



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza



“Evaluación del efecto cicatrizante y antimicrobiano del extracto etanólico de *Eupatorium aschembornianum* Sch. en ratones CD1 et/et”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Química Farmacéutico Biológica

PRESENTA:

Pedraza Bonilla Yaseming

Director: Dr. Rubén Marroquín Segura

Asesor: Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara

Laboratorio 1PA UMIEZ

Este trabajo recibió apoyo del proyecto PAPIIT IG300315

México, CDMX 2016





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.

“La vida está basada en oxidaciones normales; los sueños son funciones del cerebro y las funciones del cerebro son meras oxidaciones... Los sueños son algo así como una fosforescencia del cerebro”

Paul Ehrlich

Dedicatoria

Dedico este trabajo a todos los que han sido parte de este gran viaje, más allá de cualquier ideología, mientras siga adelante recordare la ternura, las palabras de aliento y el abrazo que me brindaron.

A mi familia que está conmigo siempre; mi madre que siempre permanece al pendiente de mí, cuyos esfuerzos por mi bienestar han sido incontables y que con sus palabras tome la fuerza para siempre seguir adelante; mi padre por darme la oportunidad de estudiar y con sus enseñanzas ayudarme a ser mejor cada día, a mis hermanos que me recuerdan que no estoy sola, y que tengo por quien salir adelante y que puedo dar más siempre; a ellos que me han ayudado como ellos saben hacerlo.

A Daniel mi amigo durante este camino, que me demostró que era capaz de caminar sola pero que acompañada de una hermosa amistad es mejor, gracias a sus dudas y preguntas me ayudo a mejorar, por los repasos antes de un examen, por las risas entre amigos, por las desveladas juntos intentando terminar un trabajo, y por todos los compañeros que conocí en el camino y que nutrieron mi experiencia a través de la suya. A Karen una buena amiga incondicional que complemento un buen trio de amistad.

A Carlos Alberto que me acompaña siempre incondicionalmente, ayudándome a que no me desaliente y persista, por enseñarme que nunca es tarde para ser quien quiera ser, que no hay límites, que haga de todo lo mejor y siempre tenga el valor de empezar de nuevo, por enseñarme a apreciar las victorias.

A Marcos Nejapa Alonso quien me enseñó a que no tenemos que correr hacia ninguna parte, sólo saber dar cada paso plenamente, que cuando somos más grandes que lo que hacemos nada puede desequilibrarnos y que el camino nos lo tenemos que hacer nosotros.

A los amigos que me permití conocer y ofrecieron su mano en el transcurso, demostrando que aun con los que menos esperamos se tiene tanto en común, Jonathan y Adrián enseñándome la solidaridad y honestidad.

Agradezco a mi entereza y perseverancia para concluir este ciclo, ahora dialogo con mi corazón y lo interrogo tratando de encontrar las palabras verdaderas, las palabras rectas, una a una las voy buscando, engarzando, acomodando:

A todos ustedes Tlazohcamatic

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas para formar parte de esta máxima casa de estudios, así mismo a la Facultad de Estudios Superiores por ser mi segunda casa donde crecí tanto personal como profesionalmente y a la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) donde pude realizar mi proyecto.

Al Dr. Rubén Marroquín Segura por permitirme ser parte de su gran equipo de trabajo, confiándome un proyecto y orientándome para desarrollarlo, a mi asesor el Dr. José Luis A. Mora Guevara por apoyarme en el desarrollo de mi tesis y al tratamiento estadístico de mis resultados, a mis sinodales M. Ma. Martha Ugalde Hernández, Q.F.B. Carina Gutiérrez Iglesias y Q.F.B. Esperanza Jiménez Castañeda que me otorgaron de su valioso tiempo para la revisión de mi tesis. A la M. Yolanda Flores Cabrera por su amable compañía en el laboratorio.

Así mismo agradezco a mis compañeros del laboratorio 1 PA de la UMIEZ, Jonathan, Adrián y Alan que hicieron de mi estancia algo agradable, apoyándome en mi trabajo día a día. Así también por el respeto a la vida agradezco a los ratones utilizados en el trabajo.

Sin el apoyo de todos este proyecto no habría sido posible.

Contenido

1.	Introducción.....	1
2.	Marco teórico	2
2.1	LA PIEL: Estructura y funciones	2
2.2	HERIDAS: Evolución y tratamiento	5
2.2.1	Cicatrización.....	7
2.2.2	Factores que afectan una correcta cicatrización	7
2.3	Axihuitl (<i>Eupatorium aschembornianum</i> Sch.).....	9
2.3.1.	Usos tradicionales de la planta	9
2.4	Técnicas y fundamento.....	11
2.4.1	Ratones CD1 et/et	11
2.4.2	Determinación de óxido nítrico	11
2.4.3	Hidroxiprolina	17
2.4.4	Determinación microbiológica	18
3	Planteamiento del problema	20
4	Objetivo	21
5	Hipótesis	21
6	Diseño experimental	22
7	Material.....	23
8	Metodología para la determinación del efecto cicatrizante y antibacteriano del extracto etanólico de <i>Eupatorium aschembornianum</i> Sch.....	25
8.1	Preparación de ungüento de <i>Eupatorium aschembornianum</i> Sch al 4%.....	25
8.2	Elaboración de escisiones y evaluación de su cicatrización	25
8.3	Determinación de hidroxiprolina	27
8.4	Determinación de nitritos	29
8.5	Determinación de actividad antibacteriana y antimicótica	32
9	Resultados.....	34
10	Tratamiento de resultados.....	44
11	Análisis de resultados	48
12	Conclusión.....	49
13	Referencias	50

1. Introducción

En medicina las heridas tienen varios conceptos y normas con relación a su tratamiento, algunas definiciones que dan un panorama de lo que es una herida son las siguientes: “Pérdida de continuidad de la piel o mucosa producida por algún agente físico o químico”¹ “Lesiones que rompen la piel u otros tejidos del cuerpo, incluyen cortaduras, arañazos y picaduras en la piel, suelen ocurrir como resultado de un accidente o intervención quirúrgica”². La gran importancia de estas afecciones es que si su tratamiento no es el adecuado se pueden presentar complicaciones difíciles, como infecciones, abscesos, dehiscencia o separación de las suturas, necrosis, queloides (cicatriz grande y dura), y retraso en la cicatrización.

Existen diversos tratamientos para acelerar la cicatrización, sin embargo, la población desde hace muchos siglos ha buscado remedios alternos a sus males, así algunos productos naturales ofrecen alternativas viables para su tratamiento; no obstante, estos remedios no presentan ningún estudio científico y experimental que confirme su efecto.

Eupatorium aschembornianum Sch. es una hierba silvestre recomendada en caso de heridas internas en personas intervenidas quirúrgicamente o úlceras gástricas y en caso de heridas expuestas. Debido a que no existe investigación sobre su posible efecto, en el presente trabajo se propone evaluar sus efectos en la cicatrización, ya sea por actuar como cicatrizante o como bactericida.

La cicatrización es un proceso largo que consta de tres pasos: fase inflamatoria, fase de proliferación y fase de diferenciación, en estos procesos se producen

algunas sustancias que pueden ser medidas mediante métodos espectrofotométricos, por ejemplo la hidroxiprolina que es un aminoácido no esencial derivado del colágeno; por otro lado nos encontramos con el óxido nítrico (NO) que participa en la cicatrización, estimulando la angiogénesis o por un efecto trófico en la proliferación de células epidérmicas³.

La evaluación del efecto cicatrizante se realizó al comparar los diámetros de heridas realizadas en ratones, observando el progreso de dichas heridas diariamente; así también se evaluó si hubo un aumento en la producción de colágeno al determinar la concentración de hidroxiprolina en las pieles de los ratones lesionados días antes y tratados con una preparación del extracto de *Eupatorium aschembornianum* Sch, también se realizó una determinación de nitritos en el suero de los ratones para evaluar si se presenta un aumento en el proceso de angiogénesis.

Finalmente debido a que evitar que una herida se infecte es parte fundamental de una correcta cicatrización, se evaluó la actividad antibacteriana de *Eupatorium aschembornianum* Sch contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos levaduriformes, por un método de difusión en medios nutritivos.

2. Marco teórico

2.1 LA PIEL: Estructura y funciones

Los seres humanos habitamos en un ambiente altamente poblado de microorganismos, sin embargo, solo unos cuantos microorganismos se establecen como residentes de la piel. Esto se debe a que la piel posee factores de protección que limitan la colonización y la supervivencia de los microorganismos.⁴ La piel es

la cubierta externa del cuerpo humano y uno de los órganos más importantes del mismo tanto por tamaño como por sus funciones. La piel separa al organismo del medio ambiente externo y, al mismo tiempo, permite su comunicación con él mismo por medio del tacto, la presión, temperatura y receptores del dolor. La piel sana es una barrera contra agresiones mecánicas, químicas, tóxicas, calor, frío, radiaciones ultravioletas y microorganismos patógenos.⁵

Desde afuera hacia dentro, se distinguen tres capas de tejido, cuyo origen embriológico es totalmente distinto:

- La epidermis: La porción externa y más delgada, está en contacto directo con el ambiente externo. Está compuesta por muchas capas de láminas continuas de células epiteliales muy juntas con poco o ningún material entre ellas. Las células epidérmicas de la capa superior están muertas y contienen una proteína protectora denominada queratina, como esta capa superior se descama periódicamente, esto ayuda a eliminar los microorganismos de la superficie.⁶

Presenta un espesor variable, con un valor medio de 0.1 mm, pudiendo alcanzar en zonas como las plantas de los pies y las palmas de las manos espesores de hasta 1 ó 2 mm. Esta normalmente compuesta por cuatro capas diferentes que desde el exterior hacia el interior serían:

- Capa córnea
- Capa granular
- Capa de células espinosas
- Capa basal

En aquellas zonas donde se presenta con un mayor grosor, la epidermis tiene cinco capas al contar con la capa lúcida (*Stratum lucidum*), la cual está situada entre la capa córnea y la granular.

- La dermis o corion: La porción interna y más gruesa de la piel, está compuesta por tejido conectivo fibroelástico. Es la estructura de soporte de la piel y le proporciona resistencia y elasticidad. La matriz extracelular contiene una elevada proporción de fibras, no muy compactadas, de colágeno (>75%), elastina y reticulina. Es un tejido vascularizado que sirve de soporte y alimento a la epidermis. Constituye la mayor masa de la piel y su grosor máximo es de unos 5 mm. Histológicamente, se divide en dos:

- La capa papilar (*Stratum papillare*)
- La capa reticular (*Stratum reticulare*)

- El tejido subcutáneo o también denominado hipodermis o subcutis.

Si consideramos las células dispuestas de manera muy compacta, las capas continuas, la presencia de queratina, la sequedad y la descamación de la piel entenderemos por que la piel intacta proporciona una barrera formidable contra la entrada de microorganismos. En la superficie intacta de la epidermis sana rara vez o nunca penetran microorganismos. En cambio, cuando la superficie epitelial se rompe, a menudo se produce una infección subcutánea. Las bacterias con más probabilidad de causar infección son los estafilococos que habitan en la epidermis, los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas y sebáceas de la piel. Las infecciones de la piel y los tejidos subyacentes suelen desarrollarse como

resultado de quemaduras, cortes, heridas punzantes u otras situaciones que determinan la ruptura de la piel.⁶

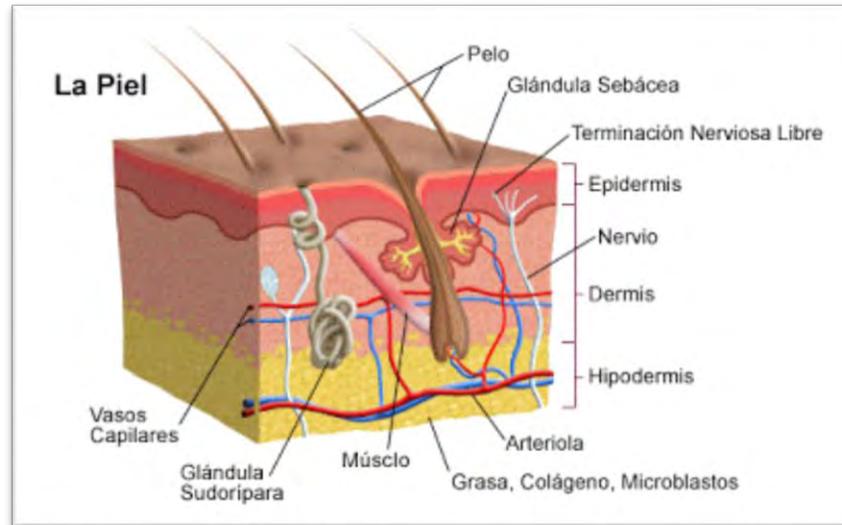


Fig. 1 Estructura de la piel

2.2 HERIDAS: Evolución y tratamiento

Las heridas han tenido diferentes definiciones, sin embargo, las más aceptadas en la actualidad son las siguientes: “Pérdida de continuidad de la piel o mucosa producida por algún agente físico o químico”¹, “Lesiones que rompen la piel u otros tejidos del cuerpo, incluyen cortaduras, arañazos y picaduras en la piel, suelen ocurrir como resultado de un accidente o intervención quirúrgica”², “Toda disrupción de estructuras anatómicas y funcionales normales”⁷. Existen varias clasificaciones de heridas, por ejemplo, heridas agudas o crónicas, basándose en los conceptos de orden y temporalidad.

- Herida Aguda: es aquella que sigue un proceso de reparación ordenado, dentro de un tiempo adecuado, que restaura la integridad anatómica y funcional.

-
- Herida Crónica: es aquella que no sigue un proceso de reparación ordenado o que sigue un proceso de reparación que no restaura la integridad anatómica y funcional.⁷

Las fases de curación de la herida independientemente del tipo de herida de que se trate y de la extensión que abarque la pérdida de tejido, ocurre en fases que se solapan en el tiempo y no se pueden dissociar unas de otras. La subdivisión en fases está orientada a las modificaciones morfológicas básicas que se producen durante el proceso de reparación, sin que refleje la intrínseca complejidad de los procedimientos.

Por regla general la curación se divide en tres fases:

- Fase inflamatoria y/o exudativa: hemostasia y limpieza de la herida, se inicia en el momento en que se produce la herida y su duración es aproximadamente de tres días, dependiendo de las condiciones fisiológicas. Las primeras reacciones vasculares y celulares consisten en la coagulación y la hemostasia y concluyen después de haber transcurrido aproximadamente 10 minutos.
- Fase de proliferación: reconstrucción de los tejidos de granulación, por medio de la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad vascular se consigue intensificar la exudación de plasma sanguíneo en los intersticios del endotelio vascular. Con ello se fomenta la migración de los leucocitos hacia la zona de la herida, sobre todo de granulocitos y macrófagos. Éstos tienen como función proteger la herida de posibles infecciones y limpiarla a través de la fagocitosis. Al

mismo tiempo liberan mediadores bioquímicos activos, que activan y estimulan células de gran importancia para la siguiente fase.

- Fase de diferenciación: maduración, cicatrización y epitelización.

2.2.1 Cicatrización

La cicatrización se define como el reemplazo de células y tejidos mediante regeneración,⁸ en el proceso de cicatrización las células pueden ser las mismas a las que se perdieron o diferentes, formando una copia de la estructura primitiva.

Las etapas de cicatrización se dividen en dos:

- Remoción del material inflamatorio y restos necróticos
- Reemplazo del tejido original

2.2.2 Factores que afectan una correcta cicatrización

Existen muchos factores que afectan el proceso de cicatrización que van desde el estado del paciente, por ejemplo, el estado nutricional (desnutrición u obesidad), salud (diabetes o ingesta de medicamentos), edad, el alcoholismo y el tabaquismo; o los relacionados a las condiciones de la herida como, la poca humectación de la herida, la oxigenación, el calor y exudado purulento y dolor que son signos de infección⁹.

Infección

La relación de los microorganismos con una herida puede presentarse de tres formas, ya sea como contaminación, colonización o infección. Una infección se define como la invasión y desarrollo de un microorganismo, generalmente parásito (virus, bacteria, hongo, protozoo o invertebrado), en los tejidos del hospedador aun sin darse manifestaciones clínicas importantes. Para que se desencadene la enfermedad infecciosa el organismo que infecta debe poder penetrar a través de

los revestimientos cutáneos y mucosos, multiplicarse, y en algunos casos, elaborar sustancias tóxicas.⁷

En la piel existen microorganismos pertenecientes a la flora normal, por ello es importante concentrarse en la esterilidad de la herida y hacer un diagnóstico a tiempo en caso de una infección. De esta forma si una infección es detectada se debe iniciar el tratamiento con antibióticos sistémico o local; sin embargo, los antibióticos sistémicos no logran niveles adecuados en el tejido de granulación y por ende no tienen efecto sobre el nivel bacteriano de heridas crónicas.⁷

Humectación

Winter y Scales, en 1963, realizan el primer estudio experimental que demuestra que la cicatrización en ambiente húmedo es más rápida que aquella que se realiza en ambiente seco, pues previene la desecación celular, favorece la migración celular y la angiogénesis, estimula la síntesis de colágeno y favorece la comunicación intercelular. Todos estos elementos se traducirían en efectos clínicos como menos dolor, aislamiento térmico, desbridamiento autolítico, mayor velocidad de cicatrización y mejor calidad en la cicatriz. El ambiente húmedo otorga a la herida un medio lo más natural posible para que los procesos de reparación tisular se lleven a cabo sin alteraciones. Al proporcionar este medio semioclusivo y húmedo, se mantiene un pH levemente ácido (5.5-6.6) y una baja tensión de oxígeno en la superficie de la herida, lo que estimula la angiogénesis. Además, se mantiene una temperatura y humedad adecuadas que favorecen las reacciones químicas, la migración celular y el desbridamiento de tejido esfacelado.⁷

2.3 Axihuitl (*Eupatorium aschembornianum* Sch.)

Nombre científico: *Eupatorium aschembornianum* Sch. Ageratina conspicua (G. B. Hinton)¹⁰ (Kunth & C.D. Bouché) (R.M.King & H.Rob.)¹¹

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae



Fig. 2 *Eupatorium aschembornianum* Sch

Hierba silvestre, que florece principalmente en los meses de noviembre a febrero, nativa de México. Es una mata grande, de abundantes hojas en forma de corazón, que alrededor de esta contiene unas onditas y una especie de filamentos, de tronco grueso, áspero al tocarlo, con una especie de manchitas en todo su alrededor, se da en varas grandes.¹²

2.3.1. Usos tradicionales de la planta

Es una hierba muy utilizada en el municipio de Tepoztlán, Morelos, México, con distintos usos tradicionales que van desde su infusión en té en caso de heridas internas en personas intervenidas quirúrgicamente o úlceras gástricas; en caso de heridas abiertas como principal método de cicatrización, lo emplean directo en la

herida como un antiséptico o como agente antimicrobiano contra hongos patógenos humanos (*Trichophyton rubrum*, *Candida albicans*); así también en tecnologías de control biológico de enfermedades de plantas, en este marco de referencia, se encuentran extractos, aceites esenciales o moléculas aisladas del axihuitl.^{13,14}

Algunas personas la combinan con otras plantas para mayor efecto, algunas otras preparan una bebida estimulante llamada paglaposon o curalotodo, en ocasiones solo preparan una tinción y otras lo utilizan en forma de té. Esta planta es utilizada como método para sanar heridas y para desinfectarlas tanto en personas como en animales.

Forma de preparación: Se prepara en un frasco de vidrio con las hojas anteriormente lavadas y se agrega alcohol hasta cubrirlas, debe tomar un color verdoso y está listo para su empleo. Se vierte en las heridas, y continúa su uso por lo menos unos tres días después del accidente o de la lesión que se haya sufrido. Los beneficios son muchos debido a que mencionan que la cicatrización con este preparado es inmediata y de bajo costo.¹³

Otra forma de prepararlo es en té (infusión): Una hoja se divide en cuatro partes iguales, de las cuales solo se toma una cuarta parte, se deja hervir un litro de agua y después se agrega la cuarta parte de la hoja dejando hervir de 3 a 5 minutos, se deja enfriar, y se procede a beber cuanto la persona quiera durante un lapso de 3 a 5 días o si la persona lo desea puede beberlo por mas días. Actualmente no se ha obtenido gran información científica de esta planta, debido a

que no se conoce y mucho menos se conocen su uso curativo mediante la investigación clínica científica.

2.4 Técnicas y fundamento

2.4.1 Ratones CD1 et/et

Los ratones CD1 et/et fueron desarrollados a partir de la transferencia del gen desnudo, la alopecia es el resultado de un gen recesivo autosómico simple, el símbolo “et” se ha adoptado para referir a la forma mutante. Se ha observado que los machos se caracterizan por presentar un timo histológicamente igual al de los ratones normales, pero con un tamaño y peso menor, por lo que se les definió como hipotímicos, mientras que las hembras presentan un rudimento tímico, el cual se asemeja histológicamente a un nódulo linfóide, por lo que están catalogadas como atímicas. No hay diferencias entre el ratón CD1 y el et/et en lo que respecta al rechazo de xenoinjertos; por lo que esta especie es ideal para el estudio de tumores y la investigación de xenoinjerto.¹⁵⁻¹⁷

Durante el desarrollo de la colonia se ha observado tanto en machos como en hembras, una marcada susceptibilidad a problemas cutáneos como abscesos, dermatitis bacteriana y dermatomicosis, así como un incremento en la frecuencia de parasitosis por *Eimeria spp*, neumonías, uveítis (cataratas), fertilidad baja, mortalidad alta, hipotímico y signos clínicos de envejecimiento prematuro.¹⁶⁻¹⁷

2.4.2 Determinación de óxido nítrico

El cuerpo humano produce óxido nítrico (NO) con ayuda de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a partir de la L-arginina, que posee tres isoformas, NOS-I, NOS-II y NOS-III. La NOS-I y la NOS-III son descritas como isoformas constitutivas (cNOS) y pueden ser objeto de regulación génica, mientras que la NOS-II representa la

isoforma inducible (iNOS) que se expresa en células estimuladas por diferentes citoquinas proinflamatorias como la interleuquina-1 (IL-1), interferon gamma (INF- γ) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). La NOS-II produce concentraciones mucho más elevadas de NO con respecto a la actividad de NOS-I y NOS-III.¹⁵ De forma análoga a la respiración y fermentación celular, cuando la célula no tiene suficiente oxígeno para poder sintetizar óxido nítrico mediante la enzima NOS, utiliza la ruta alternativa del nitrato/nitrito.¹⁸⁻¹⁹

Los nitritos y nitratos ingeridos en la dieta o como residuos del metabolismo del NO, son utilizados por el cuerpo humano para generar NO de forma alternativa a la NOS. El NO es una de las pocas moléculas gaseosas que el cuerpo humano utiliza como molécula señalizadora, es un radical libre que participa en la patogenia de muchas enfermedades, debido a que es sintetizado por condrocitos y sinoviocitos como consecuencia del estímulo de citoquinas proinflamatorias¹⁵, también actúa como neurotransmisor en el cerebro, regulador del sistema cardiovascular y en las defensas, que lo emplean para destruir microorganismos utilizando el NO para atacar ADN, proteínas y componentes de la pared celular.¹⁸⁻¹⁹

Los métodos oficiales para la determinación del NO implican procedimientos espectrofotométricos basados en la diazotización de Griess, en la cual el nitrito reacciona con la sulfanilamida en medio ácido, obteniendo un diazo compuesto que reacciona con el clorhidrato de N-naftiletildiamina (NED), generando un compuesto de coloración roja intensa. Dicha técnica detecta específicamente

nitrito (NO_2^-) en el suero obtenido tras la extracción de sangre y posterior centrifugado de los tubos.¹⁹⁻²²

Ventajas

- Es una alternativa a técnicas incómodas que requieren una separación previa del nitrito por cromatografía, que excluyen la mayor parte de muestras de origen biológico, pues tienden a precipitar en la columna.
- Se pueden medir concentraciones diluidas por debajo de 1 mM.
- Proporciona un gran número de sustratos nitrosables, que se pueden utilizar en diferentes técnicas.
- La variedad de técnicas que proporciona, permiten esquivar interferencias, problemas de purificación y descomposiciones.

Desventajas

- Requiere medios ácidos que favorecen la descomposición del nitrito en óxido nitroso.
- Se forman colorantes de tipo azoico, los cuales tienen un alto grado de toxicidad.
- Se llevan a cabo tres reacciones en las que participan compuestos inestables.

Diazotización de Griess

En 1879 Peter Griess propuso utilizar las reacciones de diazotación que había descubierto para la cuantificación de nitritos. La mezcla que sugirió, ácido sulfanílico y 1-naftilamina en presencia de ácido sulfúrico, se denominó reactivo de

Griess. En 1889, Lajos Ilosvay, profesor de química en la Universidad de Budapest, perfeccionó el reactivo sustituyendo el ácido sulfúrico por ácido acético, que reducía la descomposición del nitrito a la vez que aceleraba la velocidad de reacción. Su mezcla, llamada posteriormente reactivo de Griess-Ilosvay, se hizo muy popular y actualmente se sigue utilizado rutinariamente en multitud de áreas. La reacción de Griess consta de tres reacciones:

- 1.- En primer lugar, a partir de nitrito se forma un agente nitrosante que nitrosa la 1-naftilamina.
- 2.-A continuación, ésta se reordena en un diazocompuesto
- 3.- Por último, se produce la reacción de copulación entre el diazocompuesto y el ácido sulfanílico.

Esta reacción tiene lugar entre una amina primaria aromática y NaNO_2 en presencia de HCl o H_2SO_4 , para formar una sal de diazonio.²³

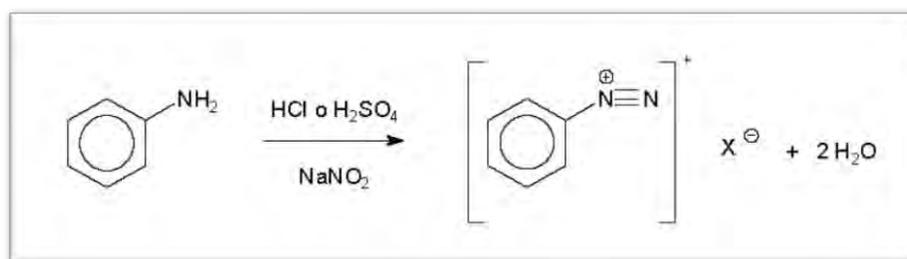


Fig. 3 Reacción de diazotización

Reacciones de copulación

Los iones diazonio aromáticos son electrófilos débiles capaces de realizar sustituciones en compuestos ricos en electrones, como los anillos aromáticos

activados. Esta reacción se conoce como reacción de copulación. Los sustituyentes del ion diazonio y del anillo aromático con el que copula son fundamentales para fomentar la reacción. Con la C-nitrosación, favorecerá la reacción que el anillo aromático esté unido a grupos que cedan sus electrones y aumenten su densidad electrónica, como alcoholes o éteres. Del mismo modo, sustituyentes deficientes en electrones, como nitratos o ésteres, aumentan el carácter electrófilo del ion diazonio y facilitan la reacción. El pH es también un factor importante en la copulación. Si es demasiado bajo, se puede protonar el grupo que cede electrones al anillo aromático y sustraerlos. Si el pH es demasiado alto, la mayor parte del ion diazonio se encuentra en forma de Ar-N=N-OH ó Ar-N=N-O^- , por lo que la concentración de diazonio efectiva es muy baja. Los productos de la reacción de copulación son los azocompuestos. Generalmente se utilizan como colorantes debido a que tienen un color muy intenso provocado por la deslocalización electrónica que proporciona el puente azo. Además, el gran número de combinaciones diferentes que se pueden preparar mediante las reacciones de copulación permite obtener casi cualquier color.¹⁸

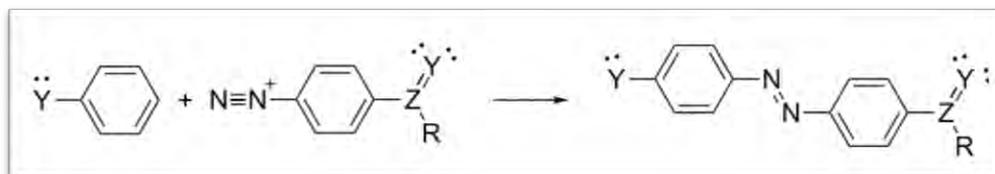


Fig. 4 Reacción de copulación

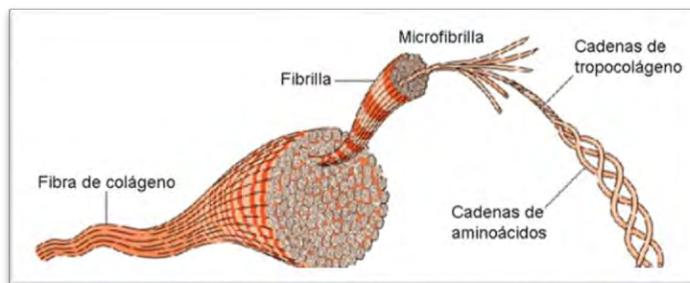
Otras técnicas

Existen otros métodos para el análisis cuantitativo del nitrito, pero son poco frecuentes y tienen menos aplicaciones. Por ejemplo, al principio se medía

añadiendo hidroxilamina o yoduro, de esta forma el nitrito se reducía a nitrógeno que se recogía y se medía. Sin embargo actualmente existen otras técnicas que miden el nitrito directamente por conductimetría o electrocatálisis, otras utilizan los compuestos obtenidos de la reacción de Griess, como difenilamina para medir mediante polarografía de pulso diferencial; 2, 4, 6-triaminopirimidina, mepazina, 2-mercaptoetanol o ácido cromotrópico, entre otros, para el uso de colorimetría; diaminonaftaleno para fluorimetría, o los compuestos volátiles 1-hidrazinoftalazina o *p*-bromoanilina para la determinación mediante cromatografía de gases. Otras técnicas consisten en nitrosar compuestos reductores como el ion yoduro o el ácido ascórbico que convierten todo el nitrito en óxido nitroso, que se puede medir luego por quimioluminiscencia, estas son técnicas de tres pasos, puesto que después de la nitrosación del reductor existe una reacción de transferencia electrónica interna que forma óxido nítrico. Otro reductor empleado es la hidroquinona, que permite cuantificar el óxido nítrico por neumatoamperometría. Algunas están basadas en la capacidad del nitrito de catalizar algunas reacciones, otros utilizan enzimas biológicas, como la nitritoreductasa para obtener amoníaco y cuantificarlo o, incluso, se ha desarrollado un método de cinco pasos, basado en el de Griess que, tras la copulación, emplea sulfato de amonio y cobre (II) para formar un triazol fluorescente. Aunque se puede escoger entre infinidad de métodos en función del origen de las muestras, del precio o del tiempo, material y precisión necesarios, el método de Griess sigue siendo hoy el más utilizado a pesar de su antigüedad.¹⁸

2.4.3 Hidroxiprolina

El proceso de cicatrización de la herida se inicia por estímulos fisiológicos en respuesta al trauma ocasionado. Los mediadores de esta



respuesta son sustancias con

Fig. 5 Estructura del colágeno

estructuras bioquímicas definidas, que desarrollan un proceso de síntesis para cumplir su función. La cicatrización misma está basada en proteínas fundamentales como el colágeno, con características diferentes a la mayoría de las proteínas, por ser de estructura fibrosa, rica especialmente en 4-hidroxiprolina, lo que la hace un tipo de proteína único en el organismo. La organización misma de ella define sus características de resistencia propias de la cicatriz.²⁴

Estudios con compuestos marcados han puesto de manifiesto que se forma hidroxiprolina por hidroxilación de la prolina, la cual está unida a los péptidos en las etapas preliminares primitivas de las moléculas de colágeno.

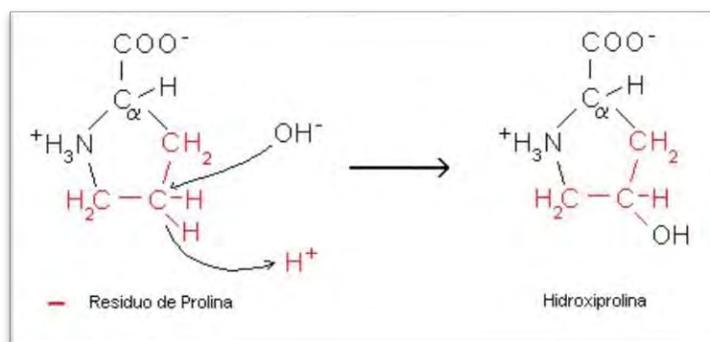


Fig. 6 Formación de la hidroxiprolina

La determinación de hidroxiprolina utiliza técnicas colorimétricas, que se llevan a cabo en dos etapas. En la primera se oxida la hidroxiprolina a un compuesto de

estructura pirrólica (ácido pirrol-2-carboxílico). Los oxidantes convencionales son el peróxido de hidrogeno y la sal sódica de la N-clorop-toluen-sulfonamida. Después de eliminar el exceso de oxidantes se añade un reactivo constituido por p-dimetilamino-benzaldehido en un disolvente orgánico, a lo que se denomina reactivo de Ehrlich, obteniéndose un cromóforo rojo. Se determina la cantidad de este cromóforo espectrofotométricamente, y ellos constituye una medida de la cantidad de hidroxiprolina existente en la muestra examinada.²⁵

2.4.4 Determinación microbiológica

Patrón de turbidez (escala de Mcfarland)

La escala de Mcfarland se utiliza como patrón de turbidez en la preparación de suspensiones de microorganismos. Esta consiste en la preparación de una serie de soluciones con Cloruro de Bario ($BaCl_2$) y Ácido Sulfúrico (H_2SO_4), generando un precipitado de Sulfato de Bario ($BaSO_4$) con turbidez reproducible. Para la determinación de sensibilidad se deben utilizar inóculos estandarizados para el hisopado de las placas con la finalidad de evitar extremos en la densidad del inóculo; los excesos o defectos en la densidad del inoculo producen cambios muy grandes en los resultados finales del ensayo.

Determinación antibacteriana por el método de difusión

La determinación de la sensibilidad se realizará por difusión en agar, el principio del método involucra la elaboración de pozos con una cantidad determinada de antimicrobiano en el agar, sobre el cual se ha distribuido un inóculo del microorganismo en cuestión; se formará así, por difusión, un gradiente de concentración de antimicrobiano alrededor del pozo y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del

crecimiento bacteriano, que se mide en milímetros. El diámetro obtenido dependerá no sólo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del antimicrobiano, sino también del espesor de la capa de agar, su pH y composición, de la capacidad de difusión de la sustancia en ese medio, de la temperatura y atmósfera de incubación, de la velocidad de duplicación bacteriana, del tamaño del inóculo y la fase de crecimiento de la bacteria, etc.

3 Planteamiento del problema

Las comunidades autóctonas y un sector de la población en las ciudades de México se han dedicado a la herbolaria, de la cual no se tiene una valoración experimental y documental, por ello los efectos atribuidos a las plantas medicinales solo son empíricos. La *Eupatorium aschembornianum* Sch se recomienda por la población para el tratamiento de heridas expuestas o internas. Debido a que las heridas no atendidas son un problema de salud y necesitan ser tratadas para evitar complicaciones (como la infección y el uso inapropiado de antimicrobianos que producen resistencia en algunas cepas), se requiere la búsqueda de tratamientos alternos y efectivos. Por ello surge la necesidad de evaluar los efectos que produce *Eupatorium aschembornianum* Sch para resolver si ¿El extracto de *Eupatorium aschembornianum* Sch presentará efecto cicatrizante en ratones CD1 et/et? ¿El extracto de *Eupatorium aschembornianum* Sch presentará actividad antimicrobiana y antifúngica que beneficiaría el cuidado de heridas?

4 Objetivo

Objetivo general:

- Evaluar el efecto cicatrizante y antimicrobiano de un extracto etanólico de *Eupatorium aschembornianum* Sch en ratones CD1 et/et.

Objetivos particulares:

- Evaluar el efecto cicatrizante de *Eupatorium aschembornianum* Sch en ratones CD1 et/et.
- Determinar si el extracto etanólico de *Eupatorium aschembornianum* Sch presenta efecto antimicrobiano contra bacterias gram positivas y gram negativas.
- Determinar si el extracto etanólico de *Eupatorium aschembornianum* Sch presenta efecto antifúngico.

5 Hipótesis

De acuerdo a las propiedades que se le atribuyen a la planta *Eupatorium aschembornianum* Sch, se evaluará el efecto cicatrizante, esperando presente efecto sobre escisiones realizadas en ratones CD1 et/et, mejorando el proceso de cicatrización ya sea por un aumento en la producción de colágeno o ayudando en el cuidado de las lesiones por presentar actividad antibacteriana y antifúngica.

6 Diseño experimental

- Tipo de estudio: Experimental
- Población de estudio: 18 ratones CD1 et/et
- Criterios de inclusión, exclusión y eliminación:
 - Inclusión: Ratones CD1 et/et machos de 3 meses de edad, entre 35 y 40 gramos de peso, sanos.
 - Exclusión: Ratones con presencia de alergias cutáneas.
 - Eliminación: Ratones que mueran durante la experimentación o desarrollen tumores.
- Variables
 - Variables independientes: Actividad cicatrizante, tratamientos, cepas, concentración del extracto.
 - Variables dependientes: Diámetro de las lesiones, concentración de hidroxiprolina por la producción de colágeno, concentración de nitritos por el proceso de angiogénesis.

7 Material

En el siguiente cuadro se enlistan todos los materiales, equipos, reactivos y sustancias utilizadas en la experimentación.

Cuadro 1 Lista de Material

Material	
Jaulas	Cajas Petri de plástico y vidrio
Separadores de madera	Tubos de ensayo
Bebedores	Tubos de ensayo con tapón
Sacabocados de 1 cm de diámetro	Gradillas
Martillo	Celdas de vidrio
Regla	Pipetas graduadas de 1, 2, 5, 10 y 20mL
Estuche de disección	Pipetor
Tubos Eppendorf	Baño María
Pipetas automáticas de diferentes capacidades	Mechero
Puntillas para pipetas automáticas	Papel parafilm
Vasos de precipitados de diferentes capacidades	Temporizador
Matraces aforados de 10 y 100 mL	Espatula
Papel glassine	

Equipo	
Sonicador Vibra cell (Sonics)	Campana de extracción
Centrifuga Vanguard V6500 (Hamilton Bell)	Incubadora
Rocker platform (Bellco Glass Inc.)	Vortex- 2 Gene
Bomba de vacío	

Intrumentos	Material biológico
Balanza analítica (Adam)	18 ratones CD1 et/et
Espectrofotómetro6305Uv/Vis (Jenway)	<i>Staphylococcus aureus</i>
EspectrofotómetroSpectronic20 (Thermo scientific)	<i>Escherichia coli</i>
Termómetro	<i>Candida albicans</i>

Reactivos y sustancias

Cadmio granular (Merck)	Hidróxido de sodio (Merck)
Ácido clorhídrico (J.T Baker)	Reactivo de Ehrlich
Cloruro de amonio (J.A Elmer)	Cloramina T (Alpha chemika)
Sulfato de cobre (Panreac)	Vaselina
Sulfato de zinc	Madecassol
Metilcelosolve	Alcohol al 70%
Ácido perclórico	Agar nutritivo
Reactivo de NED	Agar PDA
Sulfanilamida (J.T. Baker)	Solución salina
Nitrito de sodio (Merck)	Hidroxiprolina
Acetato de sodio (Merck)	Ácido cítrico (J.T. Baker)
Ácido acético al 15% (J.T. Baker)	Extracto de <i>Eupatorium aschembornianum</i> Sch.

8 Metodología para la determinación del efecto cicatrizante y antibacteriano del extracto etanólico de *Eupatorium aschembornianum* Sch.

8.1 Preparación de ungüento de *Eupatorium aschembornianum* Sch al 4%

Se obtuvo el extracto etanólico de *Eupatorium aschembornianum* Sch al colocar la planta durante 3 días en etanol, obteniendo una coloración verde, posteriormente con ayuda del rotavapor a 60 °C se eliminó la mayor cantidad de alcohol posible, las últimas trazas de alcohol se evaporaron al dejar el extracto en una estufa a 37°C.

El ungüento al 4% se preparó tomando 0.4 g del extracto de *Eupatorium aschembornianum* Sch y 10 mL de vaselina. La vaselina se fundió en un horno de microondas en ciclos de un minuto hasta fundir completamente, y a continuación a una porción pequeña de vaselina se le incorporó el extracto agitando hasta tener una coloración uniforme, posteriormente se adicionó el resto de vaselina fundida con agitación constante hasta completar los 10 mL.

Se preparó un ungüento con Madecassol, de la misma forma que el extracto. Este se utilizó como control positivo.

Nota: preparación farmacéutica utilizada Madecassol en polvo.

8.2 Elaboración de escisiones y evaluación de su cicatrización

La población para el estudio se conformó de 18 ratones macho CD1 et/et, de los cuales se hicieron 3 grupos de 6 ratones, uno a uno los ratones se anestesiaron para realizar la escisión circular en la región dorsal con ayuda de un sacabocado

estéril de acero inoxidable (1 cm de diámetro), la escisión se realizó del punto A a B como se observa en la figura 7.

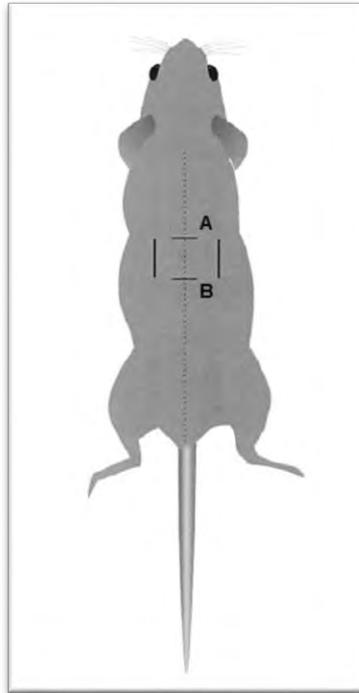


Fig. 7 Localización de incisiones

Los ratones fueron colocados en jaulas con divisiones para tres ratones, para así mantenerlos aislados entre uno y otro, con la finalidad de que no se lastimen entre ellos. El primero grupo fue tratado con vaselina (control negativo), el segundo grupo con Madecassol (control positivo) y el tercer grupo con extracto de *Eupatorium aschembornianum* Sch al 4% (problema). El tratamiento consistió en untar el respectivo ungüento a cada grupo, diariamente durante 15 días, midiendo con ayuda de una regla el diámetro de las lesiones para observar su evolución.

Al día 15 se sacrificaron los ratones. La sangre de cada ratón fue colectada en tubos Eppendorf, cortando los vasos del plexo axilar como se muestra en la figura 8, posteriormente las muestras de sangre se centrifugaron para obtener el suero.

Así también se obtuvieron las muestras del tejido nuevo que se formó en las lesiones, empleando el mismo sacabocado con el que se realizaron las heridas y se guardaron en refrigeración en tubos Eppendorf (previamente pesados).



Fig. 8 Forma de coleccionar la sangre

8.3 Determinación de hidroxiprolina

A cada tubo Eppendorf con muestra de piel obtenida anteriormente, se le adicionaron 500 μL de hidróxido de sodio 2N para someterlas a digestión (o hidrolisis) a 120°C en la autoclave por 20 minutos. Una vez que las muestras fueron digeridas se centrifugaron y se tomaron 50 μL del sobrenadante de cada muestra colocándolos en tubos de ensayo de plástico limpios de 12x75. A cada tubo se le adicionaron 450 μL de Cloramita-T y se dejó oxidar por 20 minutos a temperatura ambiente; una vez cumplido el tiempo se agregó 450 μL de ácido perclórico 3.15M y se reposó por 5 minutos, cumplido esto se agregaron 500 μL del reactivo de Erlich, dicho reactivo forma el compuesto colorido por lo que se

incubaron los tubos en baño María a 60°C por 30 minutos. Por último, se centrifugaron los tubos y se leyó la absorbancia del sobrenadante en el microespectrofotómetro a 557 nm.

Curva estándar de hidroxiprolina

Preparación de solución estándar de hidroxiprolina: Se pesaron 0.2 g de estándar de hidroxiprolina y se diluyeron en 0.5 mL de HCl 0.001N, se disolvió colocando en baño María a 60°C. A partir de esta dilución (tubo 1) se realizan las diluciones que se muestran en la tabla 1:

Tabla 1 Preparación de curva estándar de hidroxiprolina

Tubo	Dilución	Concentración
1	0.2 g Hidroxiprolina+0.5mL de HCl 0.001N	200 mg
2	250 µL de tubo 1 + 250 µL de agua	100 mg
3	250 µL de tubo 2 + 250 µL de agua	50 mg
4	250 µL de tubo 3 + 250 µL de agua	25 mg
5	250 µL de tubo 4 + 250 µL de agua	12.5 mg
6	250 µL de tubo 5 + 250 µL de agua	6.25 mg
7	250 µL de tubo 6 + 250 µL de agua	3.125 mg

Se tomaron 50 µL de cada una de estas diluciones y se colocaron en tubos de ensayo de 12x75; a cada tubo se le adicionaron 450 µL de Cloramina-T se dejó oxidar durante 20 minutos a temperatura ambiente, se adicionaron 450 µL de ácido perclórico 3.15M dejando reposar 5 minutos, y se agregaron 500 µL de reactivo de Erlich incubando en baño maría a 60°C por 30 minutos, por último, se centrifugo por 5 minutos a 5000 rpm y se leyó su absorbancia a 557 nm en el microespectrofotómetro.

Preparación del blanco: 50 μ L de agua destilada + 450 μ L de cloramina-T, se dejó oxidar durante 20 minutos a temperatura ambiente, se adicionaron 450 μ L de ácido perclórico 3.15M dejando reposar 5 minutos, y se agregaron 500 μ L de reactivo de Erlich incubando en baño maría a 60°C por 30 minutos, por último, se centrifugó y se calibró el microespectrofotómetro a 557 nm.

Preparación de Reactivos:

Buffer pH 6.5: Se disolvieron 120 g de acetato de sodio, 46 g de ácido cítrico, 12 mL de ácido acético y 34 g de hidróxido de sodio en agua destilada. Se ajustó a pH 6.5 y se aforó con agua destilada a 1 L.

Ácido perclórico 3.15M: Se diluyeron 27 mL de ácido perclórico al 70% en 100 mL de agua destilada.

Reactivo de Erlich al 20%: Se agregaron 2 g de p-dimetilaminobenzaldehído en 10 mL de metilcelosolve (metoxietanol), y se colocó a baño maría a 60°C hasta que se disolvió completamente.

Cloramita T: Se colocaron 1.41 g de Cloramita T+ 20 mL de agua destilada en un vaso de precipitados; y se adicionaron de 30 mL de metoxietanol y 50 mL de buffer pH 6.5.

8.4 Determinación de nitritos

Activación del cadmio

En 18 tubos de ensayo de 13x100 se colocaron aproximadamente 0.5 g de Cadmio metálico, a esto se le adicionaron 2 mL de sulfato de cobre (II) (CuSO_4) al

5% y se agitó durante 10 minutos en el Vortex para que el cadmio se platee, posteriormente se hicieron 3 lavados con agua destilada para eliminar el cobre, llenando el tubo con agua destilada y retirándola con ayuda de una bomba de vacío con el fin de eliminar el cobre, enseguida se hicieron 2 lavados con HCl 0.1N para la remoción del $\text{Cd}(\text{OH})_2$ y se realizó un último lavado con una solución acuosa de NH_4Cl al 5% (pH ajustado a 9 con borato de sodio), esta solución se retiró del tubo antes de adicionar la muestra previamente tratada.

Tratamiento de las muestras

Se recolectó la sangre de cada ratón por corte axilar y se centrifugó para obtener el suero, a 100 μL de suero se le adicionaron 300 μL de agua destilada para obtener una dilución de 1:4, se agitó la dilución con un vortex para homogeneizar, se agregaron 20 μL de solución de ZnSO_4 al 30% para desproteinizar la muestra, se agitó con un Vortex y se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos para separar el precipitado. Todo el sobrenadante separado se adicionó a un tubo con cadmio activado y se dejó en agitación en un rocker durante 15 minutos, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 3500 rpm y se tomaron 200 μL de sobrenadante para el ensayo.

Curva estándar de nitrito

Se preparó una solución estándar de nitrito de sodio con concentración de 2 μ L/mL para realizar las diluciones de la tabla 2:

Tabla 2 Preparación de curva estándar de nitritos

Tubo	Estándar (μ L)	Agua destilada (μ L)	Concentración (μ g/ml)
1	0	900	0
2	100	800	0.2
3	200	700	0.4
4	300	600	0.6
5	400	500	0.8
6	500	400	1

Determinación de nitritos en las muestras

A los 200 μ L del sobrenadante obtenido en la preparación de las muestras y a los tubos de la curva estándar se les adicionaron 50 μ L del reactivo de sulfanilamida y se les dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente, después se adicionaron 50 μ L del reactivo NED y se dejaron incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en un Rocket. Se leyeron las absorbancias a 540 nm.

Para llevar a cabo la determinación de nitritos espectrofotométricamente se prepararon el reactivo de sulfanilamida disolviendo 0.5 g de sulfanilamida en 150 mL de ácido acético al 15% y el reactivo de NED disolviendo 0.2 g de N-(1-naftil)-etilendiamino diclorhidrato en 150 mL de ácido acético al 15%.

8.5 Determinación de actividad antibacteriana y antimicótica

Para la determinación microbiológica se procedió a un ajuste de bacterias de 1×10^5 UFC/mL, para posteriormente sembrar en Placas de ADS en el caso de levaduras y AST para bacterias. Así mediante la elaboración de pozos con diámetro uniforme en los cuales se coloca la muestra a evaluar se crea mediante difusión un de halo de inhibición.

Patrón de turbidez (escala de Mcfarland)

La escala de Mcfarland se utiliza como patrón de turbidez en la preparación de suspensiones de microorganismos. Esta consiste en la preparación de una serie de soluciones con Cloruro de Bario (BaCl_2) y Ácido Sulfúrico (H_2SO_4), generando un precipitado de Sulfato de Bario (BaSO_4) con turbidez reproducible.

Tabla 3 Preparación de escala de Mcfarland

Tubo	Volumen (mL)		Concentración UFC/mL $\times 10^8$
	BaCl_2 (1%)	H_2SO_4 (1%)	
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1.0	10	30

Para la determinación se utilizó el tubo 1 de la escala, leyendo su transmitancia en el espectrofotómetro para ajustar una suspensión de bacterias de concentración desconocida a la misma transmitancia diluyéndola con solución salina. Esto resultó con una concentración de 3×10^8 UFC, a partir de esta solución de bacterias se tomó una alícuota de 0.1 mL y se diluyó a 9.9 mL obteniendo 3×10^6 UFC, de esta se tomó una alícuota de 0.5 mL y se diluyó en 4.5 mL obteniendo 3×10^5 UFC, a partir de esta se realizó una dilución 1:3 para obtener 1×10^5 UFC de cada microorganismo, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

1. Preparación de *Eupatorium aschembornianum* Sch y antibióticos

- Se prepararon disoluciones de 0.500 mg/mL, 0.250 mg/ml y 0.125 mg/mL del extracto acuoso de *Eupatorium aschembornianum* Sch.
- Se preparó una disolución de 0.100mg/0.100 mL de Ciprofloxacino como control positivo y como control negativo solución salina.

Se inoculó cada una con la suspensión de bacterias sobre la superficie del agar nutritivo para después realizar cinco pozos de 10 mm en la caja con agar, en cada pozo se adicionaron 0.5 mL de cada disolución, del extracto de *Eupatorium aschembornianum* Sch, 0.100 mL, de la disolución de Ciprofloxacino y 0.100 mL de solución salina; esto se realizó por triplicado.

Se incubaron a 37°C, se observó el tamaño de la zona de inhibición de crecimiento a las 24 y 48 horas y se registraron los resultados.

9 Resultados

Elaboración de las escisiones

Como se observa en la figura 9 las escisiones realizadas en todos los grupos se visualizaron uniformes, sin embargo, al ser medidas están presentando diferencias en los tamaños debido a las diferencias de la piel en cada rata.



Fig. 9 Heridas iniciales

Diámetro de las heridas iniciales

En la tabla 5 se reportan las medidas de cada escisión realizada en los ratones, y se puede apreciar la diferencia en tamaño de cada una.

Tabla 2 Medidas de heridas en mm

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Promedio Vaselina	1.66	1.97	1.86	1.87	1.82	1.64	1.31	1.25	1.10	0.85	0.73	0.53	0.29	0.13
Promedio Madecassol	2.08	2.16	1.99	2.13	2.04	1.88	1.69	1.54	1.28	1.02	0.86	0.75	0.35	0.19
Promedio Extracto	1.87	1.57	1.46	1.60	1.59	1.60	1.45	1.28	1.05	0.90	0.79	0.67	0.23	0.09

Avance del tratamiento

- Día 1: Se aplicó tratamiento desde que se tuvieron las escisiones listas, en la figura 10 se observan las heridas iniciales de los diferentes grupos 1) Vaselina, 2) Madecassol y 3) Extracto.

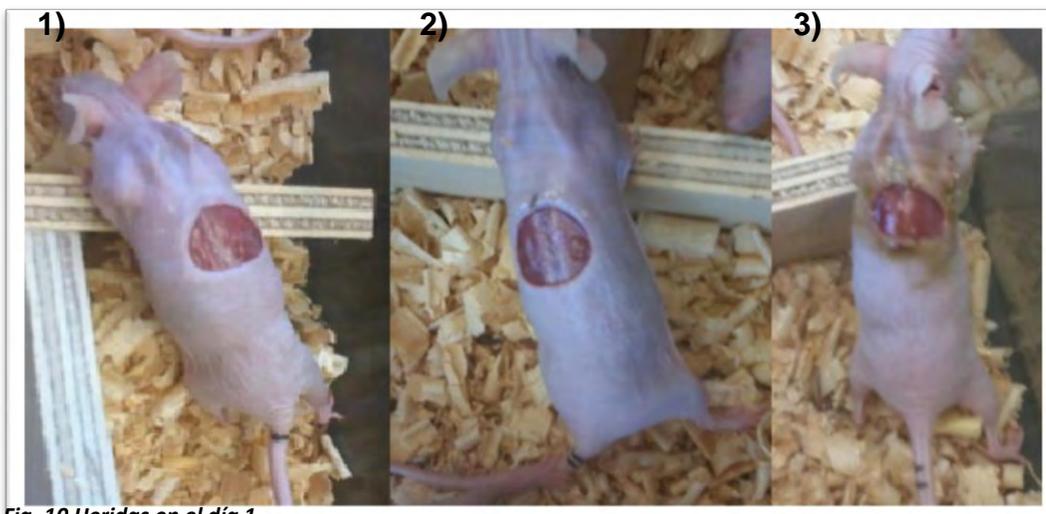


Fig. 10 Heridas en el día 1

- Día 5: En la figura 11 se observa un avance uniforme en las escisiones de los diferentes grupos tratados, sin diferencias aparentes.

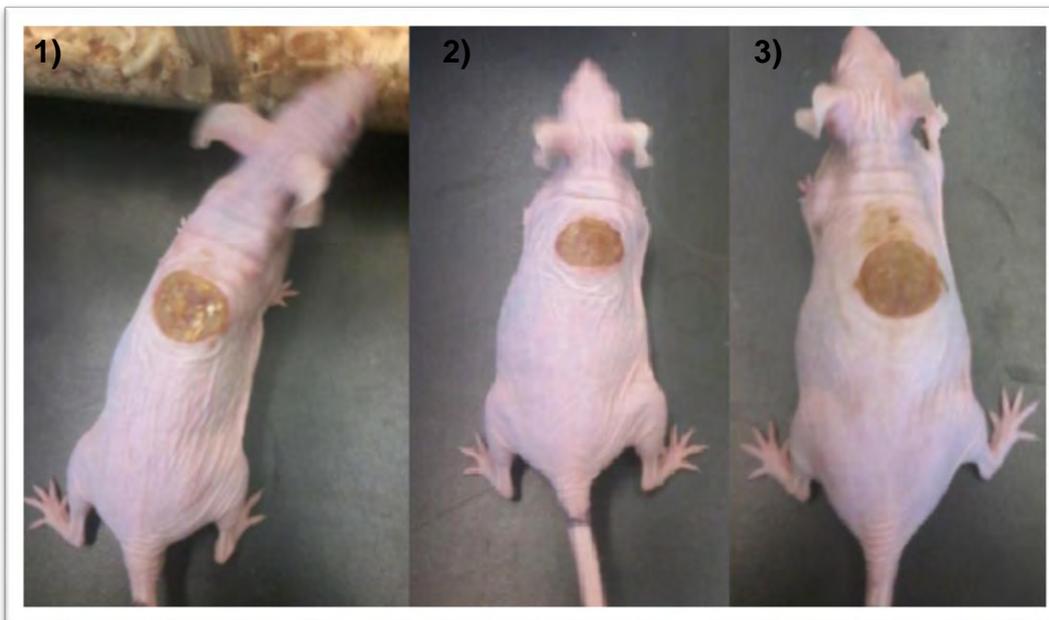


Fig. 11 Heridas en el día 5

- Día 10: Se observa la formación de costra en todos los grupos tratados, sin cambios aparentes.

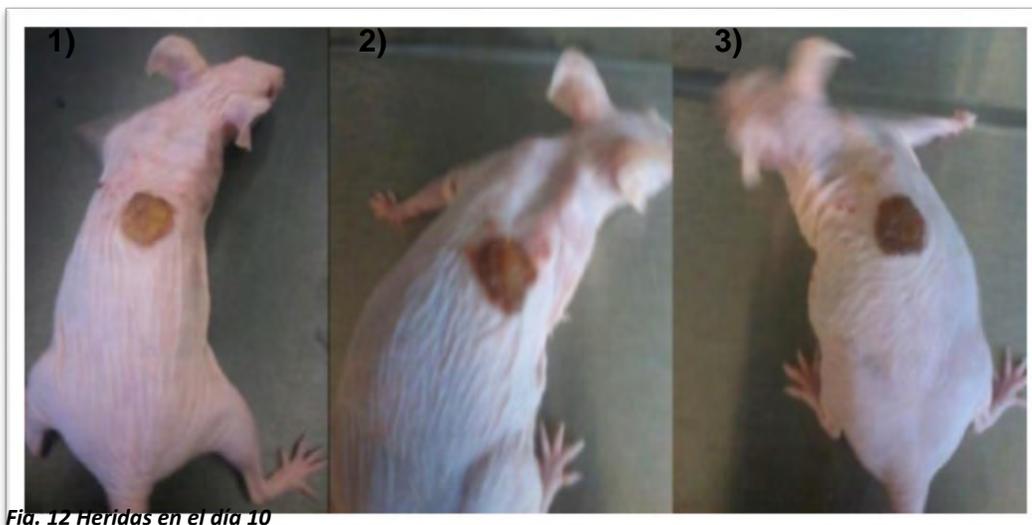


Fig. 12 Heridas en el día 10

- Día 15: Se alcanzan a visualizar diferencias en la cicatrización pues el grupo 3 de extracto presento desprendimiento de la costra, así como menor tamaño en la escisión junto al grupo dos, a diferencia del grupo 1.

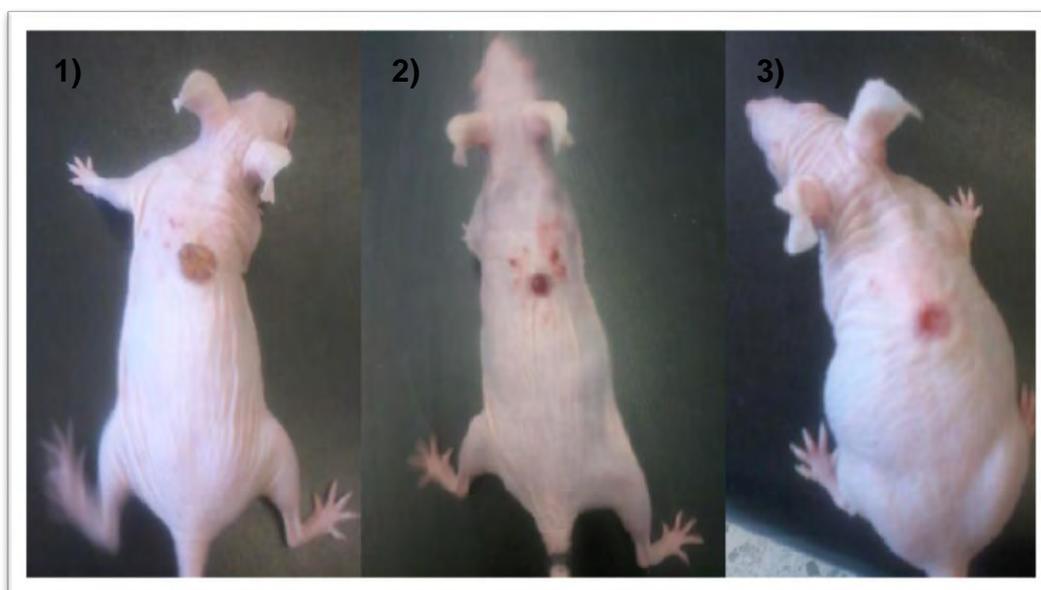


Fig. 13 Heridas en el día 15

- Heridas finales: Se realizó el desprendimiento total de la costra en todos los grupos tratados, en la figura 14 se visualizan diferencias en la cicatrización en el grupo 3 con respecto a los otros grupos, pues aquí es poco notoria la escisión.

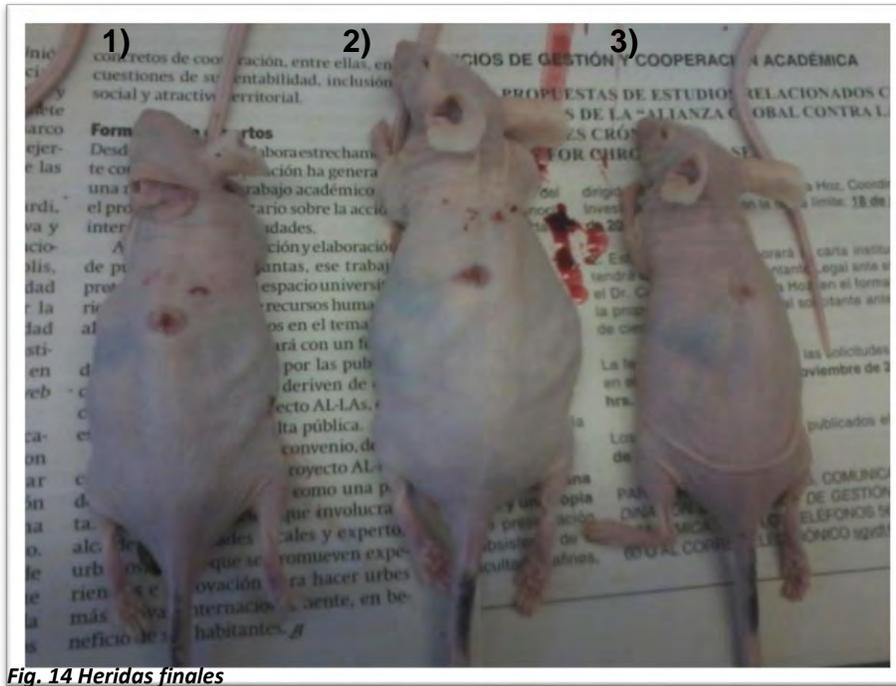


Fig. 14 Heridas finales

Determinación de hidroxiprolina

Los resultados obtenidos en la elaboración de la curva patrón de hidroxiprolina se presentan en la tabla 6, los cuales fueron graficados en Excel (figura 16) y así obtener la ecuación.

Tabla 3 Curva patrón de hidroxiprolina

Concentración (mg)	Absorbancia
12.5	0.051
25	0.117
50	0.277
100	0.527
200	0.874



Fig. 15 Diluciones para curva estándar de H

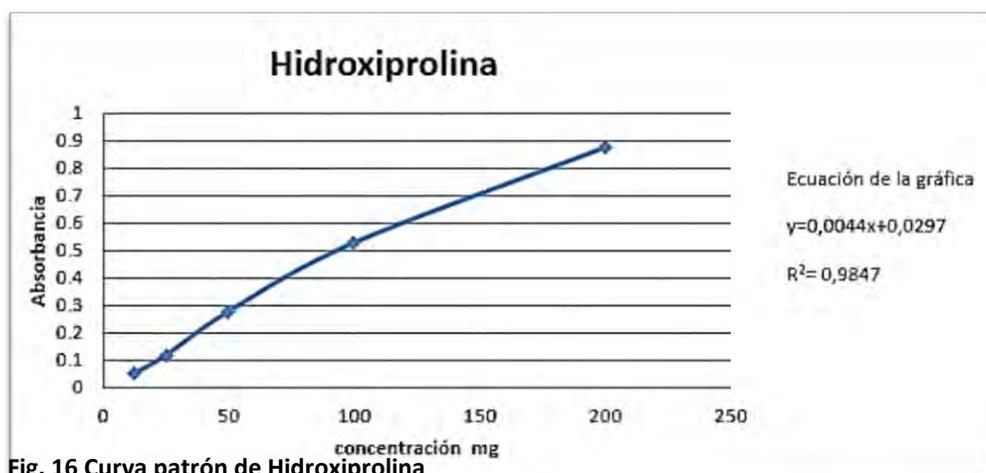


Fig. 16 Curva patrón de Hidroxiprolina

Los resultados obtenidos en la valoración de las pieles para la producción de hidroxiprolina se presentan en la tabla 7, estos se obtuvieron al interpolar las absorbancias obtenidas en la curva patrón obtenida previamente (figura 16).

Tabla 4 Determinación de hidroxiprolina en pieles

Muestra/ Grupo	Hidroxiprolina/piel en mg		
	Grupo 1 Vaselina	Grupo 2 Madecassol	Grupo 3 Extracto
1	9,45	317,00	9,16
2	170,98	468,68	16,59
3	1,02	147,08	139,27
4	123,02	283,27	95,24
5	308,51	135,17	136,28
6	171,86	320,61	78,15

Determinación de nitritos

Los resultados obtenidos en la elaboración de la curva patrón de nitrito de sodio se presentan en la tabla 8, los cuales fueron graficados en Excel (figura 18), para así obtener la ecuación.

Tabla 5 Curva patrón de nitritos

Concentración (µg/dL)	Absorbancias
0	0
0,2	0,095
0,4	0,211
0,6	0,33
0,8	0,43
1	0,553



Fig. 17 Diluciones para la curva estándar de nitritos

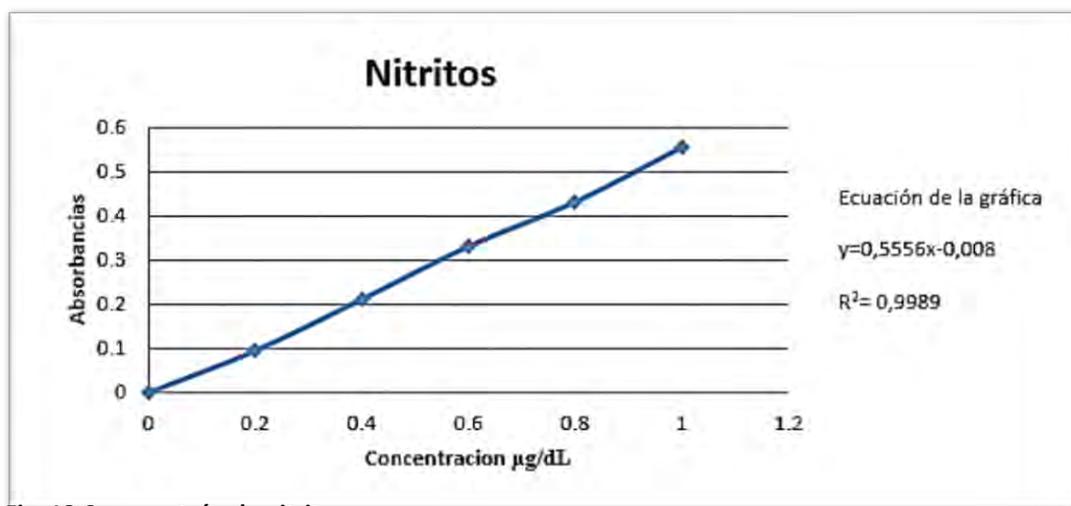


Fig. 18 Curva patrón de nitritos

Los resultados obtenidos en la valoración de los sueros para la producción de óxido nítrico se presentan en la tabla 9, estos se obtuvieron al interpolar las absorbancias obtenidas de los sueros en la curva patrón obtenida previamente (figura 18).

Tabla 6 Determinación de nitritos en sueros de ratón

Tubo/ Muestra	Concentración mg/L		
	Grupo1 Vaselina	Grupo2 Madecassol	Grupo3 Extracto
1	4.25	6.84	9.94
2	6.84	7.27	20.45
3	6.26	3.74	6.19
4	0	4.03	3.96
5	1.66	3.24	0
6	4.54	8.64	2.02

Determinación microbiológica

Escherichia coli

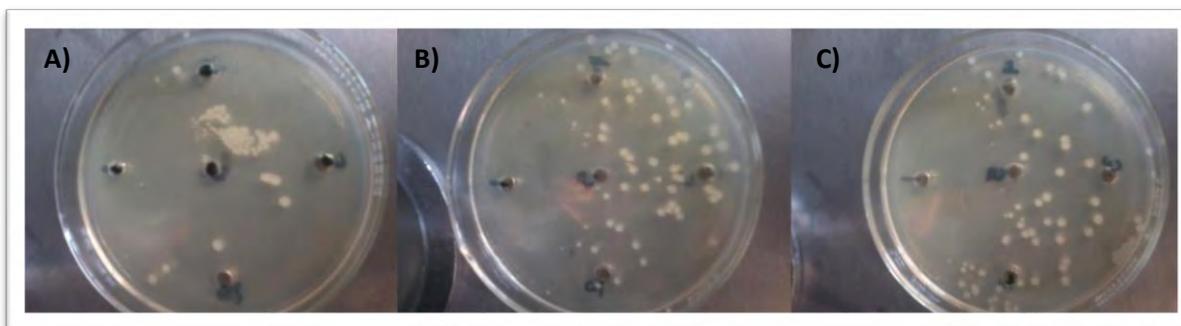


Fig. 19 Se presenta la prueba por triplicado, de lado izquierdo el control positivo, arriba, derecha y abajo se encuentra el extracto en distintas concentraciones, y por último en el centro el control negativo. Se aprecia crecimiento en toda el área de las placas excepto en la zona del control positivo.

Staphylococcus aureus



Fig. 20 Se presenta la prueba por triplicado, de lado izquierdo el control positivo, arriba, derecha y abajo se encuentra el extracto en distintas concentraciones, y por último en el centro el control negativo. Se aprecia crecimiento en toda el área de las placas excepto en la zona del control positivo.

Candida albicans

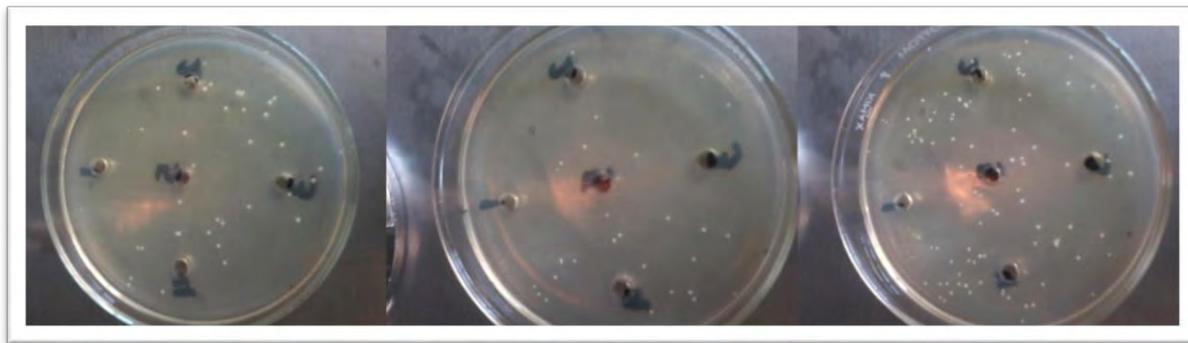


Fig. 21 Se presenta la prueba por triplicado, de lado izquierdo el control positivo, arriba, derecha y abajo se encuentra el extracto en distintas concentraciones, y por último en el centro el control negativo. Se aprecia crecimiento en toda el área de las placas excepto en la zona del control positivo.

En el cuadro 10 se presentan los resultados obtenidos de las pruebas microbiológicas realizadas a las diferentes concentraciones del extracto, en cada uno de los microorganismos evaluados.

Cuadro 7 Resultados de efecto antimicrobiano

Concentración µg/mL	Resultado								
	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>			<i>C. albicans</i>		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
125	-	-	-	-	-	-	-	-	-
250	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Control (+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

10 Tratamiento de resultados

Diámetros iniciales

Tabla 8 Anova de un factor

Tratamiento	Media
Vaselina	1.66 ± 0.35
Madecassol	1.95 ± 0.44
Extracto	1.87 ± 0.50

Prueba ANOVA de un factor al 95% de confianza, los valores corresponden a la media ± la desviación estándar. La diferencia de medias no es significativa $p > 0.05$.

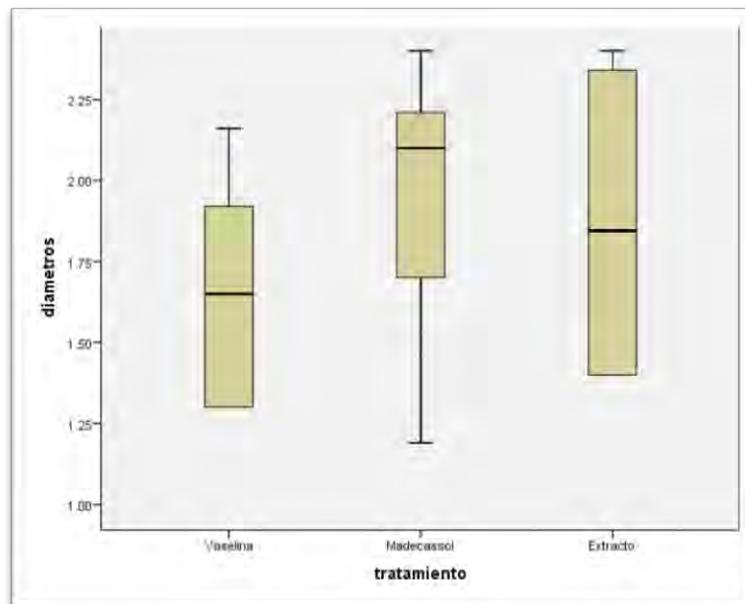


Fig. 22 Diagrama de cajas donde se observa que los tres grupos son similares, es decir que no hay diferencias significativas entre las escisiones realizadas en los tres grupos.

Diámetros finales

Tabla 9 Anova de un factor

Tratamiento	Media
Vaselina	0.06 ± 0.8
Madecassol	0.11 ± 0.7
Extracto	0.07 ± 0.5

Prueba ANOVA de un factor al 95% de confianza, los valores corresponden a la media \pm la desviación estándar. La diferencia de medias no es significativa $p > 0.05$.

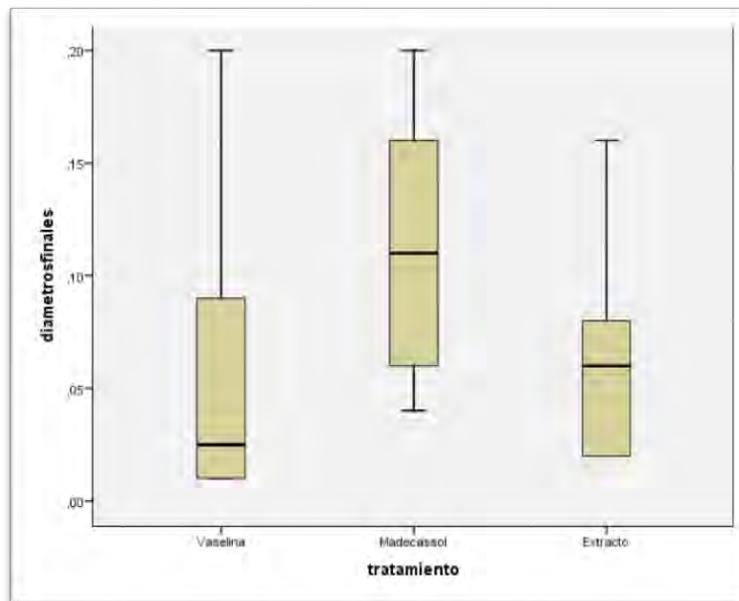


Fig. 23 Diagrama de cajas donde se observa que los tres grupos son similares, es decir que no hay diferencias significativas en el cierre de las heridas en los tratamientos utilizados, sin embargo, se aprecia mayor similitud entre la vaselina y el extracto.

Hidroxirolina

Tabla 10 Anova de un factor

Tratamiento	Media
Vaselina	0.13 ± 0.12
Madecassol*	0.28 ± 0.12
Extracto	0.07 ± 0.57

Prueba ANOVA de un factor al 95% de confianza, los valores corresponden a la media ± la desviación estándar. La diferencia de medias es significativa *p= 0.012 con respecto a extracto.

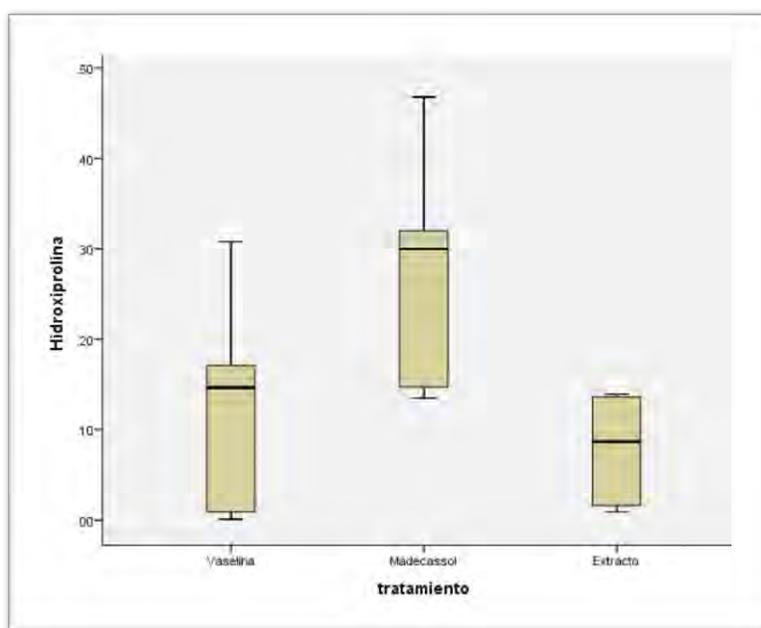


Fig. 24 Diagrama de cajas que presenta las diferencias entre los grupos tratados, se aprecia que el extracto no tiene relación con respecto al Madecassol; por otro lado, la vaselina presenta cierta similitud con respecto al Madecassol; es decir que el extracto no presenta un aumento en la producción de hidroxirolina como lo hace el Madecassol y la vaselina.

Nitritos

Tabla 11 Anova de un factor

Tratamiento	Medias
Vaselina	4.71 ± 2.03
Madecassol	5.63 ± 2.24
Extracto	8.51 ± 7.29

Prueba ANOVA de un factor al 95% de confianza, los valores corresponden a la media ± la desviación estándar. La diferencia de medias no es significativa $p > 0.05$.

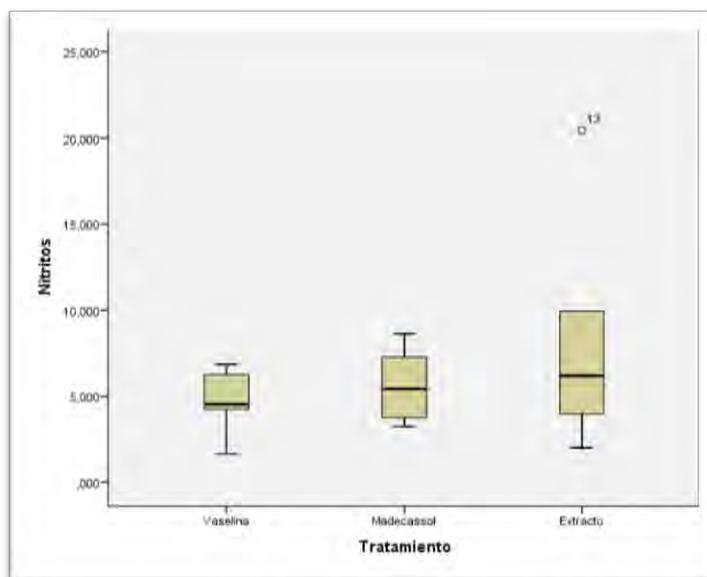


Fig. 25 Diagrama de cajas donde se observa que no hay diferencias significativas entre los tres grupos, es decir que la producción de óxido nítrico fue similar en los tres grupos.

11 Análisis de resultados

Se hizo un análisis estadístico para el diámetro inicial de las heridas, con el que se comprobó que estas no tienen diferencias significativas; es decir que las heridas realizadas son uniformes en los tres grupos a tratar y la observación del efecto de cicatrización no está afectado por las diferencias de tamaños en las heridas.

De acuerdo al análisis estadístico de los diámetros finales, se observa una cicatrización uniforme en los tres tratamientos, esto contrario a lo esperado, pues en el control positivo se esperaba mayor avance en la cicatrización, sin embargo, este no mostro diferencias en la cicatrización. Por otro lado, se esperaba un proceso de cicatrización más lento para el control negativo, sin embargo, este muestra una cicatrización parecida al control positivo, así también el extracto se comportó de la misma forma.

Las pruebas realizadas para evaluar el efecto cicatrizante son la determinación de hidroxiprolina y óxido nítrico. Así en la prueba de Hidroxiprolina se observó una diferencia significativa entre los grupos tratados. En orden decreciente de producción de Hidroxiprolina nos encontramos con Madecassol, Vaselina y Extracto; es decir que el Madecassol presento mayor proceso cicatrizante y estadísticamente igual a la vaselina, teniendo que el Extracto se encuentra aún más bajo que el control negativo, pues se esperaba que el control negativo no tuviera efecto, sin embargo, presenta mejor efecto que el extracto. En el caso de la determinación de óxido nítrico ningún grupo presenta diferencias significativas, es decir que ningún tratamiento tuvo un aumento en la producción de óxido nítrico.

Por otro lado, tenemos que el extracto no presenta ningún efecto antimicrobiano ni antifúngico, en ninguna de sus diferentes concentraciones, por lo cual tampoco aporta protección contra infecciones en las heridas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la determinación de hidroxiprolina y óxido nítrico se corrobora que el extracto no presenta efecto cicatrizante, pues carece de un aumento de producción de hidroxiprolina y óxido nítrico, contrario al control negativo que incluso presento mejores efectos que el extracto. Esta ausencia de efecto podría deberse a la preparación del extracto, pues si bien las formas tópicas son capaces de ejercer rápidamente efectos locales, también interviene la correcta incorporación con el vehículo, en este caso la vaselina. Por lo tanto, ya que el extracto no presenta mayores beneficios en el proceso de cicatrización, es probable que los resultados obtenidos que tienen similitud con los controles positivos y negativos se deba a que los tres tratamientos mantenían en hidratación constante a la herida.

12 Conclusión

Al realizar la evaluación sobre el proceso de cicatrización del extracto etanólico al 4% de *Eupatorium aschembornianum* Sch., se encontró que este no presenta mejora en el proceso de cicatrización, ni beneficio antimicrobiano y antifúngico que contribuya al cuidado de las heridas.

RECOMENDACIONES:

- Realizar estudio toxicológico ya que se han encontrado reportes de esta especie con efectos toxico.²⁶

13 Referencias

1. Christian Salem Z, Juan Antonio Pérez P, Enrique Henning L, Heridas. Conceptos generales, Rev. Cuad. Cir. 2000; 14: 90-99.
2. Portal del médico cubano [home page en internet]. Cuba: MedicosCubanos.com; c2005 [actualizada Septiembre 2008; consultado 4 de Marzo 2016] Disponible en: https://www.medicoscubanos.com/diccionario_medico.aspx?q=herida&utm_source=copypaste&utm_medium=various&utm_campaign=copypaste
3. Atuesta, J. Óxido nítrico y biología cutánea. Acta Médica Colombiana. Jul/Ago 2001; 26(4):202-204.
4. Linares GY, Martínez B. La piel [Internet]. Depa. Fquim. UNAM. [citado el 16 de marzo de 2016]. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Lapiel_1436.pdf
5. Rojas EO. Inmunología (de memoria). 3ª ed., México DF: Editorial médica panamericana; 2006.
6. Pérez MJ, Borge M. [Página principal en Internet] Universidad de Cantabria: c2014 [citado 31 de Mar 2016] LA PIEL: ESTRUCTURA Y FUNCIONES; [aprox. 5 pantallas]. Disponible en: <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/fisiologia-general/materiales-de-clase-1/bloque-ii/Tema%2011-Bloque%20II-La%20Piel.%20Estructura%20y%20Funciones.pdf>
7. Andrades P., Sepulveda S. y González J., Curación avanzada de heridas, Rev. Chilena de Cirugía. 2004; 56 (4):396-403.

-
8. Salas J, Tello V, Zavaleta Alfonso, Villegas L, Salas M, Fernandez I y Vaisberg A., Actividad cicatrizante del látex de *Jatropha curcas* (Angiospermae: Euforbiaceae). *Rev. Biol. Trop.* 1994; 42 (1/2): 323-326.
 9. López SH.: Evaluación del efecto cicatrizante de extractos de *Bursela glabrifolia* y *Bursera morelensis* en modelos murinos de incisión, escisión y de sobrecrecimiento celular [Tesis Maestría]. Yautepec de Zaragoza, Morelos: IPN; enero 2016.
 10. IREKANI [homepage en Internet] UNAM: Instituto de biología; c2002 [citado 4 de abril de 2016]. Disponible en: <http://unibio.unam.mx/irekani/handle/123456789/17399?proyecto=Irekani>
 11. Instituto de Biología. "Ageratina conspicua" IBUNAM:MEXU:OAX940756". UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2011-08-12. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2016-1-12. Disponible en: <<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:OAX940756>>
 12. Miranda LM. Entrevistas sobre el axihuitl (*Eupatorium aschembornianum* Sch.) en Tepoztlán, Mor., México. C2008 [Citado el 7 de abril de 2016]; (25). Disponible en: http://www.tlahui.com/medic/medic25/axihuitl_tepoz.htm
 13. Rincón Enríquez G, Quiñones Aguilar EE. Uso del "axihuitl", una planta mexicana, en tecnologías de control biológico de enfermedades de plantas. *Revista HYPATIA*. [Revista en línea] 2014[consultado el 15 de enero de 2016]; (35). Disponible en: <http://revistahypatia.org/biologia-revista-35-1.html>

-
14. Baytelman B. Acerca de plantas y curanderos: Etnobotánica y antropología medica en el edo. de Morelos, INAH, México DF, 1993.
 15. Charles River Laboratories International [Homepage en internet]. [citado 31 de mayo 2016]. Disponible en: [Inc.http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/cd-1-nude-mouse](http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/cd-1-nude-mouse)
 16. Basurto AF, Luz R, Mondragón V, Atilano LD, Montaraz CJ, Dos Santos M, et al., Comparación de las constantes fisiológicas sanguíneas de los ratones CD1, heterocigótico et/+ y desnudo et/et., vet. Méx. 2000; 31 (3): 209-216.
 17. Marroquín SR, Lara HM, Calvillo ER, García BM, Castro MM, Mora GJ, et. al., Exocrinopatía mostrada en el ratón hipotímico CD1 et/et que semeja al síndrome de Sjögren, Vet. Méx. 2003; 34(2):129-141.
 18. González JM, Mecanismos de nitrosación de sustratos complejos bioactivos, Universidad de Salamanca, mayo 2012.
 19. Adarmes H, Solís JP, Müller A, Galleguillos M. Determinacion de nitrito como metabolito estable del óxido nítrico en el líquido sinovial de articulación metacarpofalángica equina. Arch Med Vet. 2009; 41: 255-259.
 20. Nunes HS. Eficacia de la aplicación de microcorrientes en la cicatrización de úlceras neuroisquémicas en el pie diabético. Reduca. 2011; 3 (2): 236-264.
 21. Castañeda OA, Galán VA, Rodríguez JA, Contreras LE, Ramirez GJ. Diseño de un método para la determinación de nitritos en embutidos utilizando extracto de flor de Jamaica. Memorias in extenso del XXIII Congreso Nacional de Química Analítica. Editadas por la Asociación

Mexicana de Química Analítica, A.C. México, 2010. ISBN 978-607-9048-01-3.

22. NORMA Oficial Mexicana NOM-122-SSA1-1994, Bienes y servicios. Productos de la carne. Productos cárnicos curados y cocidos, y curados emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias.
23. García PM, Serna AF. Fundamento de Química Orgánica. Estructura y propiedades de los compuestos orgánicos (Manuales), Universidad de Burgos, 2008.
24. Escallón J, Biología y bioquímica de la cicatrización de heridas. Rev. colomb. cir, 1991; 6(supl. 2):22-25.
25. Organon NV, inventor; Procedimiento para la determinación del contenido de hidroxiprolina de un líquido biológico. Holanda patente 40.212. 1969.
26. Donald G., Medical Toxicology of natural Substances, Foods, fungi, Medicinal Herbs, Plants and Venomous Animals., Wiley, EUA , 2008.

Bibliografía recomendada

27. Biología de las heridas y el proceso de cicatrización [Internet]; [consultado el 01 de abril de 2016]. Disponible en: <http://blog.utp.edu.co/cirugia/files/2011/07/biologiadelasheridasyelprocesodeticatrizaciondocumento2.pdf>
28. European Wound Management Association (EWMA) [Documento de Posicionamiento] Heridas de difícil cicatrización: un enfoque integral. Londres: MEP Ltd, 2008.

-
29. Experimentos alternos [Internet]. [consultado el 7 de abril 2016] Disponible en:
http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Experimentos_alternos_18753.pdf
30. LAB- FERRER, Procedimiento normalizado de trabajo, Determinación de hidroxiprolina, [Internet]. [consultado el 30 de Abril 2016] Disponible en:
<https://www.cresca.upc.edu/sites/default/files/docs/Procediment%20normalitzat%20de%20treball.pdf>
31. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
32. Pasteran F, Galas M. Manual de Procedimientos Sensibilidad a los antimicrobianos en Salmonella, Shigella y E. coli [Internet]. WHO Global Salm Surv; c2008 [consultado el 16 de Marzo de 2016]. Disponible en:
http://bvs.panalimentos.org/local/File/manual_sensibilidad_salmshigecoli_2008.pdf
33. Peralta AG.: Evaluación del efecto cicatrizante y antimicrobiano del extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. en ratones CD1 [Tesis]. Ciudad de México: UNAM FES Zaragoza; s.f.
34. P.R. Vademecum [Homepage en internet]; c2014 [Citado el 31 de mayo de 2016]. Disponible en:
<http://mx.prvademecum.com/producto.php?producto=1934>
35. Reparación por tejido conjuntivo: fibrosis, [Internet]. [Consultado 15 Mayo de 2016] Disponible en:

http://www10.uniovi.es/anatopatodon/modulo5/tema04_regeneracion/00indice.htm

36. Salem CZ, Pérez JP, Henning EL, Uherek FP, Schultz CO., Heridas. Conceptos generales. Cuadernos de Cirugía. 2000; 14 (1):90-99.
37. Savitri S, Sundara R, Sujan G, Ravi S, Dhananjaya B. Evaluating the Antimicrobial Activity of Methonolic Extract of Rhus Succedanea Leaf Gall. BiolImpacts. 2013; 3(4): 195-198.
38. Sotomayor PH, Bilbao DM, González LB, León AJ, Merchan GF, Theudis MP, et al., Evaluación farmacológica de los efectos del 1-O-dodeciliglicerol sintético en un modelo de angiogénesis inflamatoria. Bioquímica, 2005; 1(30): 5-12.
39. Stern LD, Samchuck BD; intentores. Baltimore MD; titular. Método rápido de ensayo de colágeno en la carne y productos cárnicos. US 4, 094,646. 1978.
40. TORTORA, Gerard J., Introducción a la Microbiología, 9ª ed, edit. Medica panamericana, México, 2007.