Para este trabajo la metodología empleada fue la siguiente: para estos bioensayos se prepararon placas con diferentes concentraciones del extracto metanólico y la PM (0.062, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/mL), para ello se preparó una solución patrón y, con base en ésta, se tomaron alícuotas, las cuales se agregaron a 3 ml de agar papa dextrosa, a una temperatura de 45 °C, con la finalidad de obtener las concentraciones señaladas. Una vez agregada cada concentración del extracto, la mezcla se agitó rápidamente para obtener una dispersión homogénea y se colocaron en placas de 24 pozos, agregando 1 mL de agar con cada una de las concentraciones en cada pozo. De cada concentración se agregaron tres repeticiones (tres pozos por concentración).

Después de que el agar solidificó, se colocó el inóculo fúngico que consistió en un botón de micelio de 1 mm de diámetro en el centro de cada pozo con las concentraciones a evaluar. Como control positivo se utilizaron pozos sin extracto, a las cuales se les consideró como el 100 % de crecimiento radial y como controles negativos se usaron los diferentes solventes, de acuerdo con el volumen de las alícuotas utilizadas. Las placas se incubaron a 28 °C durante 24 a 72 horas, de acuerdo con el crecimiento de los microorganismos utilizados. Finalmente, se midió el área de crecimiento micelial en mm, que se reportó en porcentaje, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = [(C-T)/C] \times 100$$

Donde: C=extensión hifal (mm) del control; T=extensión hifal (mm) de las placas tratadas con los extractos.

Con lo anterior, se determinó la Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM), tomando como CI_{50} la concentración que mostró una disminución del 50 % del crecimiento micelial y como CFM aquella en la que no hubo crecimiento micelial; es decir, inhibió el crecimiento al 100 %.

Apéndice XIV

Determinación de hidroxiprolina (método de Woessner, 1961 y modificado por Gawronska-Kozak et al., 2006).

La determinación de hidroxiprolina en las heridas experimentales indica la cantidad de colágeno en ellas. El método consiste en una reacción colorimétrica en la que la hidroxiprolina se oxida con cloramina T (sal de sodio de p-tolueno sulfonamida) y se produce ácido-pirrol-4-hidroxi-2-carboxílico, éste reacciona con el p- dimetil-amino-benzaldehído (reactivo de Erlich) y produce un cromógeno (rosa), el cual es medido a una longitud de 550 nm. Los resultados se reportan en mg de hidroxiprolina por gramo de tejido, o en porcentaje.

Se utilizaron 30 ratones machos *Mus-musculus*, cepa CD-1 y se distribuyeron al azar en seis grupos de 5 ratones cada uno, como se indica a continuación:

- 1) Vehículo (gel) (control).
- 2) PM al 1 % en gel (P/V).
- 3) Fracción C1-3 al 1 % en gel (P/V).
- 4) Fracción C1-6 al 1 % en gel (P/V).
- 5) Fracción C2-9 al 1 % en gel (P/V).
- 6) Recoverón (fármaco de referencia).

El dorso de los ratones se depiló con un depilatorio comercial. Después de un reposo de 24 horas, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico, vía intraperitoneal (45 mg/Kg de peso) y se realizó una incisión de 1 cm de longitud, en el dorso de los animales, tomando en cuenta todas las capas de la piel. Las sustancias a evaluar se les aplicaron tópicamente, cubriendo la herida en su totalidad. Los tratamientos se aplicaron cada 24 horas, durante diez días. Los animales se sacrificaron en una cámara de CO₂ y posteriormente se tomaron muestras circulares de piel de la herida de 5 mm de diámetro, para ello se utilizó un sacabocados. Las muestras se conservaron en congelación hasta su análisis.

Preparación de las muestras

- ***Deshidratación:*** Las muestras se descongelaron y se deshidrataron en tubos con 1 mL de acetona, a temperatura ambiente por una hora. Posteriormente, se desengrasaron colocándolas en 2 mL de éter de petróleo durante dos horas.

Para asegurarse que las muestras estuvieran totalmente deshidratadas, antes de analizarlas se retiró el éter de petróleo y se colocaron en una estufa a 90 °C, para secarlas hasta lograr un peso constante (24 horas).

- **Hidrolizado:** El hidrolizado de las muestras se realizó colocando los fragmentos secos de tejido en viales con 1 mL de HCl 6 N; éstos se cerraron herméticamente y se colocaron a 90 °C durante tres horas. Posteriormente, se decantó el contenido en otro frasco, se lavó el tubo con otro mL de HCl 1 mM y se combinó con el hidrolizado, para dar un volumen final de 2 mL.

Se transfirieron 1.5 mL del hidrolizado a un tubo Eppendorf, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos, a temperatura ambiente. El sobrenadante se utilizó para la determinación fotocolorimétrica de concentración de hidroxiprolina.

Determinación de la concentración de hidroxiprolina

- **Preparación de las soluciones:**
 - Solución T cloramina: se preparó agregando 282 mg de cloramina T, 2 mL de n-propanol, 2 mL de agua destilada y 16 mL de buffer acetato-citrato.
 - Solución de Erlich: se preparó con 2.5 g de 4-(dimetilamino)-benzaldehído, 9.3 mL de n-propanol y 3.9 mL de ácido perclórico al 70 %.
- **Procedimiento:** De cada muestra hidrolizada se tomaron 20 µL y se colocaron en placas de 96 pozos, por triplicado. A cada muestra se le adicionaron 50 µL de solución T cloramina y se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 50 µL de solución de Erlich a cada pozo y se incubaron por 25 minutos a 67 °C. La absorbancia se midió a 550 nm con un lector de Elisa (Thermo scientific, Multiskan FC).

Las concentraciones de hidroxiprolina se determinaron utilizando una curva estándar de 0 a 20 mg/mL de hidroxiprolina. Los resultados se obtuvieron en mg por gramo de tejido seco. Finalmente, con los datos obtenidos se determinó el porcentaje de hidroxiprolina.

Apéndice XV

Diferenciación de taninos (hidrolizables o condensados)

Este método consiste en dos fases, la primera es una determinación cualitativa de presencia o ausencia de fenoles para ello se efectúa la reacción de la sustancia o extracto a evaluar con cloruro férrico; la segunda consiste en determinar la presencia de taninos, al adicionar un reactivo de gelatina a la sustancia a evaluar. La presencia de taninos se pone en evidencia por la formación de un precipitado. En el presente trabajo las muestras (PM y fracciones cromatográficas) se analizaron como se detalla a continuación.

Preparación de las muestras:

Las muestras se disolvieron en etanol, posteriormente, una porción de esta solución etanólica se disolvió en agua, se filtró y se tomaron alícuotas de 1 mL que fueron colocadas en viales para su análisis.

Análisis de las muestras:

A cada muestra se le adicionaron tres gotas de solución de cloruro férrico al 2.5 % y tres gotas de reactivo de gelatina al 1 %. La prueba se considera positiva si se observa la aparición de un precipitado.

La diferenciación entre taninos hidrolizables o condensados se determina según el color o formación de un precipitado al entrar en contacto con sales férricas. Si el precipitado es color azul negruzco se trata de taninos hidrolizables; un precipitado color pardo verdoso indica la presencia de taninos condensados.

Referencias

- Abu-Al-Basal, M. 2001. The influence of some local medicinal plant extracts on skin wound healing activity; evaluated by histological and ultra-structural studies. Ph. D. Thesis. University of Jordan, Amman, Jordan.
- Aliyeva, E., Umur, S., Zafer, E., Acigoz, G., 2004. The effect of polylactide membranes on the levels of reactive oxygen species in periodontal flaps during wound healing. *Biomaterials*. 25: 4633-4637.
- Andrades, P., Sepúlveda, S., González, J. 2004. Curación avanzada de heridas. *Revista Chilena de Cirugía*. 56(4): 396-403.
- Atta, A. H., Alkofahi, A. 1998. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 60: 117-124.
- Avila, J. G. 1996. Actividad anti *Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha. Tesis de Maestría. FES Cuautitlán. UNAM. México.
- Becerra, J. X., Venable, D. L., Evans, P. H., Bowers, W. S. 2001. Interactions between chemical and mechanical defenses in the plant Genus *Bursera* and their implications for herbivores. *American Zoologist*. 41: 865-876.
- Becerra, J. X. 2003. Evolution of Mexican *Bursera* (Burseraceae) inferred from ITS, ETS, and 5S nuclear ribosomal DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 26: 300-309.
- Bermúdez, S., Herrera, M., Hochman, A., Moreno, H., Mosca, I., Rodríguez, M., Videla, E. 2008. Consenso sobre cicatrización de heridas. *Sociedad Argentina de Dermatología*. Argentina. pp. 1-25.
- Bianchi, E., Caldwell, M. E., Cole, J. R. 1968. Antitumor agents from *Bursera microphylla*. I. Isolation and characterization of deoxypodophyllotoxin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 57: 696-697.
- Blanckaert, I., Swennen, R. L., Paredes, F. M., Rosas, L. R., Lira, S. R. 2004. Floristic composition, plant uses and management practices in homegardens of San Rafael Coxcatlán, Valley of Tehuacán-Cuicatlán, México. *Journal of Arid Environments*. 57: 39-62
- Brunicardi, F. C., Andersen, D. K., Billiar, T. R., Dunn, D. L., Hunter, J. G., Pollock, R. E. 2005. Principios de cirugía. Vol. 1. 8ª Edición. Ed. Mc-Graw Hill Interamericana. México. pp. 223-248.
- Brunicardi, F. C., Andersen, D. K., Billiar, T. R., Dunn, D. L., Hunter, J. G., Pollock, R. E. 2006. Manual de Cirugía. Ed. Mc-Graw Hill Interamericana. México. pp. 166-183.

- Cai, Y., Chen, Z. P., Phillipson, J. D. 1993. Clerodanedieterpenoids from *Croton lechleri*. *Phytochemistry*. 34(1): 265-268.
- Cai, Y., Evans, F. J., Roberts, M. F., Phillipson, J. D., Zenk, M. H., Gleba, Y. Y. 1991. Polyphenolic compounds from *Croton Lechlerii*. *Phytochemistry*. 30(6): 2033-2040.
- Calderón, W. 2001. Historia de la cirugía plástica mundial. *Cirugía Plástica*. Santiago. Sociedad de Cirujanos de Chile. pp. 19-27.
- Canal, A. L. P., Rodríguez, P. M. A., López, Ch. A., Pacheco, R. M. A., Sánchez, G. D. J. 2007. Valoración histológica del daño tisular ocasionado por diferentes medios de corte en piel de conejo. *Revista de Sanidad Militar*. 61: 162-169.
- Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Durán, A., Lira, R. 2005. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology*. 97: 429-439.
- Canales, M. M., Hernández, D. T., Caballero, N. J., Romo de Vivar, R. A., Durán, D. A., Lira, S. R. 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana*. 75: 21-43.
- Cardenas, R., Reguera, S. J. J., Llanos, R. E., Aguirre, L. E., Herrera, S. J., Zuñiga, B., Rodarte, B., Alba, L. L., Guevara, F. P. 2012. Effects of Organic Extracts of *Bursera copallifera* and *B. lancifolia* Leaves in the Development of *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Entomology*. 9(2):115-122.
- Casas, A., Valiente-Banuet, A., Viveros, J. L., Caballero, J., Cortés, L., Dávila, P., Lira, R., Rodriguez, I. 2001. Plant resources of the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Economic Botany*. 55(1): 129-166.
- Chandrasoma, P., Taylor, C. 1998. *Patología general*. 2a ed. México D. F. Manual Moderno.
- Chithra, P., Sajithlal, G. B., Chandrakasan, G. 1998. Influence of *Aloe vera* on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 181: 71-76.
- Cole, J. R., Bianchi, E., Trumbull, E. R. 1968. Antitumor agents from *Bursera microphylla* (Burseraceae) II. Isolation of a new lignanburseran. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 58: 175-176.
- Companioni, G. M. 1995. Ácido araquidónico y radicales libres: su relación con el proceso inflamatorio. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 14(1).
- David, J. A. 1988. *Cuidado de las heridas*. Ediciones Doyma. España. pp. 1-3.

- De Bruyne, T., Pieters, L., Deelstra, H., Vlietinck, A. 1999. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*. 27: 445-459.
- Deters, A., Dauer, A., Schnetz, E., Fartasch, M., Hensel, A. 2001. High molecular compounds (polysaccharides and proanthocyanidins) from *Hamamelis virginiana* bark: influence on human skin keratinocyte proliferation and differentiation and influence on irritated skin. *Phytochemistry*. 58: 949-958.
- Dey, P. M., Harborne, J. B. 1989. *Methods in plant biochemistry*. Vol 1: Plant phenolics. London. Academic Press. 552 p.
- Domínguez, X. A. 1973. *Métodos de investigación fitoquímica*. Ed. Limusa. México. 281 p.
- Ferguson, M. W. J., O’Kane, S. 2004. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 359: 839-850.
- Fernández, B. M. N. 1999. *Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje, en la zona semiárida de Coxcatlán, Puebla*. Tesis de Maestría. UNAM.
- Fernandez, O., Capdevila, J.Z., Dalla, G., Melchor, G., 2002. Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the of open surgical wounds. *Fitoterapia*. 73, 564–568.
- García, M. E. 1981. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen*. 3ª. ed. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 252 pp.
- Gawronska-Kozak, B., Bogacki, M., Rim, J. S., Monroe, W. T., Manuel, J.A., 2006. Scarless skin repair in immunodeficient mice. *Wound Repair and Regeneration*. 14:265-276.
- González, T. J. H., Rodríguez, R. R. Machado, P. M., González, Q. J. Cabrera, S. J. 2004. Heridas. *Métodos de tratamiento*. MEDISAN. 8(1): 33-42.
- Goodman & Gilman. 1996. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 9ª Edición. Vol. II. Mc-Graw Hill Interamericana. México. pp. 1201.
- Greenberg, M., Dodds, M., Tian, M. 2008. Naturally occurring phenolic antibacterial compounds show effectiveness against oral bacteria by a quantitative structure activity relationship study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(23): 11151-11156.
- Guillermo, F., Bonilla, P., Arroyo, J. 2005. Efecto cicatrizante del tallo subterráneo de *Peperomia scutellaefolia* R. et P. en geles aplicados a *Ratus norvegicus*. *Folia Dermatológica Peruana*. 16(1): 15-22.

- Heller, A., Koch, T., Schmeck, J., van Ackern, K. 1998. Lipid mediators in inflammatory disorders. *Drugs*. 487-496.
- Hernández, J. D., Román, L. U., Espiñeira, J., Joseph-Nathan. 1983. Ariensin, a new lignan from *Bursera ariensis*. *Planta Médica*. 47:215-217.
- Higgs, A. G., Flower, J. R., Vane, R. J. 1979. A new approach to antiinflammatory drugs. *Biochemical Pharmacology*. 28: 1959-1961.
- Houghton, P. J., Hylands, P. J., Mensah, A. Y., Hensel, A., Deters, A. M. 2005. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example. *Journal of Ethnopharmacology*. 100: 100-107.
- Huacuja, R. L., Delgado, N. M., Carranco, L. A., Reyes, L. R., Rosado, G. A. 1990. Agglutinating and immobilizing activity of an ethanol extract of *Bursera fagaroides* on human and other mammalian spermatozoa. *Archivos de Investigación Médica*. 21(4): 393-398.
- INEGI. 1984. Carta geológica. 1:250,000. E14-6
- INEGI. 1991. Carta topográfica. 1:250,000. E14-6.
- Jolad, S. D., Wiedhopf, R. M., Cole, J. R., 1977. Cytotoxic agents from *Bursera klugii* (Burseraceae) I: isolation of sapelins A and B. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 66: 889-890.
- Jolad, S. D., Wiedhopf, R. M., Cole, J. R. 2006. Cytotoxic agents from *Bursera morelensis* (Burseraceae): Deoxypodophyllotoxin and a new lignan, 5'-desmethoxydeoxypodophyllotoxin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 66(6): 892-893.
- Junor, G. O., Porter, R. B., Facey, P. C., Yee, T. H. 2007. Investigation of essential oil extracts from four native Jamaican species of *Bursera* for antibacterial activity. *The West Indian Medical Journal*. 56(1): 22-25.
- Jutiviboonsuk, A., Zhang, H., Teng, T. G. Cuiying, M., Van Hung, N., Manh, C. N., Bunyaphatsara, N., Soejarto, D. D., Fong, H. H. S. 2005. Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*. *Phytochemistry*. 66: 2745-2751.
- Koneman, E. W., Allen, S. D. Dowell, V. R., Sommers, H. M. 1985. Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana. México. pp. 386-393.
- Kubo, Y. 1993. Antimicrobial activity of green tea flavor components. In *Bioactive volatile compounds from plants*. Editores American Chemical Society. E. U. A. pp. 57-70.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. 2005. Patología estructural y funcional: Robbins y Cotran. 7ª edición. Elsevier. España. 1517 p.

- Kumara, S. H. M., Krishna, V., Shankarmurthy, K., Abdul, R. B., Mankani, K. L., Manhadewan, K. M. Harish, B. G., Raja, N. H. 2007. Wound healing activity of embelin isolated from the ethanol extract of leaves of *Embelia ribes* Burm. *Journal of Ethnopharmacology*. 109: 529-534.
- Ladin, D. 1998. Understanding dressings in wound healing: State of the Art. *Clinics in Plastic Surgery*. 25: 433-41.
- Lazaurus, G. 1994. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Archives of Dermatology*. 130:489.
- Linares, D., Bye, R., Flores, B. 1999. Plantas medicinales de México usos, remedios y tradiciones. Instituto de Biología. UNAM. México. 155 pp.
- Lira, R. 2001. Los recursos vegetales del Valle de Tehuacán-Cuicatlán desde una perspectiva etnobotánica. Informe técnico. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 9 pp.
- López, D. N., Gutiérrez, R. M. C., Cortés, B. E., Zentella, D. A., Konigsberg, F. M. 2003. Daño al ADN y niveles de radicales libres en fibroblastos de ratones jóvenes y viejos. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 22(2):107-16.
- López, H. G. P., Arroyo, V. A. G. 2008. Consumo de hierbas medicinales en pacientes prequirúrgicos en el Hospital General de México. *Revista Médica del Hospital General de México*. 71(1): 6-10.
- MacKay, D., Miller, A. L. 2003. Nutritional support for wound healing. *Alternative Medicine Review*. 8: 359-377.
- Manzano, S. P., Miranda, M., Gutiérrez, Y., García G., Orellana, T., Orellana, A. 2009. Efecto antiinflamatorio y composición química del aceite de ramas de *Bursera graveolens* Triana & Planch. (palo santo) de Ecuador. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 14(3): 45-53.
- McDoniel, P. B., Cole, J. R. 1972. Antitumor activity of *Bursera schlechtendalii* (Burseraceae): isolation and structure determination of two new lignans. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 61: 1992-1994.
- Medina, J. 2000. Determinación del vigor y el estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) a lo largo de una cronosecuencia edáfica en un abanico aluvial en Coxcatlán, Valle de Tehuacán. Tesis Profesional. FES Iztacala. UNAM. Mexico. 48 p.
- Méndez, M. M. G., Montalvo-Javé, E. E., Wintergerst, T. E., Téllez, S. M., Castell, R. A., Gómez, C. A., Laguna, H. G., Osuna, F. R., Brechú, F. A. E. 2008. Efecto cicatrizante de la pomada con *Dorstenia drakena* L. (Moraceae) en heridas cutáneas. *Cirujano General*. 30(4): 204-210.

- Mensah, A. Y., Sampson, J., Houghton, P. J., Hylands, P. J., Westbrook, J., Dunn, M., Hughes, M. A., Cherry, G. W. 2001. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. *Journal of Ethnopharmacology*. 77: 219-226.
- Milla, C. M. E. 1985. Estudio sobre el mecanismo de acción del principio activo taspina de sangre de grado. Tesis Bachiller en Biología. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Perú.
- Murillo, F. E. 2006. Actividad antioxidante «in vitro» de las bebidas de frutas. Alfa editores técnicos. pp. 20-27.
- NOM-062-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México D.F.
- Noge, K., Venable, L., Becerra, J. 2011. 2-Phenylethanol in the leaves of *Bursera velutina* Bullock (Burseraceae). *Acta Botánica Mexicana*. 97: 9-16.
- Okuda, T., 2005. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*. 66: 2012-2031.
- Otero, M. J., Hidalgo, L. G. 2004. Taninos condensados en especies forrajeras de clima templado: efectos sobre la productividad de rumiantes afectados por parasitosis gastrointestinales. *Livestock Research for Rural Development*. 16(2):1-13.
- Peterson, J., Dwyer, J. 2000. An informatics approach to flavonoid database development. *Journal of food composition and analysis*. 13: 441-454.
- Phan, T. T., Wang, L., See, P., Grayer, R. J., Chan, S. Y., Lee, S. T. 2001. Phenolic Compounds of *Chromolaena odorata* Protect Cultured Skin Cells from Oxidative Damage: Implication for Cutaneous Wound Healing. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 24: 1373-1379.
- Pieters, L., De Bruyne, T., Claeys, M. Vlietnick, A. 1993. Isolation of a dihydrobenzofuranlignan from South American Dragon's Blood (*Croton* spp.) as an inhibitor of cell proliferation. *Journal of Natural Products*. 56(6): 899-906.
- Pieters, L., De Bruye, T., Mei, G., Lemiere, G., Vanden, B. D. Vlietinck, A. J. 1992. *In vitro* and *In vivo* biological activity of South American Dragon's blood and its constituents. *Planta Medica*. 58: 582-583.
- Pradilla, V. O. E. 2004. Ciclooxygenasa 3: La nueva iso-enzima en la familia. *MedUNAB*. 7(21): 181-184.
- Queiroga, C. L., Duarte, M. C., Ribeiro, B. B., de e Magalhães, P. M. 2007. Linalool production from the leaves of *Bursera aloexylon* and its antimicrobial activity. *Fitoterapia*. 78(4): 327-328.

- Rendic, O. E., Aldea, R. V. 2008. Manejo avanzado de heridas. Revisión. Revista Chilena de Dermatología. 24: 322-327.
- Reddy, B. S., Reddy, R. K. K., Naidu, V. G. M., Madhusudhana, K., Agwane, S. B., Ramakrishna, S., Diwan, P. V. 2008. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and wound healing potentials of *Holoptelea integrifolia*. Journal of Ethnopharmacology. 115: 249-256.
- Reynoso, O. R., Santerre, A., Delgado, S. J. I., Casas, S, J., Velázquez, M. S., Puebla, P. A. M. 2008. Polyamines as biomarkers of the antitumoral activity of *Bursera fagaroides*. Interciencia. 33(5): 384-388.
- Risco, E., Vila, R., Henriques, A. Canigüeral, S. 2005. Bases químicas y farmacológicas de la utilización de la Sangre de Drago. Revista de Fitoterapia. 5(2): 101-114.
- Robles, C. J. E., Téllez, A. A. N., Rojas, R. R. A., De Castro, C., Riveros de M, T. 2010. Efectos citotóxicos in vitro de extractos y fracciones de *Bursera tomentosa* (Jacq.) Triana & Planch., Burseraceae, frente a líneas celulares tumorales humanos. Revista Brasileira de Farmacognosia. 20(4): 588-593.
- Rojas, H. N. M., Rodríguez, U. M. 2008. Actividad antimicrobiana de *Tectona grandis* L. f., *Bursera simaruba* (L.) Sarg. y *Cedrela odorata* L. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 13(4). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000400005&lng=es&nrm=iso
- Rojas, S. A. M., Medieta, S. M., Antúnez, M. M. Y., Salas, V. E., Marquina, S., Villarreal, M. L., Puebla, A. M., Delgado, J. I., Alvarez, L. 2012. Cytotoxic podophyllotoxin type-lignans from the steam bark of *Bursera fagaroides* var. *fagaroides*. Molecules. 17: 9506-9519.
- Rosas, L. R., 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis Biólogo. FES Iztacala. UNAM. México. pp. 95.
- Rosas, A. P., Arteaga, N. P., Reynoso, O. R., Villagómez, C. J. C., Sabanero. L. M., Puebla, P. A. M., Calvo, M. C. 2008. *Bursera fagaroides*, effect of an ethanolic extract on ornithine decarboxylase (ODC) activity in vitro and on the growth of *Entamoeba histolytica*. Experimental Parasitology. 119(3): 398-402.
- Ross, M. H., Pawlina, W. 2008. Histología. Texto y atlas a color con Biología Celular y Molecular. 5ª edición. Editorial Médica Panamericana. pp. 480-504.
- Rzedowski, J., Kruse, H. 1979. Algunas tendencias evolutivas en *Bursera* (Burseraceae). Taxon. 28: 103-116.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México .432 pp.

- Rzedowski, J., Medina, L. R. Rzedowski, C. G. 2004. Las especies de *Bursera* (Burseraceae) en la Cuenca superior del Río Papaloapan (México). *Acta Botánica Mexicana*. 66: 23-151.
- Sadaf, F., Saleem. R., Ahmed, M., Iqbal, A. S. Zafar, N. 2006. Healing potential of cream containing extract of *Sphaeranthus indicus* on dermal wounds in Guinea pigs. *Journal of Ethnopharmacology*. 107: 161-163.
- Santos, S. C., Mello, J. C. P. 2004. Taninos. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Simões, C.M.O., Guerra, M.P. *et al.* (Orgs.) 5a ed. Editora da UFSC. Florianópolis Brazil. 1096 p.
- Sergio, R. P., Luis, M. P., 1992. Isolation of picropolygamain from the resin of *Bursera simaruba*. *Journal of Natural Products*. 55: 1768-1771.
- Singleton V., Rossi J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 144-153.
- Suguna, L., Sivakumar, P., Chandrakasan, G. 1996. Effects of *Centella asiatica* extract on dermal wound healing in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*. 34: 1208-1211.
- Talhouk, R. S., Karam, C., Fostok, S., El-Jouni, W., Barbour, E. K. 2007. Antiinflammatory bioactivities in plant extracts. *Journal of Medicinal Food*. 10: 1-10.
- Thiem, B., Grosslinka, O. 2003. Antimicrobial activity of *Rubus chamaemorus* leaves. *Fitoterapia*. 75: 93-95.
- Tillán, C. J., Ribas, A. M. C., Castro, M. I., Carrillo, D. C. 2002. Actividad antiinflamatoria de extractos de derivados de la caña de azúcar. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 7(2): 1-4.
- Valiente, B. J. 1991. Patrones de precipitación en el Valle semiárido de Tehuacán, Puebla, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 61 pp.
- Vargas, C. C. J. 2007. Estudio de la actividad cicatrizante y antiinflamatoria del extracto alcohólico de las hojas de *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby ("Remata"). Tesis de grado de Magister en Recursos Vegetales y Terapéuticos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, Perú. pp. 26.
- Vázquez, B., Avila, G., Segura, D., Escalante, B. 1996. Antiinflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. *Journal of Ethnopharmacology*. 55: 69-75.
- Vinegar. R., Schreiber, W., Hogo, R. 1969. Biphasic development of carrageenan in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 166: 96-103.

- Vowden, P., Apelqvist, J., Moffatt, C. 2008. Complejidad de la herida y cicatrización. Heridas de difícil cicatrización: un enfoque integral. Medical Education Partnership. pp. 5-8.
- Wang, H., Bun, B. N. 2002. Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry*. 61:1-6.
- Werner, S., Grose, R., 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological Reviews*. 83:835–870.
- Wickramaratne, D. B. M., Mar, W., Chai, H., Castillo, J. J., Farnsworth, N. R., Soejarto, D. D., Cordell, G. A., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D. 1995. Cytotoxic constituents of *Bursera permollis*. *Planta Medica*. 61: 80-81.
- Wilgus, T. A. 2008. Immune cells in the healing skin wound: Influential players at each stage of repair. Review. *Pharmacological Research*. 58:112-116.
- Woessner, J. F. 1961. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 93: 440-447.
- Zuanazzi, J. A. S., Montanha, J. A. 2004. Flavonóides. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Simões, C.M.O., Guerra, M.P. *et al.* (Orgs.) 5 ed., revisada, ampliada, primeira reimpressão – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC.
- Zúñiga, B., Guevara-Fefer, P., Herrera, J., Contreras, J. L., Velasco, L., Pérez, F. J., Esquivel, B. 2005. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the volatile fractions from the bark of eight Mexican *Bursera* species. *Planta Médica*. 71(9): 825-828.

Full Length Research Paper

Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant properties of *Bursera morelensis* bark from San Rafael, Coxcatlán, Puebla (México): Implications for cutaneous wound healing

Rocio Serrano Parrales^{1,5*}, Beatriz Vázquez Cruz², David Segura Cobos², Ana Luisa Anaya Lang³, Manuel Jimenez-Estrada⁴ and Margarita Canales Martínez¹

¹Laboratorio de Farmacognosia, UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla 54090, Edo. de México, México.

²Laboratorio de Farmacología, UIICSE, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla 54090, Edo. de México, México.

³Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510, México, D. F., México.

⁴Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510, México, D. F., México.

⁵Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Ciudad Universitaria 3000, 04360, Coyoacán, México, D. F., México.

Accepted 8 June, 2011

Bursera morelensis Ramírez bark is used by people of San Rafael, Coxcatlán, in Puebla State, México, as a traditional remedy to heal skin wounds. In the present study, we evaluated anti-inflammatory, analgesic and antioxidant activities of the methanolic extract (MP) obtained from the bark. Our results demonstrated that MP of *B. morelensis* possesses anti-inflammatory activity by inhibition of paw edema induced by carrageenan in rats. The dose of 50 mg/kg was comparable with indomethacin used as reference standard. The extract (50 mg/kg) also diminished 28.01% of the number of neutrophils migrating into the peritoneal cavity. At the same dose, an analgesic activity of the extract was observed by inhibition of acetic acid induced writhing response in mice. The extract also showed a strong capacity of DPPH radical scavenging with an EC₅₀ of 3.05 µg/mL that was comparable with quercetin (EC₅₀ = 4.45 µg/mL). The biological activities of the extract are attributed to its mixture of phenolic compounds (50.5%), particularly phenylpropanoids and flavonoids. The anti-inflammatory, analgesic and antioxidant properties shown by the extract favor the wound healing, thus controlling the inflammatory process without inhibiting it. This study supports the traditional use of *B. morelensis* bark for the treatment of acute skin wounds.

Key words: *Bursera morelensis*, anti-inflammatory, analgesic, antioxidant, wound healing, phenolic compounds.

INTRODUCTION

Wounds are always accompanied by inflammatory processes causing symptoms like reddening and edema of the surrounding tissue (Hayden and Ghosh, 2008) that results in a coordinated influx of neutrophils at the wound site. In addition, various chemical mediators are liberated that is, eicosanoids, prostaglandins, nitric oxide (NO),

and cytokines derived from enzymes such as cyclooxygenases (COX) and inducible nitric oxide synthetase (iNOS) are also liberated. Some mediators involved in the inflammatory reaction can extend the repair generating chronic wounds. In addition, the prostaglandins are chemotactic mediators for neutrophils and they are

responsible for fever and pain in the acute inflammation (Pradilla et al., 2004).

In damaged tissues, free radicals are produced by neutrophils and wound related non-phagocytic cells (Griendling et al., 2000). Thus, the wound site is rich in both oxygen and nitrogen reactive species along with their derivatives. The presence of these free-radicals will result in oxidative stress leading to lipid peroxidation, DNA breakage and enzyme inactivation, including the presence of free radical scavenger enzymes (Wiseman and Halliwell, 1996).

The use of anti-inflammatory, analgesic and antioxidant agents are helpful in the therapeutic treatment of wounds and many plants have been shown to possess therapeutic potential with these properties. Species of *Bursera* genus are included among the medicinal plants of popular use and are known for their anti-inflammatory, antitumoral, antibacterial and insecticidal properties. These medicinal effects are attributed to the essential oils, diterpenes, triterpenes, sterols and lignans (Jolad et al., 1977a; Becerra et al., 2001; Canales et al., 2005; Carretero et al., 2008).

B. morelensis Ramírez belonging to the family *Burseraceae*, is endemic from México where it has a wide distribution (Rzedowski et al., 2004). Chemical composition of the species has not been documented and only two lignans with cytotoxic activity has been reported (Jolad et al., 1977b). Traditionally, *B. morelensis* is known as “aceitillo”, “cuajote”, “palo colorado”, “palo mulato” and “xixote”. Resin and infusions of the bark are used in Mexican folk medicine by people from San Rafael, Coxcatlán Puebla State (México) as a traditional remedy to treat skin wounds. However, until the present investigation, the literature survey revealed that any study had been carried out on the wound healing effect of *B. morelensis* or other biological activities that might be associated with wound healing process such as anti-inflammatory, analgesic and antioxidant activities that together can favor the repair of the damage tissues (Khanna et al., 2002). Hence, the aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory, analgesic and antioxidant activities of *B. morelensis* bark; such effects are closely related with the wound healing process.

MATERIALS AND METHODS

Plant

B. morelensis Ramirez bark was collected at San Rafael,

*Corresponding autor. E-mail: rocse_rsp@yahoo.com.mx. Tel: +52 5 623 11 27. Fax: +52 5 623 12 25.

Abbreviations: MP, methanol phase; HP, hexane phase; PPH, 1,1-diphenyl-2-picryl-hidrazyl; HPLC, high-performance liquid chromatography; DAD, diode array detector; MeOH, methanol; AcOH, acetonitrile; NOM, norma Oficial Mexicana.

Coxcatlán, Puebla, México, in August, 2007 and identified by Dr. Oswaldo Téllez Valdés (Laboratory of Natural Products of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)). A voucher specimen was deposited at the herbarium IZTA at Facultad de Estudios Superiores Iztacala (IZTA 42123), (UNAM)

Preparation of the extract

The bark of *B. morelensis* (646 g) was shade-dried at room temperature, ground in powder and extracted with 2 L of methanol. The extract was filtered and concentrated *in vacuo* to yield 150.4 g of dry extract. The non polar compounds of methanolic extract were removed by partition with 500 mL of methanol and 500 mL of hexane in a separating funnel. After solvent-solvent extraction, the methanol phase (MP) was removed from the hexane phase (HP). Both extracts were concentrated under low pressure; the yields obtained were hexane 1.53% (w/w) and methanol 10.28% (w/w). The extracts were kept in dark at 4°C until tested.

Phytochemical analysis

Total phenolic compounds

The total phenols of the methanolic phase (MP) were determined with Folin-Ciocalteu reagent (Singleton and Rossi, 1965). Gallic acid was used as reference standard. A standard curve was prepared using solutions of gallic acid in water (0.00625 to 0.2 mg/mL).

An aliquot of 1 mL of stock solution of MP (0.05 mg/mL) was transferred to a tube that contained 7 mL of distilled water and 0.5 mL of the Folin-Ciocalteu reagent. After 5 min of incubation, 1.5 mL of Na₂CO₃ (20%) was added. The mixtures were allowed to stand at room temperature for 120 min. The total phenols were determined by absorption at 760 nm in a spectrophotometer (COLEMAN Junior® II, UV-VIS). The result was expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram dry material.

High performance liquid chromatography

Chemical nature of the compounds in the MP of *B. morelensis* was identified using HPLC (Hewlett Packard 1100 system equipped with a diode array detector-DAD). Analysis was performed with an Allphere ODS-1 C18 column (250 × 46 mm, 5 µm) at 23°C. The flow rate was 0 to 5 min of 1 mL/min; 5 to 7.5 min of 1.5 mL/min. The mobile phase was isocratic [MeOH:AcOH:H₂O (30:5:65)]. The analysis of peaks of chromatogram was determined with ultra-violet (UV) spectra (260 nm) using Chemstation A.09.03 software.

Chemicals

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Na₂CO₃, sodium chloride, gallic acid, acetic acid, Folin-Ciocalteu phenol reagent, indomethacin, heparin, and carrageenan were obtained from Sigma (St Louis MO). Dexamethasone (Merck-Sharp and Dohme) and solvents used (methanol, hexane, water) were analytical and of HPLC grades, purchased from Baker.

Animals

The anti-inflammatory and analgesic activities of MP were evaluated on male Wistar rats (260 to 320 g) and male mice *Mus musculus* CD-1 (25 to 30 g). Animals were housed in a room maintained at 22 ± 1°C with an alternating 12 h light-dark cycle.

Table 1. Data of reversed phase HPLC-DAD profile (260 nm) of MP of *B. morelensis*.

Phenolic compound	t _R (min)	λ _{max} (nm)
1	2.578	240, 278 ^{pp}
2	3.014	276 ^{pp}
3	3.574	238, 278 ^{pp}
4	4.001	238, 278, 336 ^{sh flv}
5	4.534	238, 278, 330 ^{sh flv}
6	6.201	238, 304, 318 ^{sh flv}
7	8.328	238, 286, 332 ^{sh flv}
8	8.734	238, 282, 330 ^{sh flv}

t_R: retention time; λ_{max}: maximum absorbance; sh: shoulder peak; compound corresponding to pp = phenylpropanoid; flv = flavonoid.

Food and water sources were available *ad libitum*. All the experimental procedures in the animals were attached to the NOM-062-ZOO-1999, with respect to the use and handling in the laboratory animals used in the scientific investigation.

Anti-inflammatory activity

Carrageenan-induced paw edema test

The test was carried out according to the method described by Vazquez et al. (1996) in groups of five rats. Edema was induced injecting 0.1 mL of carrageenan (1%) in the right hind paw, under the plantar aponeurosis. An equal volume of saline solution into the left hind paw was injected. Animals were pretreated with the MP of *B. morelensis* at doses of 25 and 50 mg/kg (intra-peritoneally) one hour before carrageenan injection. Indomethacin (10 mg/kg) and saline solution (0.9%) (10 mL/kg) were used as reference drug and control, respectively. The paw volume was measured before injection of carrageenan or saline solution by the mercury displacement method (Van Arman et al., 1965) and the time course of edema formation was followed over 4 h. The volume increase (Δvolume) of the inflamed paw was estimated by subtracting the volume of the contralateral paw. The anti-inflammatory effect of the treatments was evaluated as degree of edema inhibition.

Neutrophil migration into peritoneal cavity

The neutrophils migration test was performed as described by Vázquez et al. (1996). Four groups of five rats were used. 3 mL of carrageenan (10%) was administered intra-peritoneally to each animal. One hour before the carrageenan injection, the MP of *B. morelensis* were administered subcutaneously in doses of 25 and 50 mg/kg. The reference drug rats group was treated with dexamethasone (1 mg/kg) and the control group received saline solution (10 mL/kg). 4 h later after administration of the carrageenan injection, the rats were sacrificed. Abdominal cavity was washed with 10 mL of phosphate buffered saline solution (5 U/mL of heparin; 5% of bovine serum albumin). 5 mL of this washed solution was withdrawn for cell counts. The total cell counts were done in a Neubauer chamber and differential cell counts were performed by the technique reported by Souza and Ferreira (1985). The leucocytes percentage was determined in the peritoneal fluid. The results are expressed as number of cells/mL of collected fluid.

Analgesic activity

The analgesic activity was evaluated by the acetic acid-induced

abdominal writhing response (Collier et al., 1968); four groups of eight mice were used. The mice were injected in the peritoneal cavity with 0.6% acetic acid at a dose of 60 mg/kg. The MP of *B. morelensis* at doses of 25 and 50 mg/kg (*per os*) were administered 30 min prior to treatment with acetic acid. A group of rats were treated with indomethacin (10 mg/kg), used as reference drug, and control group received saline solution (0.9%, 10 mL/kg). The writhes induced by the acetic acid consisted of a contraction of the abdominal muscle together with a stretching of the hind limbs. The analgesic activity was expressed as the writhes scores over 20 min.

Antioxidant activity

A DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hidrazyl) assay was employed to investigate the antioxidant activity. Samples at various concentrations (2, 4, 6, 8 and 10 µg/mL) of MP were plated out in triplicate in a 96 well plate. 50 µL of concentrations were added into the wells. For the DPPH and methanol controls, 50 µL of methanol were added. A volume of 150 µL of DPPH (100 µM in methanol) was added to the test samples and 150 µL of methanol were added to the control wells. The plate was incubated in the dark, at 37°C for 30 min. The absorbance was read after incubation using a SLT Spectra ELISA reader, at a single wavelength of 515 nm. The percentage of decolourisation was determined (Equation 1) and the efficient concentration value (EC₅₀) was calculated. Quercetin was used as reference standard.

$$\text{Decolourisation (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{control}}] \times 100 \quad (1)$$

Where A = absorbance at 515 nm, A_{control} = average absorbance of DPPH - average absorbance of methanol, A_{test} = average absorbance obtained in the wells contained DPPH and test sample.

Statistical analysis

Pharmacological activities (anti-inflammatory and analgesic activities) were presented as mean ± standard error of mean (SEM). Significant differences were assessed by Student's t-test for unpaired samples. Results of the antioxidant activity were obtained from two independent experiments and given as mean ± standard deviation (SD). The differences between values obtained for concentrations of MP and quercetin were done by one-way ANOVA. The EC₅₀ values in antioxidant assay were calculated by lineal model. In all the cases, the data distribution was normal and the differences among these were considered significant at P < 0.05. Statistical tests were run in Statistica®'99 edition program.

RESULTS

Phytochemical study

High-performance liquid chromatography and total phenolic compounds

In the characterization of compounds of MP of *B. morelensis* the HPLC chromatogram showed eight peaks. The spectral data indicated that they correspond to phenolic compounds, with a λ_{max} among 238 and 336 nm. The spectral UV of peaks 4 to 8 corresponded to the characteristic patterns of flavonoids (Table 1). The result of total phenolic content estimated was 504.54 mg of

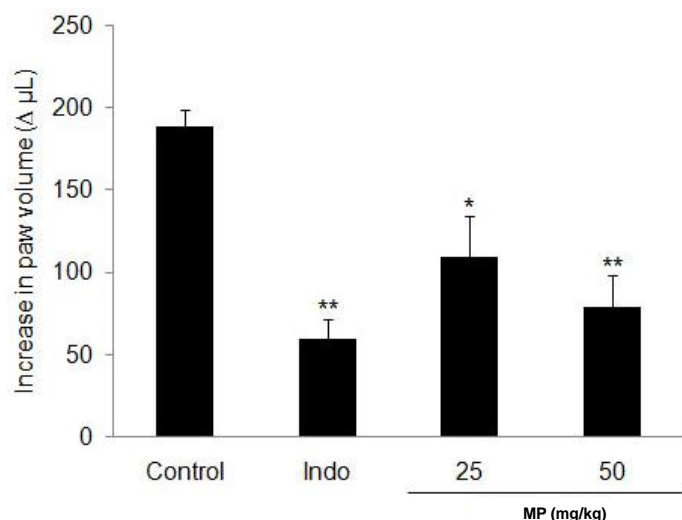


Figure 1. Antiinflammatory effect of MP of *B. morelensis* on the paw edema induced by carrageenan in rats. Carrageenan (100 μg/mL) was administered intraplantarly. MP, saline solution (control group) or indomethacin (indo) (10 mg/kg) (i.p.) was administered 1 h before carrageenan administration. Paw edema was measured at 4 h after the carrageenan injection. Data are expressed as mean ± SEM; n = 5 rats per group. Significantly different compared to control group (*P < 0.05; **P < 0.01) by Student's unpaired t-test.

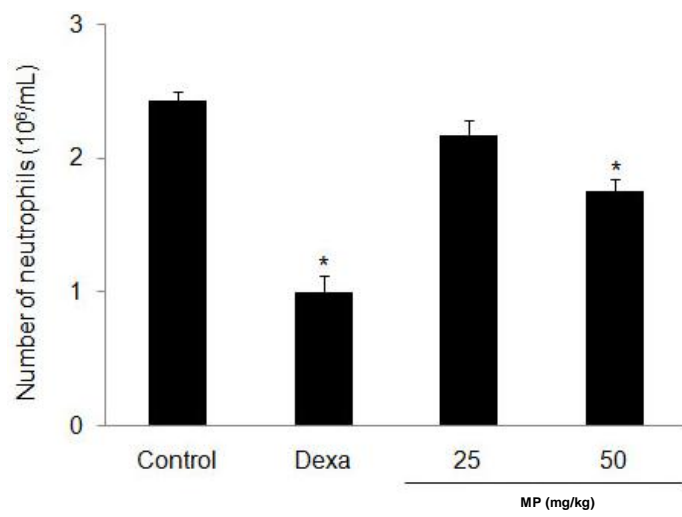


Figure 2. Effect of MP of *B. morelensis* on neutrophils migration into peritoneal cavity in rats. Increasing doses of MP were administered (s.c.) and compared with control (saline solution), dexamethasone (Dexa) (1 mg/kg, s.c.). Values are the mean ± SEM; n = 5 rats per group; N = 20. *Significantly different compared to control group (P < 0.01) by Student's unpaired t-test.

gallic acid equivalents per gram dry sample that corresponded to 50.5% of phenolic compounds.

Anti-inflammatory activity

The carrageenan induced paw edema test showed a

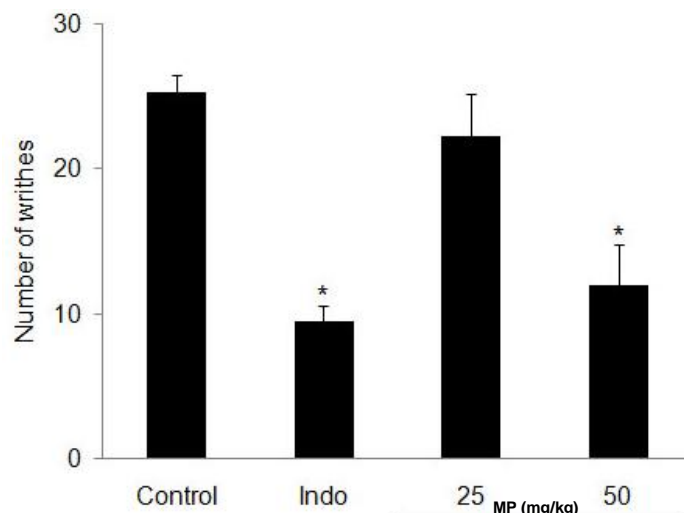


Figure 3. Effect of MP of *B. morelensis* on acetic acid induced writhes in mice. Doses of MP were administered (p.o.) 30 min before the acetic acid injection, saline solution (control group) and indomethacin (Indo; 10 mg/kg) was the reference drug. Data are expressed as mean ± SEM; n = 5 mice per group; N = 20. *Significantly different compared to control group (P < 0.01) by Student's unpaired t-test.

maximum volume of edema obtained 4 h, following carrageenan injection in the control group (188.41 ± 9.9 μL of edema). Rats pretreated with dose of MP of *B. morelensis* showed a significant decrease of the edema compared with control in a dose-dependent form (P < 0.05) (Figure 1). The group which was administered the dose of 50 mg/kg showed an increment in the plant volume of 79.32 ± 18.52 μL, corresponding to 57.9% of edema inhibition, while the group tried with 25 mg/kg presented an increment of volume of 109.8 ± 25.24 μL (41.72% edema inhibition). The effect shown by the 50 mg/kg dose was comparable with indomethacin (10 mg/kg) (59.5 ± 12.12 μL edema; 68.42% edema inhibition), used as reference drug, among which there were not significant differences.

In the neutrophils migrating into the peritoneal cavity test, the MP of *B. morelensis* decreased the number of neutrophils in a dose-dependent form. The dose of 50 mg/kg of MP decreased the neutrophils migration by 28.01% and the dose of 25 mg/kg 10.77% (Data not shown) respect to control. The dose of 50 mg/kg and dexamethasone decreased significantly the migration of neutrophils compared to control group (P < 0.01) (Figure 2).

Analgesic effect

The MP reduced the number of writhes induced by acetic acid (Figure 3). The protective effect of MP was shown at

dose of 50 mg/kg, with 12 ± 2.83 writhes corresponding to 52.47% of decrease of writhing response. The protection offered by the oral administration of this extract 30 min before the acetic acid injection was comparable to that of indomethacin (10 mg/kg) (9.5 ± 1.13 writhes; 62.37% of decrease of writhing response) which did not show significant differences, both produced a significant inhibition of acetic acid induced writhing response with respect to control (25.25 ± 1.2 writhes) ($P < 0.01$).

Antioxidant activity

MP of *B. morelensis* displayed antioxidant activity, showing a strong capacity of DPPH radical scavenging. The EC_{50} of MP was of 3.05 $\mu\text{g/mL}$ and not shown significant differences with quercetin ($EC_{50} = 4.45 \mu\text{g/mL}$).

DISCUSSION

The purpose of this study was to establish the basis for the traditional use of *B. morelensis* on wound healing by means of the evaluation of the anti-inflammatory and analgesic activities on *in vivo* models and antioxidant activity on *in vitro* model. The methanol extract constitute phenolic compounds which are three phenylpropanoids and five flavonoids, and they constitute 50.5% of the compounds in the extract. These results agree with that reported by Dey and Harbone (1989) that phenols are the main compounds in the vegetable barks.

The chemical composition of *B. morelensis* had not been reported previously in the species neither in the *Bursera* genus. It has only been mentioned in the presence of terpenoids in the essential oil and resin of other species of genus, mainly in *B. simaruba* (one of the most studied species). This species constituted mono-, sesqui- and tri-terpenes (Peraza-Sanchez et al., 1995) as well as sterols (Carretero et al., 2008). In the same way, the lignans are present in several species of the genus, as *B. tonkinensis* (Jutiviboonsuk et al., 2005), *B. microphylla* (Cole et al., 1968), *B. permollis* (Wickramaratne et al., 1995), *B. klugii* (Jolad et al., 1977a) and *B. schlechtendalii* (McDoniel and Cole, 1972). Therefore, our results contribute to the knowledge of the chemistry composition of *B. morelensis* and to *Bursera* spp.

The MP showed a significant decrease of the carrageenan induced paw edema in rats in the two assayed dose. Indomethacin showed a maximum inhibition of edema and its effect was similar, statistically to dose of 50 mg/kg of MP of *B. morelensis* which demonstrated that they were equally effective. The initial phase of carrageenan paw edema is mediated by histamine and serotonin, while later phase by prostaglandins, producing edema after migration of leucocytes (Castro et al., 1968; Vinegar et al., 1979). MP

inhibited the edematous response produced by injection of carrageenan in the paw of the rats, suggesting that anti-inflammatory activity of extract is possibly mediated by inhibition of the synthesis, release or action of these mediators.

The MP decreased the number of neutrophils migrating into the peritoneal cavity, confirming the anti-inflammatory activity of the extract. It has been suggest that mechanism of action of anti-inflammatory agents that inhibit the neutrophils migration is related to inhibitory action of the arachidonic acid pathway (Higgs et al., 1979), that is the substrate for prostaglandins production (Blackwell et al., 1980) which are chemical mediators that play a role in the neutrophils chemotaxis in the acute inflammation (Kumara et al., 2007) by induction of capillary permeability (Amico-Roxas et al., 1984). The MP displayed a significant anti-inflammatory activity through inhibition of neutrophils migration, suggesting that probably the extract possesses this mechanism of action, inhibiting the synthesis of chemical mediators derived by this pathway, such as prostaglandins by inhibition of vascular permeability.

The results obtained indicate that MP can be used as an anti-inflammatory agent because the necessary dose to diminish edema is relatively low in comparison to previous studies that evaluated the anti-inflammatory effect of other species such as *B. simaruba*. In these studies, the anti-inflammatory effect was obtained with 78 mg/kg of hexanic extract (Carretero et al., 2008) and 80 mg/kg of methanolic extract (Abad et al., 1996). The anti-inflammatory activity of *B. simaruba* was attributed to the methyl- β -peltatin A (Noguera et al., 2004) and sterols (Carretero et al., 2008).

In the analgesic potential of MP, the extract inhibited acetic acid induced writhing response in mice one hour after oral administration at the dose of 50 mg/kg. The MP can be considered a potent analgesic for its similar effect to indomethacin which possesses analgesic and anti-inflammatory properties. In our results of anti-inflammatory and analgesic activities of MP, a general correlation dose-dependent was observed. This suggests the presence of compounds with a similar mechanism for both activities.

During the inflammatory process, the reactive oxygen species are produced, aggravating the disorders in the tissues (Lopes et al., 2005). The DPPH assay showed that the MP was capable to scavenge free-radicals for what a good antioxidant can be considered because its effect was similar to quercetin. The ability of the extract to act as reducer and DPPH free-radicals scavenger suggests that it is an electron donor reacting with free-radicals to convert them to more stable products, finishing the chain reaction.

According to the above mentioned, the biological effects of MP observed in this study may be attributed to its flavonoid rich composition that possess diverse pharmacological activities, including analgesic (Cárdenas

et al., 1993; Borgi et al., 2008), antioxidant and anti-inflammatory (De Bruyne et al., 1999; Peterson and Dwyer, 2000; Abdel-Hameed, 2009).

The anti-inflammatory and antioxidant properties of the phenolic compounds have been related with the number of hydroxy groups in the molecules (Soobrattee et al., 2005). Anti-inflammatory activity of the flavonoids is due to the inhibition of enzymes like phospholipase A₂, cyclooxygenase and 5-lipoxygenase during the metabolism of the arachidonic acid (Torel et al., 1986; Middleton et al., 2000; Tenorio et al., 2006). On the other hand, the analgesic activity of flavonoids has been documented mainly in glycosyl flavonoids (Cárdenas et al., 1993; Borgi et al., 2008) which have both central and/or peripheral analgesic actions. The flavonoids with central analgesic property are opioid-like analgesics (that is, quercetin), they inhibit non-inflammatory pain. Peripheral analgesics (that is, penta-O-ethylquercetin) inhibit inflammatory pain acting on inflammatory mediators especially the prostaglandins synthesis (Picq et al., 1991).

Finally, the antioxidant capacity of flavonoids is due to their potential of chelation of transition metal ions (particularly iron and copper) and to donate hydrogen atoms and to transfer electrons to free radicals mainly the hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), and lipid peroxy radical (LOO^{\cdot}) that stabilize and delocalize their unpaired electron (Rise-Evans et al., 1997).

Conclusion

B. morelensis is used by folk medicine for wound healing. In addition, our results suggest that the combination of the biological properties shown by the extract (anti-inflammatory, analgesic and antioxidant) could be related to this medicinal effect. Control of the inflammatory phase could take place by inhibition of chemical mediators like prostaglandins. Likewise, the decrease of free-radicals diminishes the oxidative damage in the tissues and increases the proliferation of fibroblasts which are responsible for collagen synthesis in the wounds. The exact mechanisms of action and the active principles for such activities remain to be confirmed. Finally, this study supports the traditional use of *B. morelensis* bark for the treatment of acute wounds.

ACKNOWLEDGMENTS

Collections of specimens in the field were carried out with permission from the "Secretaría del Medio Ambiente and Recursos Naturales" (SGPA/DGVS/1266). We specially thank Hector Cervantes Maya for his support on the field to collect the plant sample and Biol. Luis Barbo Hernández Portilla for his technical support in the Phytochemical analysis of the samples. The study was funded by the following grants: UNAM PAPCA 2009 to and Proyecto Conservación de Plantas Útiles de San

Rafael, Coxcatlán, MGU/Useful Plants Project (UUP)-México, Royal Botanic Gardens and Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México for the formation received during the studies of Doctorate of the M. in C. Rocio Serrano Parrales.

REFERENCES

- Abad MJ, Bermejo P, Carretero E, Martínez-Acitores C, Noguera B, Villar A (1996). Antiinflammatory activity of some medicinal plant extracts from Venezuela. *J. Ethnopharmacol.* 55(1):63-68.
- Abdel-Hameed ESS (2009). Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chem.* 114(4):1271-1277.
- Amico-Roxas M, Caruso A, Trombadore S, Scifo R, Scapagnini U (1984). Gangliosides antinociceptive effects in rodents. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 272(1):103-117.
- Becerra JX, Venable DL, Evans PH, Bowers WS (2001). Interactions between chemical and mechanical defenses in the plant Genus *Bursera* and their implications for herbivores. *Amer. Zool.* 41(4):865-876.
- Blackwell GJ, Carnuccio R, Di Rosa M, Flower RJ, Parente L, Persico P (1980). Macrocortin: a polypeptide causing the anti-phospholipase effect of glucocorticoids. *Nat.* 287:147-149.
- Borgi W, Recio MC, Ríos JL, Chouchane N (2008). Anti-inflammatory and analgesic activities of flavonoid and saponin fractions from *Zizyphus lotus* (L.) Lam. *S. Afr. J. Bot.* 74(2):320-324.
- Canales M, Hernández T, Caballero J, Romo de Vivar A, Avila G, Durán A, Lira R (2005). Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *J. Ethnopharmacol.* 97(3):429-439.
- Cárdenas LC, Rodríguez J, Villaverde MC, Riguera R, Cadena R, Otero JA (1993). The analgesic activity of *Hedyosmum bonplandianum*: flavonoid glycosides. *Planta Med.* 59(1):26-27.
- Carretero ME, López PJL, Abad MJ, Bermejo P, Tillet S, Israel A, Noguera PB (2008). Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves. *J. Ethnopharmacol.* 116(1):11-15.
- Castro J, Sasame H, Sussman H, Bullette P (1968). Diverse effects of SKF52 and antioxidants on CCl₄ induced changes in liver microsomal P-450 content and ethyl-morphine metabolism. *Life Sci.* 7:129-136.
- Cole JR, Bianchi E, Trumbull ER (1968). Antitumor agents from *Bursera microphylla* (Burseraceae) II. Isolation of a new lignin-burseran. *J. Pharm. Sci.* 58(2):175-176.
- Collier HQ, Dinneen LC, Johnson CA, Schneider C (1968). The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 32(2):295-310.
- De Bruyne T, Pieters L, Deelstra H, Vlietinck A (1999). Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochem. Syst. Ecol.* 27(4):445-459.
- Dey PM, Harborne JB (1989). *Methods in Plant Biochemistry*. Vol 1: Plant phenolics. London. Academic Press. p.552.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000). NADPH oxidase: role in cardiovascular biology and diseases. *Circ. Res.* 86:494-501.
- Hayden MS, Ghosh S (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* 132(3):344-362.
- Higgs GA, Flower RJ, Vane JR (1979). A new approach to anti-inflammatory drugs. *Biochem. Pharmacol.* 28(12):1959-1961.
- Jolad SD, Wiedhopf RM, Cole JR (1977a). Cytotoxic agents from *Bursera klugii* (Burseraceae) I: isolation of sapelins A and B. *J. Pharm. Sci.* 66(6):889-890.
- Jolad SD, Wiedhopf RM, Cole JR (1977b). Cytotoxic agents from *Bursera morelensis* (Burseraceae): Deoxypodophyllotoxin and a new lignan, 5'-desmethoxydeoxypodophyllotoxin. *J. Pharm. Sci.* 66(6):892-893.
- Jutiviboonsuk A, Zhang H, Teng TG, Ma C, Van HN, Manh CN, Bunyapraphatsara N, Soejarto DD, Fong HHS (2005). Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*. *Phytochem.* 66(23):2745-2751.

- Khanna S, Venojarvi M, Roy S, Sharma N, Trikha P, Baqchi D, Bagchi M, Sen CK (2002). Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. *Free Radic. Biol. Med.* 33(8):1089-1096.
- Kumara SHM, Krishna V, Shankarmurthy K, Abdul RB, Mankani KL, Mahadevan KM, Harish BG, Raja NH (2007). Wound healing activity of embelin isolated from the ethanol extract of leaves of *Embelia ribes* Burm. *J. Ethnopharmacol.* 109(3):529-534.
- Lopes GC, Sanches AC, Nakamura CV, Dias Filho BP, Hernandes L, De Mello JC (2005). Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. *J. Ethnopharmacol.* 99(2):265-272.
- McDoniel PB, Cole JR (1972). Antitumor activity of *Bursera schlechtendalii* (Burseraceae): Isolation and structure determination of two new lignans. *J. Pharm. Sci.* 61(12):1992-1994.
- Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52(4):673-751.
- Noguera B, Díaz E, García MV, Feliciano AS, López-Perez JL, Israel A (2004). Anti-inflammatory activity of leaf extract and fractions of *Bursera simaruba* (L.) Sarg (Burseraceae). *J. Ethnopharmacol.* 92(1):129-133.
- NOM-062-ZOO (1999). Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México D.F.
- Peraza SSR, Salazar-Aguilar NE, Peña-Rodríguez LM (1995). A new triterpene from the resin of *Bursera simaruba*. *J. Nat. Prod.* 58(2):271-274.
- Peterson J, Dwyer J (2000). An informatics approach to flavonoid database development. *J. Food Comp. Anal.* 13(4):441-454.
- Picq M, Cheav SL, Prigent AF (1991). Effect of two flavonoid compounds on central nervous system. Analgesic activity. *Life Sci.* 49(2):1979-1988.
- Pradilla VOE (2004). Ciclooxigenasa 3: La nueva iso-enzima en la familia. *Med. UNAB.* 7(21):181-184.
- Rise-Evans C, Miller N, Paganga G (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant. Sci.* 2(4):152-159.
- Rzedowski J, Medina LR, Rzedowski CG (2004). Las especies de *Bursera* (Burseraceae) en la Cuenca superior del Río Papaloapan (México). *Acta Bot. Mex.* 66:23-151.
- Singleton VL, Rossi JA (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16(3):144-158.
- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat. Res.* 579(1):200-213.
- Souza GE, Ferreira SH (1985). Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. *Agents and Actions.* 17(1):97-103.
- Tenorio LFA, Del Valle ML, Pastelín HG (2006). Flavonoids and cardiovascular system: Can be a therapeutic alternative? *Arch Cardiol. Mex.* 76(4):33-45.
- Torel J, Cillard J, Cillard P (1986). Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochem.* 25(2):383-385.
- Van Arman CG, Begany AJ, Miller LM, Pless HH (1965). Some details of the inflammations caused by yeast and carrageenan. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 150:328-334.
- Vázquez B, Avila G, Segura D, Escalante B (1996). Anti inflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. *J. Ethnopharmacol.* 55(1):69-75.
- Vinegar R, Schreiber W, Hogo R (1979). Biphasic development of carrageenan edema in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 166(1):96-103.
- Wickramaratne DB, Mar W, Chai H, Castillo JJ, Farnsworth NR, Soejarto DD, Cordell GA, Pezzuto JM, Kinghorn AD (1995). Cytotoxic constituents of *Bursera permollis*. *Planta Med.* 61(1):80-81.
- Wiseman H, Halliwell B (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 313:17-29.