



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA
UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN

**Evaluación del efecto cicatrizante y antimicrobiano del extracto
acuoso de *Hemiangium excelsum* en ratones CD1**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Químico Farmacéutico Biológico

P R E S E N T A :

NOMBRE DEL ALUMNO

Guillermo Mandujano Sánchez

Director

Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara

Asesor

Mtra. Yolanda Flores Cabrera



Ciudad de México

2019



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.

Dedicatoria

A mis padres y hermanos ya que son un pilar muy importante en mi vida, dándome la confianza y apoyo absoluto, para concluir un logro más de mi formación profesional y personal.

Agradecimientos

A mi alma mater la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM, por brindarme los valores, conocimientos, y experiencias, que me formaron como persona, e hicieron mi sueño realidad de ser orgullosamente PUMA, por mi raza hablara mi espíritu.

A todas las personas que me ayudaron en la realización de esta investigación científica.

Agradezco de manera especial al Dr. Rubén Marroquín Segura, Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara, Mtra. Yolanda Flores Cabrera por dejarme ser parte de este gran equipo de trabajo confiándome una práctica profesional, brindándome su conocimiento, compañía, sabiduría y amistad en mi estancia del laboratorio uno del primer piso de la UMIEZ.

A los profesores que contribuyeron en mi formación académica por todo el tiempo dedicado, y en especial en el apoyo para este trabajo, al responsable del herbario medicinal del IMSS el Mtro. Santiago Xolalpa Molina, que ayudó en la autenticación de la planta del presente estudio, al QFB. Armando Ramírez González, y a mis sinodales, Mtra. Adriana Hernández, Dr. Valentín Islas, Dra. Juana Rosado.

A mis amigos que siempre estuvieron en las buenas y malas. Al ojón (Eber), al cuida novias (Pre-colega Eddy), Irvin, Tiffany, el pelonchas (Migue), a la enojona (Karen), Nachito pelotón (Abimael), Ximena, Itta, Fany, y todos los demás que tuve el placer de conocer durante mi estancia en la carrera.

Tabla de contenido

1. Resumen	4
2. Introducción	5
3. Marco teórico.....	6
3.1 Importancia de la herbolaria	6
3.1.2 Medicina tradicional	6
3.2 Regulación de Medicamentos y remedios herbolarios en el mundo	8
3.2.1 Regulación de Medicamentos y remedios herbolarios en México	8
3.3 Familia <i>Hipocratacea</i>	10
Cancerina.....	10
Química.....	11
Farmacología.	11
3.4 Generalidades la piel	11
3.4.1 Epidermis	12
3.4.2 Dermis.....	14
3.4.3 Hipodermis	15
3.4.4 Síntesis de colágeno	15
3.5 Tipos de herida	17
3.5.1 Cicatrización de heridas	17
3.5.2 Cicatrización de primera intención	17
3.5.3 Cicatrización de segunda intención.....	18
3.5.4 Cicatrización de heridas epidérmicas.....	19
3.5.6 Fases de la cicatrización	19
3.6 Fase aguda o inflamatoria	20
3.6.2 Formación de tejido (Fase proliferativa).....	21
3.6.3 Período de maduración y remodelación de la cicatriz.....	21
3.7 Factores que afectan la cicatrización.....	22
3.8 Óxido nítrico durante reparación de heridas	24
3.9 Plantas para uso cicatrizante y antiséptico	25
4. Planteamiento de problema.....	27

5. Objetivo general	28
5.1 Objetivos Particulares.....	28
6. Hipótesis.....	29
7. Metodología.....	29
7.1 Material	30
7.2 Equipo.....	32
8. Técnicas	32
8.1 Obtención del Extracto acuoso de <i>Hemiangium excelsum</i>	32
8.2 Preparación de ungüento al 4% del extracto de <i>Hemiangium excelsum</i>	34
8.2.1 Preparación del extracto <i>Hemiangium excelsum</i> para la determinación de actividad antimicrobiana	34
8.3 Evaluación del efecto cicatrizante en ratones machos CD1.	35
8.4 Determinación de Nitritos usando el método de Griess.....	38
8.5 Determinación de Hidroxiprolina	40
8.6 Determinación de actividad antibacteriana	43
8.7 Análisis estadístico	44
9. Resultados	44
9.2 Comparación de nitritos determinados en suero (mg/mL)	45
9.4 Determinación de actividad antimicrobiana	48
10. Análisis de resultados.....	49
11. Conclusión.....	52
12. Propuestas	53
13. Referencias	54
14. Anexos	59
Anexo I Preparación de reactivos para determinación de nitritos	59
Anexo II Preparación de reactivos para determinación de hidroxiprolina	61
Anexo III Preparación de reactivos determinación de actividad antimicrobiana	62
Anexo IV. Preparación de Ciprofloxacino	62

1. Resumen

La Planta *Hemiangium excelsum* (cancerina) es comercializada en gran parte del país, se le atribuyen propiedades cicatrizantes y antimicrobianas. Metodología. Se usaron ratones machos CD1 de 35-40 g se realizaron cortes de piel de 1 cm de diámetro usando un sacabocados, se formaron 3 grupos: grupo 1 se les administró sobre la lesión vaselina, grupo 2. Se les administró un ungüento de madecassol al 4% en vaselina y el grupo 3 se les administró el extracto acuoso de cancerina al 4%, durante 11 días. Posteriormente se midieron los diámetros de las lesiones y se cuantificó en piel cicatrizada hidroxiprolina- como una medida indirecta de colágena para evaluar la calidad de cicatrización- así como la cantidad de nitritos- forma estable del óxido nítrico-. Para el ensayo antimicrobiano se utilizaron cepas de *E. coli* y *S. aureus*, en medio de agar soya tripticaseína, en donde se colocaron 3 concentraciones del extracto acuoso estéril de la cancerina (250, 500, 1000 µg/mL), como control positivo (ciprofloxacino a una concentración de 100 µg y un testigo negativo del ensayo (excipiente).

Resultados. En la cuantificación de hidroxiprolina, se obtuvieron las siguientes medias Madecassol 523.2267 cancerina 496.0150 y Vaselina 447.3293 $p=0.205$. Para la concentración los valores de nitritos fueron: madecassol 6.2283 cancerina 4.2340 y Vaselina 4.6450 y $p= 0.029$ existe con diferencia significativas, siendo el tratamiento con madecassol más eficiente ya que presenta mayores niveles de nitritos en el suero de los ratones. En la determinación de efecto antimicrobiano, del extracto acuoso de cancerina no se encontró actividad antibacteriana en las diferentes concentraciones.

Conclusiones. La planta *Hemiangium excelsum* carece de actividad cicatrizante, y no presenta actividad antimicrobiana.

2. Introducción

La herbolaria, como se conoce a la práctica terapéutica que utiliza plantas medicinales, aún constituyen el recurso más conocido y accesible para grandes núcleos de la población mexicana (CONABIO, 1998). En México, los conocimientos sobre herbolaria se han transmitido en la población de generación en generación, para el tratamiento de enfermedades de primer nivel, como malestar estomacal, infecciones, traumatismos, fiebre, o desmayos etc., además proporciona a los recolectores ingresos económicos, por medio de la venta del material vegetal a los médicos tradicionales, así como acopiadores que se encargan de la distribución nacional e internacional de estas plantas. La planta *Hemiangium excelsum* (cancerina) es muy comercializada en gran parte del país debido a las propiedades cicatrizantes y antimicrobianas que se le atribuye por medio del conocimiento empírico en el tratamiento de estos padecimientos, se estima que en México un 10% de la población tiene problemas de cicatrización asociadas al pie diabético. El mal tratamiento de la herida o mala cicatrización que sufren los pacientes con esta enfermedad tiene como consecuencia la amputación del miembro dañado, por lo que evaluar las propiedades que tiene esta planta es de gran importancia clínica ya que el costo de estos problemas puede llegar a miles de millones de pesos, tanto en rehabilitación cómo en prevención de enfermedades relacionadas a la cicatrización o infecciones en la piel. Actualmente no existe estudio de la actividad cicatrizante de la planta *Hemiangium excelsum*, por lo cual se montará un estudio para comprobar el efecto cicatrizante en ratones CD1 y antimicrobiano en placas de agar soya tripticaseína con la finalidad de determinar si este remedio funciona eficazmente y en un futuro ayudar a personas que presentan problemas de cicatrización.

3. Marco teórico

3.1 Importancia de la herbolaria

El uso de plantas medicinales para curar algunos malestares de la salud es una práctica muy común en muchos países, de acuerdo a la OMS en África el 80% de la población utiliza la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades sanitarias. En Asia y en Latinoamérica, las poblaciones siguen utilizando la medicina tradicional como resultado de circunstancias históricas y creencias culturales. La Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO, 1998) refiere que el 85% de la medicina tradicional mundial utiliza la mezcla de diversas plantas en preparados como extractos, ungüentos, polvos y otras recetas. En México es muy difundida esta práctica de la cual se obtienen ingresos extras de bosques o selva, sea mediante su comercialización directa o mediante convenio para la prospección de fármacos.^{1, 2}

3.1.2 Medicina tradicional

La medicina tradicional es el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales, la medicina tradicional es una realidad presente en todo el mundo, forma parte del patrimonio cultural de cada país y emplea prácticas que se han transmitido de generación en generación desde hace muchos años, antes del desarrollo de la medicina actual. En México, la herbolaria surgió con los grupos prehispánicos. En esa época, la medicina primitiva se vinculaba de manera íntima con la religión y la magia, pues los pueblos concebían la enfermedad como producto de la acción de sus dioses y el desequilibrio corporal. Las plantas medicinales eran el recurso esencial al que los indígenas recurrían para la cura de sus enfermedades, eran utilizadas de diversas formas, como ungüentos, pócimas, vaporizaciones, etc. Además, esto les proporcionaba un orden y una organización, pues tenían médicos o "tictl" que dominaban ciertas especialidades, por ejemplo, parteros, hueseros o yerberos. Incluso, tenían escuelas donde enseñaban a los

más jóvenes el uso y el arte de curar. También había mercados de plantas medicinales que el pueblo en general visitaba para comprar o consultar a los médicos. A partir del siglo XVI, con la llegada de los españoles, los remedios nativos y las especies prehispánicas se fusionaron o complementaron con los conocimientos de los conquistadores. Fue de esta forma, que la herbolaria mexicana se desarrolló notablemente, ya que los españoles, al quedar maravillados con la belleza y diversidad natural del territorio, construyeron hospitales de herbolaria medicinal, en todo el país, por lo que las costumbres culturales en el tratamiento de enfermedades continuaron de generación en generación, hoy en día, la herbolaria mexicana constituye el patrimonio más importante de la cultura de nuestros pueblos ancestrales, y representa la fuente de desarrollo de la medicina alternativa. Asimismo, México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en riqueza taxonómica de plantas medicinales, con más de 3 mil 600 tipos, pero menos de 50 especies han sido analizadas para conocer sus posibles efectos farmacológicos, su consumo entre la población se orienta por el conocimiento tradicional que se preserva en distintas regiones del país.^{3, 6}



Figura nº1 Medicina tradicional

3.2 Regulación de Medicamentos y remedios herbolarios en el mundo

La atención primaria de la salud mediante medicina tradicional, es de un 80% de la población de países en desarrollo ya sea por tradición cultural o la falta de otras opciones. En los países ricos, muchas personas recurren a diversos tipos de remedios naturales porque consideran que (natural) es sinónimo de inocuo. Sin embargo, a medida que aumenta el uso de las medicinas tradicionales o alternativas, también aumenta el número de informes sobre reacciones adversas. Muchos productos medicinales tradicionales o alternativos son de venta libre. En una encuesta realizada por la OMS en 142 países, 99 de ellos respondieron que la mayoría de esos productos podía adquirirse sin prescripción. En 39 países, muchos remedios tradicionales se utilizan para la automedicación y son comprados o preparados por amigos o conocidos, o por el propio paciente. Esas tendencias plantean dudas acerca de la calidad de los productos utilizados, su idoneidad terapéutica en cada caso, y la falta de seguimiento médico.⁷

3.2.1 Regulación de Medicamentos y remedios herbolarios en México

El uso de medicamentos y remedios herbolarios por la población es cultural lo que conlleva a que la población se encuentre en riesgo de sufrir algún daño, siendo la misión de la COFEPRIS el de proteger a la población contra riesgos sanitarios y teniendo como un objetivo primordial proveer a la población de medicamentos seguros, eficaces y de calidad es que ha decidido regular dichos productos. Para orientar y advertir al usuario sobre el adecuado y seguro consumo de estos productos, la COFEPRIS otorga la “autorización de comercialización” que puede ser un “registro sanitario” si se trata de un medicamento herbolario, el cual tiene una vigencia de 5 años con posibilidad de prorrogarse, o un permiso de “clave alfanumérica”, si es clasificado como remedio herbolario con vigencia indeterminada.⁸

Se clasifica de la siguiente manera:

- Remedio herbolario: Preparado de plantas medicinales, o sus partes, individuales o combinadas, y sus derivados, presentado en forma farmacéutica, al cual se le atribuye por conocimiento popular o tradicional el alivio para algunos síntomas participantes o aislados de una enfermedad. Un remedio herbolario dentro de su formulación no podrá contener otra sustancia de síntesis química que tenga un efecto terapéutico (fármacos, hormonas, vitaminas minerales), no podrá ir dirigido al tratamiento de una enfermedad o un padecimiento que requiera seguimiento médico. Estos productos son de libre venta, su calidad y seguridad han sido comprobadas, sin embargo su eficacia es considerada con base en el conocimiento popular de las planta.⁹
- Medicamento herbolario: Los productos elaborados con material vegetal o algún derivado de éste, cuyo ingrediente principal es la parte aérea o subterránea de una planta o extractos y tinturas, así como jugos, resinas, aceites grasos y esenciales, presentados en forma farmacéutica, cuya eficacia terapéutica y seguridad ha sido confirmada científicamente en la literatura nacional o internacional. Un medicamento herbolario dentro de su formulación no contendrá sustancias de síntesis química que tengan un efecto terapéutico, van dirigidos al tratamiento de una enfermedad y estos pueden o no ser diagnosticados por un médico tratante, su calidad, seguridad y eficacia han sido comprobada técnica y científicamente.⁹

Como ejemplo de plantas que son comercializadas en gran parte del país sin conocer sus propiedades farmacológicas o tengan algún permiso emitido por organismos reguladores, es la cancerina, la cual es utilizada en tratamientos para piel, como cicatrizante y antimicrobiano, por estas propiedades atribuidas empíricamente, es muy común el uso en la población, sobre todo en lugares que no tienen acceso a los servicios básicos de salud.⁹

3.3 Familia *Hipocratacea*

La familia agrupa aproximadamente a 300 especies, distribuidas en los trópicos y subtropicos del mundo. De acuerdo con diferentes autores la familia tiene de 2 a 22 géneros, de los cuales 12 se localizan en América y de éstos, dos se encuentran en México: *Hippocratea* y *Salacia*. En México, *Hippocratea excelsa* es llamada popularmente mata piojo, miseg-bat (Oaxaca), barajillo (Guerrero), piojo, zipche (Chiapas) y palo de reguilete (Yucatán). En medicina tradicional se le conoce como cancerina.^{10, 11}

3.3.1 Cancerina

- ❖ Nombre científico: *Hemiangium excelsum*
- ❖ Nombres comunes en México: acpatle, ixcate, temecaixcatl, Cancerina
- ❖ Familia: *Hipocratacea*
- ❖ Distribución: Crece en México, América Central y la región norte de América del Sur.

Descripción: Enredadera de tallos huecos y erectos, con ramas opuestas y corteza lenticelada, las hojas son opuestas, raramente sobopuestas y pencioladas, las flores tienen 5 pétalos y sépalos, son de color verde y se agrupan en inflorescencia axilares pseudocimosas o paniculadas, el fruto es una cápsula trivalva, que contiene semillas aladas.^{12, 13}

Usos

En la medicina tradicional sólo se utiliza la corteza de la raíz.

- Por vía interna, la corteza de la raíz es recomendado por costumbre popular en los padecimientos de ulcera de estómago y la gastritis, y también en caso de flujo vaginal, en cuyo caso se puede hacer lavados vaginales con la misma preparación.

- Por vía Externa, se utiliza para lavar heridas, aplicando el polvo de la raíz desecado encima de la herida.^{12,13}

Química.

- La corteza de la raíz de *Hippocratea excelsa* contiene los sesquiterpenos emarginatina A e hipocrateínas I y II, también presentes en la corteza del tallo, y el poliprenoide trans-poliipreno.¹⁴

Farmacología.

- Ensayos demostrativos de actividad antiinflamatoria.¹⁴



Figura N° 2 Hoja de Cancerina



Figura N°3 Corteza de Cancerina

3.4 Generalidades la piel

La piel es la cubierta externa del cuerpo humano y uno de los órganos más importantes, representa el 15% del peso corporal y cubre aproximadamente 1,7 m² en el adulto promedio, es un órgano complejo con un número de funciones distintas, y variadas ningún otro órgano es más expuesto a tantas influencias de

lesiones. Como órgano esencial la piel realiza diferentes funciones como: proteger contra agresiones externas y microorganismos, mantener el contenido corporal de agua, controlar la temperatura mediante la regulación de las excreciones como el sudor, la regulación sensitiva ya que emite gran cantidad de información externa como presión y receptores de dolor, y absorbe la luz ultravioleta.^{15, 17}

La piel está compuesta por tres capas principales: la epidermis, dermis, e hipodermis.

3.4.1 Epidermis

La epidermis consiste en un epitelio plano queratinizado estratificado sobre toda la superficie cutánea, y conforma una interfase a nivel de las uniones de la mucosa. La epidermis es un modelo completo de diferenciación celular donde hay células madre que progresivamente se diferencian hasta morir, los queratinocitos son el tipo de células más abundante en esta capa de la piel, son mitóticamente activos en la capa basal, lo que hace que los recién formados desplacen a los otros queratinocitos hacia la superficie, generando así cinco estratos en la epidermis que en orden de profundidad son.¹⁸

- Capa germinativa: Es la capa más profunda de la epidermis, se ubica directamente sobre la dermis, es la capa generativa de la epidermis y da origen a todas las demás capas. Contiene queratinocitos mitóticamente activos, en forma de columna, que se adhiere mediante filamentos de queratina (K5 y K14) a la zona de la membrana basal a nivel de los hemidesmosomas y que originan las células diferenciadas de las capas epidérmicas más superficiales.^{19, 20}
- Capa espinosa: Está compuesta por varias capas de células por encima de la capa de basal, estas células asemejan a los alfileros en miniatura, es la capa media de la epidermis, las células espinosas también contienen grandes fascículos de filamentos de queratina.^{19, 20}

- Capa granulosa: Denominada así por los gránulos queratohialinos basófilos que predominan en las células en este nivel de la epidermis, la capa granulosa es el sitio de generación de numerosos componentes estructurales que formaran la barrera epidérmica, así como numerosas proteínas que procesan estos componentes, esta capa es importante porque representa la zona en la cual las células son despojadas de sus núcleos y se convierten en las células no viables de la capa cornea (estrato corneo), que tiene tanta importancia en el efecto de barrera, los gránulos queratohialinos están compuestos principalmente por profilagrina, filamentos de queratina y locrinina, en esta capa comienzan a formarse la envoltura de células queratinizadas.^{19, 20}
- Estrato córneo: La capa está compuesta de células granulosas anucleadas queratinizadas, aplanadas, proporciona a la piel la protección mecánica y constituye una barrera para la pérdida de agua y penetración de sustancias solubles desde el ambiente, la barrera del estrato corneo está formada por un sistema de dos compartimientos de corneocitos enriquecidos en proteínas y deplecionados de lípidos, rodeados por una matriz lipídica extracelular continua.^{19, 20}
- Estrato lucido: Está formado por células muertas, o apoteósicas, aplanadas, en densa aposición, que contienen eleidina, esta capa es sumamente delgada, con espesor de alrededor de cinco células, puede faltar en regiones del cuerpo de piel fina.^{19, 20}

La epidermis es una estructura que se renueva continuamente cada 40-56 días, tiene un espesor de 0.4 a 1.5 mm, las queratinas son los principales productos proteicos de la epidermis. La expresión de esta familia de proteínas fibrosas, cuyo tamaño varia de 47 a 65 kd, difiere en las diversas estructuras corneas, como la epidermis, el pelo y las uñas. Las queratinas contienen la proteína rica en histadina filagrina estas en conjunto con las proteínas de envoltura, involucrina y queratolinina, son las principales proteínas en la barrera epidérmica, la epidermis también representa el principal componente de la piel que confiere fotoprotección

en donde la melanina sintetizada por los melanocitos de la epidermis absorbe energía radiante y protege la piel de los efectos lesivos de la luz ultravioleta. Hoy se sabe que la epidermis alberga importantes componentes del sistema inmune importantes en el procesamiento de antígeno.²¹

3.4.2 Dermis

Es una capa de tejido conjuntivo que se encuentra debajo de la epidermis, el grosor de la dermis va de 0.2 mm en los párpados a casi 4 mm en las palmas y las plantas es un sistema integrado de elementos fibrosos, filamentosos, difusos y celulares del tejido conjuntivo, en el que se localizan las redes vasculares y nerviosas, las apéndices derivados de la epidermis, y contiene muchos tipos de células residentes, entre ellos fibroblastos, macrófagos, células mastoideas y células circulantes transitorias del sistema inmunitario, tiene un suministro amplio de vasos sanguíneos, glándulas cutáneas y terminaciones nerviosas, confiere a la piel resistencia, elasticidad y flexibilidad, consta de dos capas una profunda o reticular y otra superficial o papilar:^{22, 23}

- La capa reticular está formada por haces de colágeno tipo I, que se disponen en conjuntos de fibras paralelas que se entrecruzan, y por fibras elásticas que soportan tensiones, evitan desgarros y dotan a la piel de distensibilidad.
- La capa papilar está compuesta por tejido conectivo laxo con tipos celulares como fibroblastos, macrófagos y mastocitos; y se encuentra constituida por las papilas dérmicas que son profusiones cónicas a modo de relieves que se interdigitan con la epidermis.

La dermis interactúa con la epidermis en mantener las propiedades de ambos tejidos, colabora durante el desarrollo en la morfogénesis de la membrana basal de la unión dermoepidérmica y de los apéndices epidérmicos e interactúa en la reparación y remodelación de la piel después de sufrir herida los fibroblastos dérmicos son un componente esencial de la piel, son los encargados de la

producción y organización de la matriz extracelular de la dermis, y además se comunican unos con otros, llevando a cabo un papel crucial en la regulación de la fisiología de la piel, son los encargados de liberar factores de crecimiento y citoquinas en los procesos de reparación para modular la actividad de los queratinocitos.^{22, 23}

El colágeno es el componente más importante de la dermis, básicamente, esta molécula está por 3 diferentes cadenas alfa aproximadamente 1000 aminoácidos cada una dispuesta en forma de triple hélice, la prolina y la hidroxiprolina constituyen del 20 al 25 % de total de aminoácidos. Se han identificado, aproximadamente, 30 tipos de colágeno, alguno de los cuales son únicos de células y tejidos específicos, los colágenos fibrilares representan una proporción importante del tejido conjuntivo en la curación de las heridas y particularmente de la cicatrización, la fuerza tensil de los colágenos fibrilares deriva de su entrecruzamiento, que es el resultado de enlaces covalentes catalizados por la enzima lisil-oxidasa, este proceso depende de la vitamina C; por consiguiente, los niños con deficiencia en ascorbato tienen deformidades esqueléticas, sangran con facilidad debido a una membrana basal débil y cicatrizan mal, la dermis contiene colágeno tipo I y tipo III, y la proporción relativa de ambos puede afectar la función tisular. El colágeno IV es un componente importante de la membrana basal y le confiere estabilidad mecánica.²⁴

3.4.3 Hipodermis

Es la capa más interna de la piel está formada por tejido conjuntivo y células adiposas, actúa como un mecanismo de amortiguación contra golpes y caídas, no está distribuida con uniformidad, ya que se encuentra casi ausente en el cuero cabelludo, pero es muy abundante en mamas, abdomen, cadera y músculo, es en promedio 8% mayor en mujeres que en hombres y varía con la edad.²⁵

3.4.4 Síntesis de colágeno

Cuando se produce la síntesis del colágeno, los fibroblastos sintetizan el tropocolágeno, el precursor del futuro colágeno. La hidroxilación de las prolinas del

tropocolágeno en hidroxiprolina es la reacción crucial de síntesis del colágeno, la hidroxiprolina presente en el colágeno se encuentra en dos formas isoméricas trans-3-hidroxi-L-prolina y trans-4-hidroxi-L-prolina. La presencia de una cantidad suficiente de trans-4-hidroxi-L-prolina es un prerequisite para el plegamiento de las cadenas alfa para formar un triple hélice, la cual representa la conformación necesaria para la secreción de las moléculas de procolágeno hacia el exterior de las células, la hidroxiprolina actúa a nivel de la epidermis y de la dermis y provoca el aumento de la síntesis de las ceramidas, mediante la activación de la proliferación de los queratinocitos a nivel de la epidermis, el dipalmitoil hidroxiprolina se ha descrito como factor de reparación de la epidermis, en particular como agente cicatrizante.

La hidroxilación contribuye a estabilizar la molécula de colágeno, gracias a la formación de enlaces covalentes entre las diferentes cadenas polipeptídicas vecinas, proteger a las proteínas contra la digestión por las proteasas y permitir una buena secreción en el espacio intercelular.²⁶

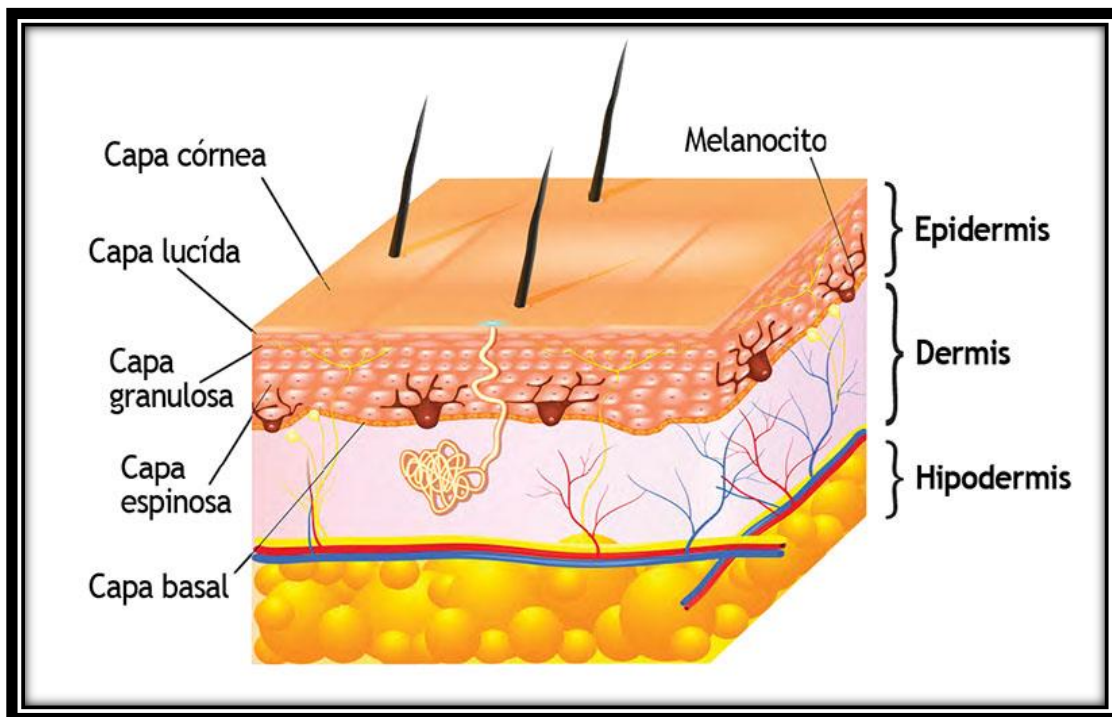


Figura n° 4 Partes de la piel

3.5 Tipos de herida

Las heridas son lesiones que producen rotura de piel, con peligro de que surjan infecciones por contaminación microbiana.

Las heridas se manifiestan clínicamente por:

- Dolor.
- Hemorragias.
- Separación de los bordes de la herida.

Los tipos de heridas se pueden clasificar como :

1. La intencionalidad del agente causante (Operación, venoclisis, radiación)
2. Grado de integridad de la piel (Heridas abiertas o cerradas)
3. Grado de contaminación
4. Según la naturaleza del agente agresor (Heridas abrasivas, punzocortantes, contusas).²⁷

3.5.1 Cicatrización de heridas

La cicatrización es el conjunto de acontecimientos a nivel local ante una lesión a los tejidos para mantener la integridad física del organismo, es mediado por proteínas solubles (citosinas y factores de crecimiento) y células encargadas de la proliferación celular para el restablecimiento del tejido lesionado. Hay dos tipos de cicatrización, de primera y segunda intención.²⁸

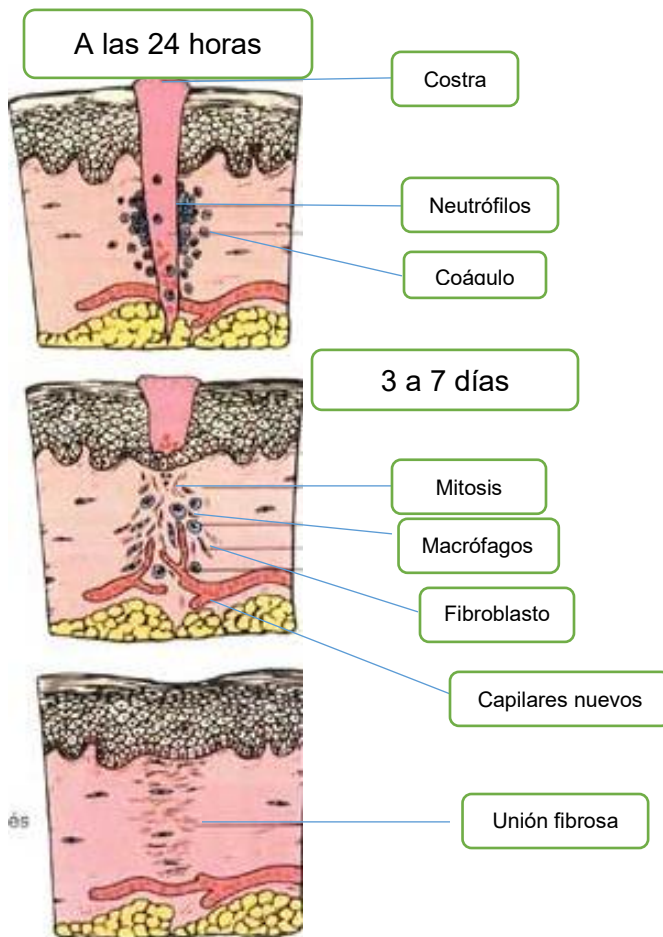
3.5.2 Cicatrización de primera intención

Este tipo de cierre se produce principalmente en heridas limpias, asépticas, con escasa pérdida de sustancias por ejemplo: (incisiones quirúrgicas, heridas incisas o punzocortantes y en general poco evolucionadas con el tiempo. La cicatrización se lleva a cabo de forma oculta, bajo los bordes cerrados, esta aproximación de los bordes puede ocurrir espontáneamente, pero suele ser necesario promoverlas con suturas y vendajes que lo afronten y lo inmovilicen el tiempo suficiente para que se resuelva la solución de continuidad mediante el establecimiento de puentes de fibrina y posteriormente los puentes nexos intercelulares, en este tipo de herida hay escasa pérdida de tejido y mínima formación de tejido de granulación.^{29, 30}

3.5.3 Cicatrización de segunda intención

Se produce cuando existe una pérdida extensa de tejido y los bordes están separados. Estas heridas cicatrizan desde la base y los bordes de herida, a partir de la membrana basal, y en la que tiene lugar la formación de abundante tejido de granulación. Por ejemplo: infartos, abscesos, heridas superficiales con grandes defecto. También pueden generar nuevos tejidos desde los restos de anejos cutáneos, si los hay, ya que estos también están rodeados de membrana basal. Este tipo de cicatrización es más lento y, en general con peores resultados tanto estética como funcional.^{29, 30}

Curación de Primera intención



Curación de segunda intención

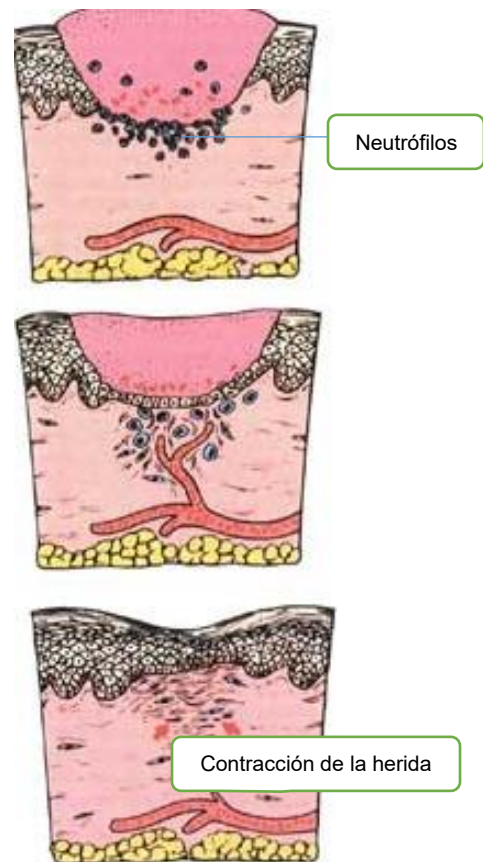


Figura nº 5 Esquema general de cicatrización

3.5.4 Cicatrización de heridas epidérmicas

Aunque la porción central de una herida epidérmica podría extenderse hasta la dermis, los bordes de la herida suelen comprometer solo las células epidérmicas superficiales, los tipos más comunes abrasiones o quemadura menores, en respuesta a una lesión epidérmica, las células basales de la epidermis que rodean a herida pierden contacto con la membrana basal, luego las células se agrandan y migran a través de la herida, estas células parecen migrar como una lámina hasta que se encuentran con células que avanzan desde el lado opuesto de la herida, cuando las células se reúnen, detienen su migración como consecuencia de una respuesta celular llamada inhibición por contacto. A medida que las células basales epidérmicas migran, una hormona llamada factor de crecimiento epidérmico estimula a las células madre basales para que se dividan y reemplacen a las que migraron hacia el centro de la herida.³¹

3.5.6 Fases de la cicatrización

La cicatrización de las heridas profundas se produce cuando la lesión se extiende hasta la dermis y el tejido subcutáneo, el proceso de curación es más complejo que el de las heridas epidérmicas, asimismo como se forma tejido cicatrizal, el tejido pierde algunas de sus funciones normales. Este tipo de cicatrización presenta cuatro fases: inflamatoria, migratoria, proliferativa y madurativa.¹⁴ Virtualmente todos los procesos de cicatrización, están bajo control de mediadores específicos procedentes de las plaquetas, macrófagos y linfocitos. El futuro del tratamiento de las heridas en fase aguda apunta a intervenciones bioquímicas que favorezcan de forma considerable la cicatrización de la herida. La cicatrización de la herida se describe por lo general como una sucesión de fenómenos independientes, en realidad se trata de un continuo de fases solapadas. Normalmente la cascada de eventos que producen la reparación del tejido lesionado, se conduce por factores de crecimiento generados por las células implicadas en el proceso como queratinocitos, fibroblastos y células inflamatorias. Estos factores de crecimiento regulan la proliferación y la diferenciación celular,

son importantes en el desarrollo embrionario, la regeneración tisular (a nivel fetal) y la reparación. Muchos de estos factores actúan en cada una de las etapas del proceso de cicatrización.^{32, 33}

3.6 Fase aguda o inflamatoria

Esta etapa de cicatrización es de respuesta inmediata y se extiende hasta el sexto día de producirse la herida, predomina los fenómenos típicos de la inflamación, que es una respuesta vascular y celular encargada de contribuir a la eliminación de microorganismo, materiales extraños y tejido muerto antes de la reparación, y se desarrolla la hemostasia espontánea o fisiológica, además de formarse un coágulo sanguíneo, cuando está en el lugar de la lesión actúa como una matriz provisoria para la migración celular. El componente inicial de esta fase esta denominado por las plaquetas, que dirigen la coagulación de la herida fresca por las vías intrínsecas y extrínsecas. Las plaquetas también liberan una cantidad de factores quimiotácticos que atraen a otras plaquetas, leucocitos y fibroblastos al sitio de la lesión. Los leucocitos descienden dentro del torrente sanguíneo a través de la expresión de selectinas que, acopladas con las integrinas, atraen a los glóbulos blancos hacia la herida. Estas células tienen múltiples funciones incluyendo el desbridamiento de bacterias y material necrótico, así como también la producción del factor de crecimiento de tejido por parte de células inflamatorias y expresadas en las heridas. El coágulo de fibrina resultante de la lesión inicial proporciona una cobertura temporal de la herida y consiste en plaquetas incrustadas dentro de una red. Ésta fase se caracteriza por los cinco signos cardinales de la inflamación: calor, tumor, rubor, dolor y pérdida de la función, además procedentes de la sangre extravasada se depositan en la herida mediadores o productos químicos como parte de la respuesta inflamatoria, y se liberan sustancias de tipo histamina y serotonina que favorecen la permeabilidad vascular, de esta forma se facilita que los leucocitos, atraídos por quimiotaxis, puedan llegar al foco traumático, durante la etapa inflamatoria, se destacan por su actividad el Factor de Crecimiento Transformante beta ($TGF\beta$), Factor de

Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF), y Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF), junto con interleucinas implicadas en la inflamación.^{32, 33}

3.6.2 Formación de tejido (Fase proliferativa)

El periodo inicial de esta fase es el más importante, ya que en él se producen los fenómenos de reparación de la pérdida de sustancias. Durante la fase de proliferación celular y formación del tejido de granulación, sobresalen el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), Factor de Crecimiento de los Queratinocitos (KGF), Factor de Crecimiento de los Fibroblastos básico (bFGF), Factor de Necrosis Tumoral (TNF), Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) e IGF (Factor de Crecimiento Insulínico). Dentro de la fase proliferativa ocurren las siguientes fases:^{15, 16}

- Angiogénesis. Durante el periodo de inflamación postraumática se produce en los bordes de la herida una hipoxia relativa, despolimerización del tejido conectivo y aumento de la presión hidrostática capilar por vasodilatación. Estos cambios fisiopatológicos tienen la virtud de estimular la actividad mitótica de las células endoteliales capilares.
- Fibroplasia. La proliferación fibroblástica se encuentra en íntima relación con el desarrollo vascular al depender directamente, como cualquier otra célula, del aporte oxigenado y metabólico. Los fibroblastos proceden de la capa adventicial de los vasos sanguíneos, en este periodo se caracteriza por experimentar una elevada multiplicación mitótica colonizando uniformemente toda la extensión de la superficie a reparar, en condiciones normales, al foco traumático llegan algunas líneas celulares que, por orden de aparición corresponden a: hematíes, plaquetas, leucocitos polimorfonucleares, macrófagos, linfocitos y finalmente fibroblastos, estos hacen aparición en el segundo o tercer día, cuando todavía no ha finalizado la fase anterior.³⁴

3.6.3 Período de maduración y remodelación de la cicatriz

3.6.3.1 Fase madurativa

Aunque la herida ya se encuentra ocupada por un tejido conectivo reparador, puede decirse que no alcanza la solidez deseada para resistir agresiones externas, hasta que alcanza varias semanas, por ello es necesario que dicho tejido madure, se desarrollan fibras colágenas mejor orientadas, para resistir la tracción, disminuye la concentración de fibroblastos al igual que el ácido hialurónico y agua. Este proceso comienza inmediatamente después de producirse el traumatismo, tiene como finalidad recubrir la superficie del tejido conectivo cicatricial, en donde se incrementa la actividad mitótica de todas las células, especialmente a partir del segundo y tercer día, donde las células del extracto basal cutáneo, indiferenciadas y dotadas de actividad móvil, poseen asimismo una importante actividad colagenolítica, destruyendo aquellas fibras de colágeno que oponen su paso, finalmente la etapa de remodelación es conducida por factores como: Factor de Crecimiento de los Hepatocitos (HGF), KGF, EGF, bFGF, TGF β y PDGF, si con esta epitelización no se consigue que la herida cubra totalmente, el crecimiento epidérmico no prosigue; la herida se convierte en una úlcera crónica con riesgos generales.³⁴

3.7 Factores que afectan la cicatrización

Diversos factores afectan el proceso normal de cicatrización:

1. Edad: El avance de la edad interfiere con la cicatrización especialmente con la tasa de crecimiento y de multiplicación de los fibroblastos. El deterioro de la función pulmonar y cardiovascular que acompañan la edad avanzada resulta en disminución de la circulación y de la provisión de oxígeno; asimismo, edad avanzada resulta en disminución de la circulación y de provisión de oxígeno, además de ser acompañada con una depleción de la masa celular y desnutrición proteica.
2. Nutrición: La desnutrición proteica interfiere sobre la síntesis de colágeno

3. Vitaminas y elementos traza: Las vitaminas A y C, el zinc, son micronutrientes necesarios para el proceso de cicatrización. El hierro y el cobre son factores esenciales para la síntesis de colágeno.
4. Hipovolemia y anemia: Su efecto nocivo sobre la cicatrización se debe a la hipoxigeación tisular resultante.
5. Tensión (Presión arterial) del oxígeno: El oxígeno es un elemento esencial para la cicatrización y sus fenómenos constituyente; migración y proliferación celular, metabolismo intermediario, síntesis proteica, síntesis de colágeno. Todos aquellos factores que incidan sobre provisión de oxígeno a la herida (estados de hipoxia o enfermedad cardiovascular, alteración pulmonar, alteraciones vasculares postraumáticas) tienen efecto nocivo sobre la cicatrización.
6. Esteroides y fármacos citotóxicos: Los esteroides ejercen una profunda acción negativa sobre la cicatrización por que alteran la síntesis proteica, el proceso de vascularización, la proliferación de fibroblastos y la tasa de reepitelización, su efecto principal es la inhibición global del proceso inflamatorio. Las drogas citotóxicas inhiben la proliferación celular, que es un factor primordial de la cicatrización, ya que dificultan la vasodilatación inflamatoria, disminuye la mitosis celulares, crean neutropenia con descenso de la fagocitosis y frenan la síntesis proteica.
7. Coagulopatías; Gran parte de trastornos de coagulación pueden producirse retrasos en la cicatrización. Esta circunstancia puede observarse no solo cuando hay déficit del factor XIII o estabilizador de la fibrina, sino que otros procesos, como la afibrinogenemia congénita y la hemofilia, también disminuyen o bloquean la elaboración de una red de fibrina normal para estabilizar y en parte dirigir los procesos de fibroplasia.
8. Endocrinas: La diabetes por las alteraciones vasculares que lo acompañan, el aumento del riesgo de infecciones e incluso la propia insulina que actúa directamente en la síntesis de la sustancia fundamental, la obesidad que genera una disminución general de la oxigenación, además de someter a la piel y particular a las suturas a un aumento de la tensión.

9. Infección: La colonización microbiana exógena, tanto de heridas agudas como crónicas, es inevitable, aunque en muchas ocasiones predomina bacterias endógenas que se tornan patógenas en el seno de la herida. La infección produce trombosis vascular con la consiguiente necrosis, dificulta la acción enzimática en el periodo proliferativo y además, interpone obstáculos físicos a la cicatrización, ya que se genera esfacelos y restos necróticos, la infección genera retracción en la curación de las heridas y su aparición es muchas veces favorecida por otros factores locales nocivos.³⁵



Figura n° 6 Factores que afectan la cicatrización

3.8 Óxido nítrico durante reparación de heridas

Durante el proceso de reparación de la herida el óxido nítrico media un mecanismo de retroalimentación regulatorio, en el que el 1L-1beta y TNF-alfa derivados de PMN (polimorfonucleares), inician la expresión de RANTES en queratinocitos durante las fases iniciales por lo que el óxido nítrico modularía la infiltración de macrófagos. Además el óxido nítrico colabora en la cicatrización, estimulando la angiogénesis o por un efecto trófico en la proliferación de células

epidérmicas (por la vía de la hemo oxigenasa) además la producción de óxido nítrico es de gran importancia en los estadios inflamatorios de la cicatrización de heridas, aumentando el flujo sanguíneo que facilitaría la nutrición y la infiltración celular y posiblemente también en los estadios tardíos de proliferación y remodelación tisular.³⁶

3.9 Plantas para uso cicatrizante y antiséptico

Existe una clasificación diferente a la botánica, la cual se basa en la función que las plantas desempeñan en los diferentes tratamientos o propiedades que se les atribuye, entre ellas se encuentran las plantas para uso en la piel, que aportan hidratación, ayudan en el proceso de cicatrización, antisépticos, entre otras. En el caso de plantas cicatrizantes su uso dependerá del tipo de herida, como en tratamientos de úlceras y heridas no profundas en donde se recomienda plantas que presenten actividad cicatrizante y antiséptica por ejemplo:

Agrimonia	Cicatrizante, favorece a la curación de úlceras y heridas de lenta cicatrización.
Manzanilla	Cicatrizante, emoliente, antiséptico.
Berro	Facilita la formación de nueva piel.
Romero	Cicatrizante, antiséptico, estimula la cicatrización de úlceras.
Consuelda mayor	Efectiva para acelerar la curación de llagas y cicatrización lenta.
Equinacea	Antiséptico, cicatrizante, regenera los tejidos.

Cuadro n°1 Plantas cicatrizantes

Hoy en día los estudios de investigación han podido demostrar, científicamente las propiedades y mecanismos de acción que algunas de estas plantas poseen, con la seguridad de no sufrir efectos adversos en pacientes que las utilizan. Algunos de los grupos químicos más importantes que poseen las plantas son, los

heterósidos, polifenoles, terpenoides y alcaloides, que a su vez se dividen en subgrupos, algunos de ellos son:^{37, 38}

- Ácidos fenólicos. Son sustancias polifenólicas con aril-carboxílicos, con uno o más grupos OH en el arilo. Sus acciones farmacológicas y aplicaciones son diversas, como antioxidantes, analgésicos, coleréticos, antiséptico. Entre los fenoles en estado libre, se encuentran constituyentes importantes de las esencias, como el timol y su isómero el carvacrol (esencias de tomillo). Muchos de los fenoles están en estado de éter oxidado en las esencias, entre ellos el estragol, la miristicina, el apiol, y el atenol.
- Taninos. Son sustancias polifenólicas hidrosolubles no nitrogenadas, de origen vegetal, dan las reacciones clásicas de los fenoles. Los hay hidrolizables y condensados. El tanino se encuentra principalmente en las raíces, la corteza, y de vez en cuando en las hojas de la planta. Estos compuestos tienen propiedades antibacterianas, astringentes y antisépticas. Se encuentran especialmente en las familias de las Ericáceas, Leguminosas, Rosáceas y Salicáceas.
- Saponinas. Son sustancias terpenoides, que tienen poder espumante en soluciones acuosas, y son tensoactivos naturales. Muchas poseen propiedades hemolíticas (desintegración de los eritrocitos), las encontramos en la semilla de castaño de indias, en el regaliz (*Glycyrrhiza glabra*), la centella asiática (*Centella asiatica*), y en el ginseng (*Panax ginseng*).
- Sesquiterpenos. Son sustancias terpenoides que se encuentran abundantemente en la familia de las Compuestas, Lauraceas y Magnoliaceas, tienen actividad antibacteriana y antifúngica, son responsables del sabor amargo de muchas drogas como el cardo santo (*Cnicus benedictus*), el ajeno (*Artemisia absinthium*) o el diente de león (*Taraxacum officinale*).^{39, 40}

Sin embargo existen algunas plantas que aún no han sido comprobadas farmacológicamente como la planta cancerina que es utilizada empíricamente para distintos tratamientos como: heridas, granos, llagas, pie diabético, dolor de

estómago, y cadera entre otras, que además es comercializa en gran parte del país, esta planta tiene estudios en relación con la actividad citotóxica en líneas celulares como HeLa, la cual presenta grado de citotoxicidad selectiva en los medios de cultivo empleados, también existen algunos estudios en donde se evalúa el efecto antiinflamatorio empleado ratas a las cuales se les induce una inflamación, comprobando el efecto antiinflamatorio, se han identificado algunas moléculas de interés científico como los sesquiterpenos los cuales, son terpenos presentes en los aceites minerales, que actúan como fitoalexinas, compuesto antibiótico producido por las plantas en respuesta de aparición de microorganismos, no existen estudios correspondientes que evalúen el efecto cicatrizante y antimicrobiano.

4. Planteamiento de problema

La cicatrización es el proceso por el cual el organismo repara un tejido dañado, consta de cuatro etapas. La primera es la hemostasia, proceso que busca detener el sangrado; la segunda es la formación de escara o costra para sellar la herida; luego viene la regeneración de matriz elástica, piel más fina y clara que se observa al desprenderse la costra y, finalmente, la remodelación, donde se forma el tejido definitivo lo más parecido al que existía previamente. Actualmente muchas personas padecen problemas de cicatrización debido a varios factores como enfermedades crónico degenerativas o problemas en la producción de colágeno derivado de estas complicaciones conlleva a un riesgo de sufrir necrosis o gangrena en zonas afectadas.

El tratamiento inadecuado o el alto costo de los medicamentos en el seguimiento de lesiones durante la cicatrización, conlleva a investigar las propiedades de plantas medicinales que son utilizados como remedios tradicionales en el tratamiento de heridas, con la finalidad de tener una mejora en la calidad de vida en los pacientes que sufren alguno de estos problemas, teniendo alternativas eficaces, y seguras.

Se conocen algunos tratamientos a base de plantas medicinales de uso común en la población, que han sido probados científicamente. Se sabe que la planta *Hemiangium excelsum* usualmente es ocupada en el tratamiento de cicatrización en algunos estados de la república mexicana como Puebla, Morelos y Guerrero, sin embargo no existen estudios de las propiedades cicatrizantes de *Hemiangium excelsum*, por lo cual se montará un proyecto para comprobar su actividad cicatrizante, y antimicrobiana, lo que nos lleva a plantear las siguientes preguntas.

¿El extracto de *Hemiangium excelsum* presentará efecto cicatrizante en ratones CD1?

¿El extracto presentará efecto antimicrobiano en placas de cultivos de *E. coli* y *S. aureus*?

5. Objetivo general

Evaluar el efecto cicatrizante del extracto *Hemiangium excelsum* en ratones CD1 y antimicrobiano en placas de cultivos de *E. coli* y *S. aureus*.

5.1 Objetivos particulares

- Cuantificar el porcentaje de hidroxiprolina en el tejido cicatrizado del tratamiento *Hemiangium excelsum*.
- Cuantificar el porcentaje de Nitritos en el suero de los ratones del tratamiento *Hemiangium excelsum*.
- Medición de diámetros de las heridas en el tratamiento de *Hemiangium excelsum*.
- Evaluar actividad antibacteriana del extracto acuoso de *Hemiangium excelsum* en diferentes concentraciones en cepas de *E. coli* y *S. aureus*.

6. Hipótesis

A la planta de cancerina se le atribuye efectos cicatrizantes debido a la síntesis de colágeno y antimicrobiano por su contenido sesquiterpenos, se espera que el extracto acuoso de la planta muestre el efecto cicatrizante en un modelo de ratones CD1 y efecto antimicrobiano en placas de agar.

7. Metodología

Tipo de estudio: Experimental

Población de estudio: 18 ratones CD1 et/et

Criterio de inclusión, exclusión y eliminación

* Inclusión: Ratones CD1 et/et machos de 3 meses de edad, entre 35 y 40 gramos de peso, sanos.

* Eliminación: Ratones que mueran durante la experimentación o desarrollen tumores.

Variables

Variable independiente:

* Tratamientos:

* 1- Madecassol (control positivo).

* 2- Vaselina (control negativo).

* 3- Ungüento al 4% de extracto acuoso en vaselina de *Hemiangium excelsum* (planta de estudio).

Concentración del extracto

- 1) 250 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- 2) 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- 3) 1000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Cepas

- 1) *S. aureus*.
- 2) *E. coli*.

Variable dependiente:

* Actividad cicatrizante (determinada a través del modelo de escisión en roedores)

- 1) Diámetro promedio de las lesiones.
- 2) Valoración de colágeno (por medio de la determinación de hidroxiprolina).
- 3) Estimación de angiogénesis (por medio de la determinación de nitritos).

*Actividad antimicrobiana (Por medio del método de difusión en pozos)

- 1) Halos de inhibición (mm).

7.1 Material

Tabla nº 1 Instrumentos y reactivos

Tubos de ensayo 12x75	Matraz Erlenmeyer (Pyrex) 2L	Vasos de precipitados (Pyrex) 50 mL
-----------------------	------------------------------	--

Probetas de 50,100,250 mL	Vaso de Precipitado (Pyrex) 250 mL	Espátula
Vasos de precipitados 500 mL	Gasa no estéril	Sacabocados de 10 mm
Pipetas volumétricas 1mL	Molino	Jaulas para roedores de laboratorio
Matraz aforado 100 mL	Papel filtro (poro medio)	Bebedores para roedores
Puntas estériles 10-100 µL	Papel parafin (Laboratory film)	Guantes de látex
Puntas estériles 100-1000 µL	Filtro de porcelana	Agua destilada
Gradillas	Matraz Kitazato (Pyrex)	100 g de <i>Hemiangium excelsum</i>
Cloruro de amonio	Ratones macho CD1	Vaselina (Vasenol® Unilever)
Sulfato de Zinc	Cadmio metálico	Extracto acuoso de <i>Hemiangium excelsum</i>
Ácido acético glacial	Sulfato cuproso	Agua destilada
Sulfanilamida	Ácido clorhídrico	Nitrito de sodio
N-(1-nafnitl)-etilendiamino	Ácido perclórico	Agua destilada
Buffer pH 6.5	Reactivo de Ehrlich	Cloramina- T
Solución estándar de Hidroxiprolina	Éter (J. T Baker®)	Ungüento al 4% del extracto acuoso <i>Hemiangium Excelsum</i>

Madecassol ® (Sanofi Aventis)	Vaselina (Vasenol® Unilever)	Rodent Lab Chow 5001 Purina®
-------------------------------	------------------------------	------------------------------

7.2 Equipo

Tabla nº 2 Equipo

Balanza granataria OHAUS	Balanza analítica (ADAM)
Rotavapor RE300 Yamato	Horno de microondas Sonics
Bomba de vacío Koblenz	Balanza analítica ADAMS
Matraz bola	Rocker platform Bellco Glass
Balanza analítica OHAUS	Micropipeta Labsystems 40-200 µL
Espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC Spectronic 20	Micropipeta socorex Swiss 5-50 µL
Microespectrofotómetro UV/VIS Jenway 6305	Microcentrifuga Hermle Z233M-2

8. Técnicas

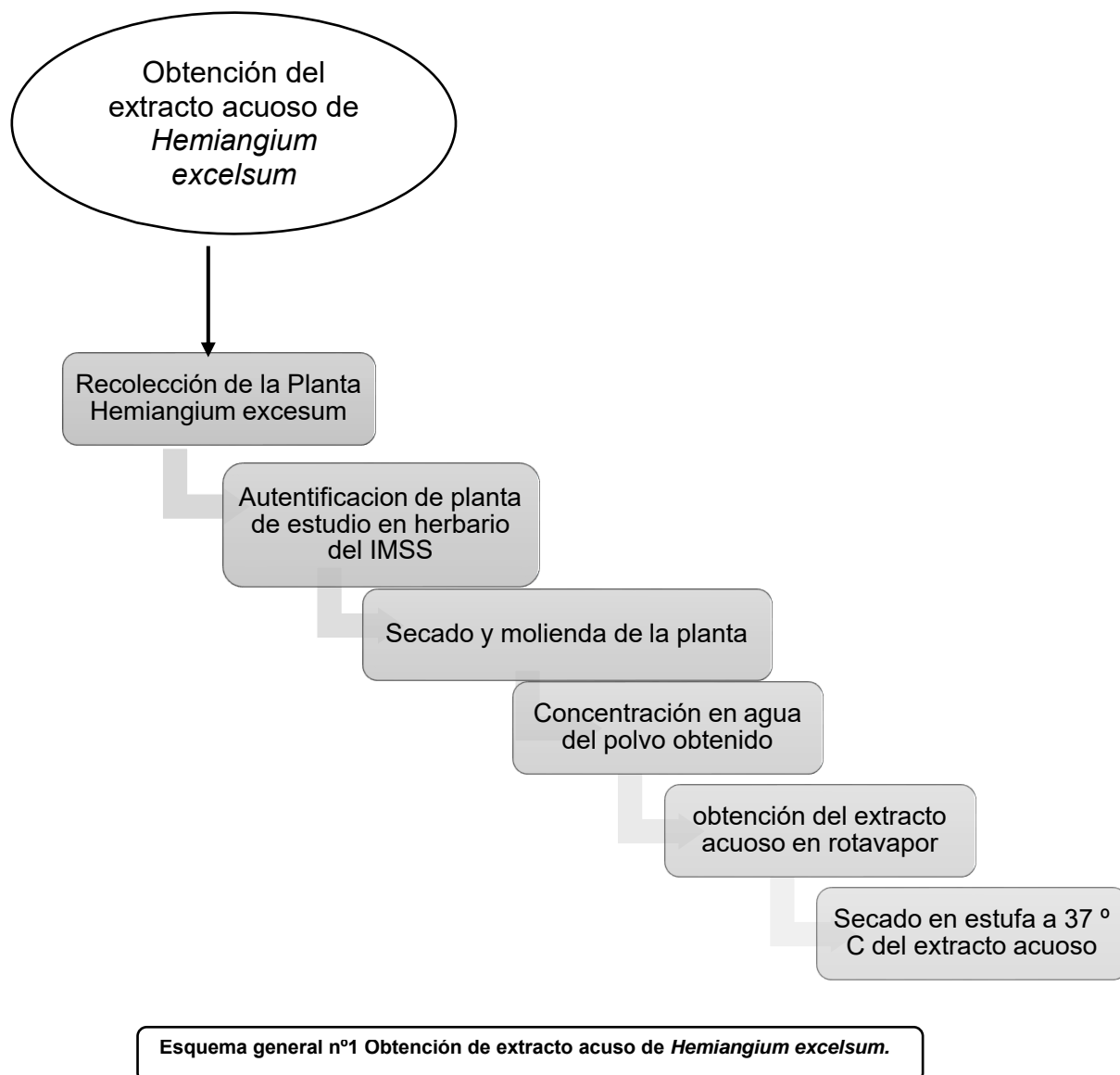
8.1 Obtención del Extracto acuoso de *Hemiangium excelsum*

Procedimiento

Se pesaron 106 g de la corteza de *Hemiangium excelsum*; la cual fue previamente secada, se molió y se obtuvo un polvo de color café rojizo que fue colocado en un matraz de 2 L en 1 L de agua, la infusión resultante se tornó de color negro y se dejó reposar en un cuarto frío por 3 días.

Transcurrido el tiempo de reposo se filtró con vacío por medio de una gasa para remover la mayor cantidad de material fibroso, se obtuvo un líquido de color negro que fue filtrado con papel filtro poro mediano, la cual se presenciaba aspecto jabonoso; luego se procedió a destilar la solución obtenida colocándolo en el rotavapor con una temperatura de 60 °C por 6 horas extrayendo toda el agua posible, se recolectó todo el extracto obtenido en un vaso y se colocó en la estufa a 37 °C por 5 días para quitar el exceso de agua, una vez seco, se desprendió de las paredes del vaso obteniendo un polvo de color negro. Se calculó el

rendimiento obteniendo que fuera de 14 g de extracto seco con un rendimiento de 14%.



8.2 Preparación de ungüento al 4% del extracto de *Hemiangium excelsum*

Procedimiento

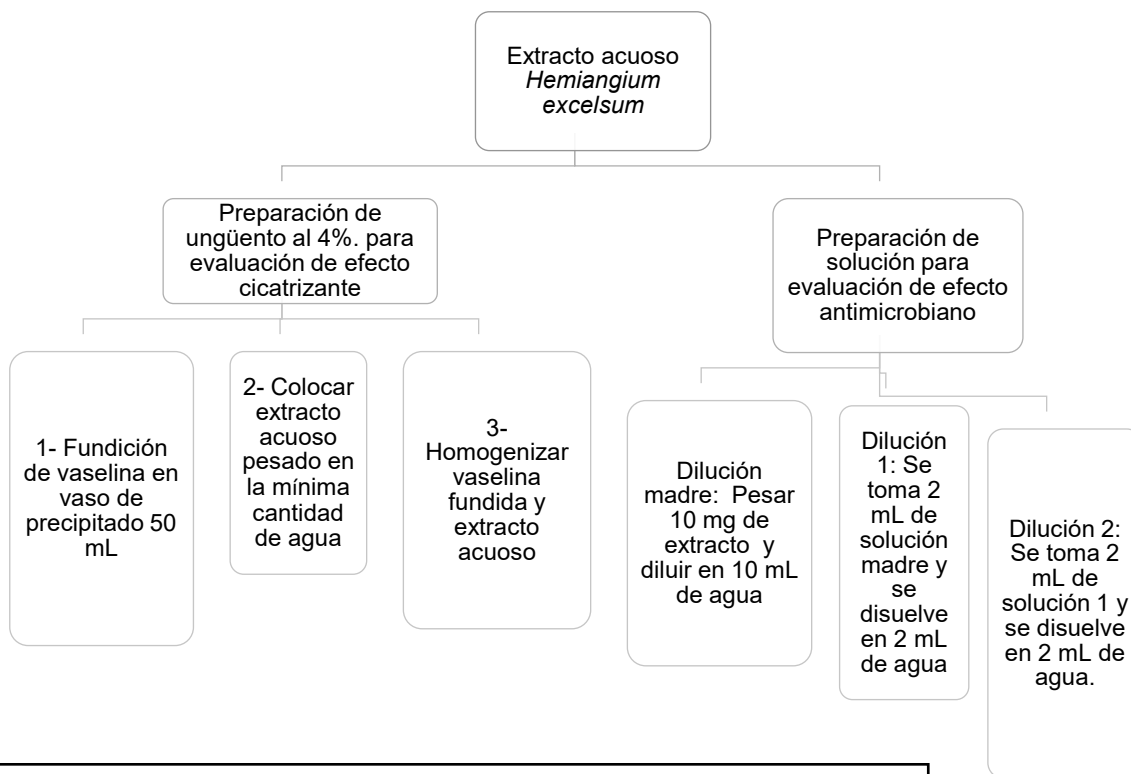
En un vaso de precipitados de 50 mL se colocaron 9.6 g de vaselina la cual fue fundida en el horno de microondas en ciclos de 30 segundos hasta su disolución total, cuidando que no se pegara a las paredes o se proyectara. En otro vaso de 50 mL se colocaron 0.4 g de extracto de *Hemiangium excelsum* se colocó lo mínimo posible de agua para disolver el polvo, una vez que se disolvió completamente, se le adicionó la vaselina fundida hasta homogenizar con una varilla de vidrio completamente el ungüento.

8.2.1 Preparación del extracto *Hemiangium excelsum* para la determinación de actividad antimicrobiana

Disolución madre: Se pesaron 10 mg del extracto problema y disolvieron en 10 mL de agua destilada. Concentración final 1000 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Dilución 1: Se midió una alícuota de 2 mL de disolución madre y disolvió en 2 mL de agua destilada. Concentración final 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Dilución 2: Se midió una alícuota de 2 mL de la disolución 1 y disolvió en 2 mL de agua destilada. Concentración final 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Esquema general nº 2 Obtención de ungüento y soluciones de *Hemiangium excelsum*.

8.3 Evaluación del efecto cicatrizante en ratones machos CD1.

Se ocuparon 18 ratones CD1 machos que pesaban entre 18 y 22 g los cuales fueron alimentados con Rodent lab chow Purina® y agua ad libitum. Los animales fueron cuidados de acuerdo con los criterios establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para uso y cuidado de los animales de laboratorio.

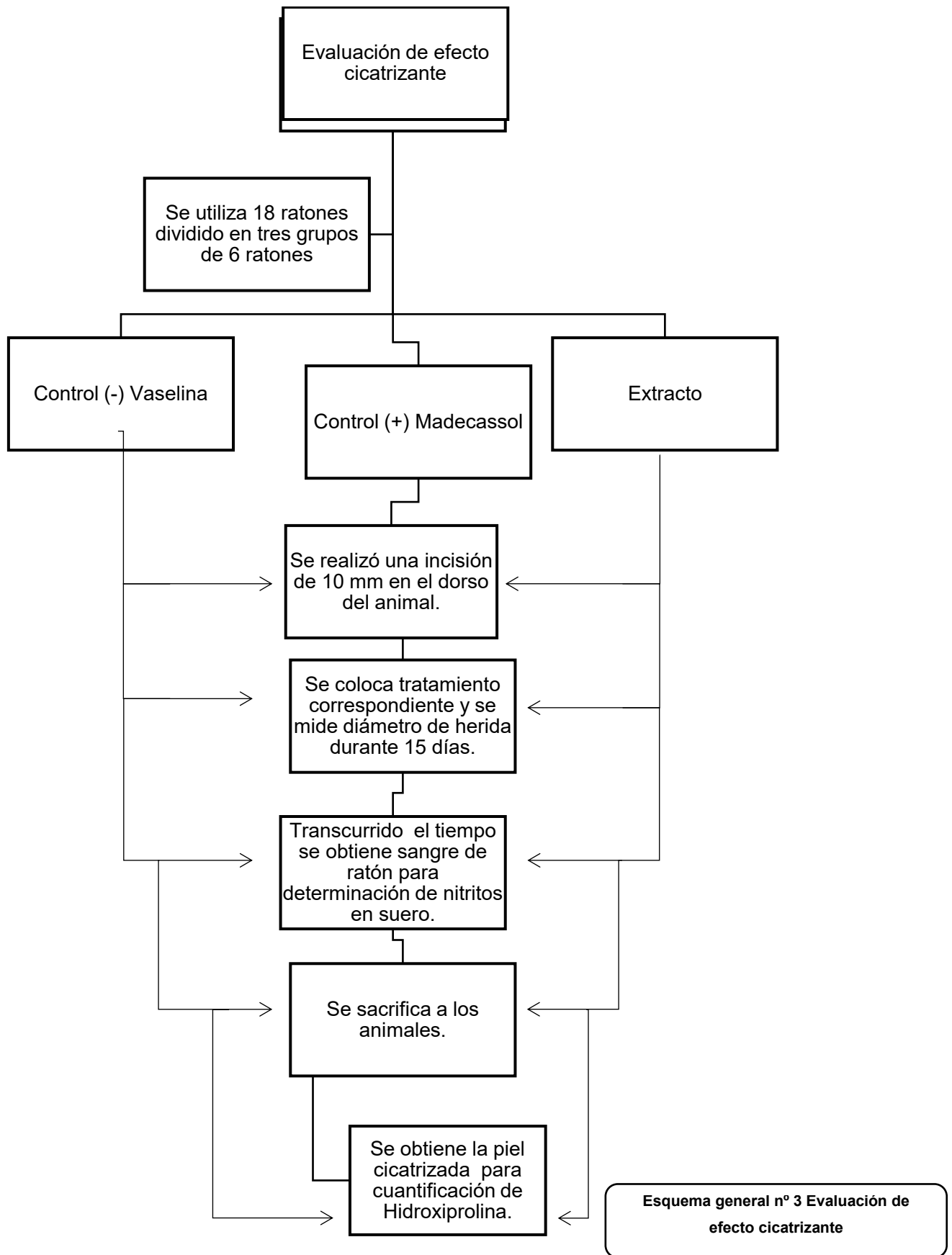
Los ratones fueron divididos en tres grupos de 6 ratones, posteriormente se anestesiaron en la cámara de éter, una vez anestesiados se colocaron en una tabla y con un sacabocados se les realizó una incisión de 10 mm de diámetro en el dorso del animal cuidando que la herida estuviera centrada para evitar que se lastimara la zona de la herida.

Los animales recibieron diariamente el tratamiento de la siguiente manera: al grupo testigo negativo se le administró en la herida Vaselina (Vasenol ® de Uniliver) como control negativo, al segundo grupo de ratones se les colocó Madecassol ® en ungüento al 4% (Sanofi Aventis) como control positivo, y en el último grupo se les colocó ungüento al 4% del extracto acuoso de *Hemiangium excelsum*, esto con ayuda de un guante estéril. Los ratones permanecieron separados para evitar que se dañara la lesión. Los animales se revisaron diariamente, se midió el diámetro de la lesión, y se administró el tratamiento correspondiente durante 11 días.

Transcurrido el tiempo de cicatrización de las heridas los ratones se les colocó en una cámara de éter para anestésarlos y se obtuvo sangre realizándole una incisión con el bisturí en la zona del plexo axilar; las muestras fueron recolectadas en tubos Eppendorf previamente identificados y limpios para la determinación de nitrito. Una vez recolectada las muestras de sangre se dejaron coagular a temperatura ambiente y se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos y se procedió a sacrificar a los ratones por medio de dislocación cervical.

Después de que los ratones fueron sacrificados se obtuvieron muestras de piel cicatrizada, empleando un sacabocados de 10 mm, estas muestras se guardaron en tubos Eppendorf para la cuantificación de hidroxiprolina.

Ambas muestras recogidas fueron conservadas en congelación hasta el día que se realizaron las determinaciones.



8.4 Determinación de Nitritos usando el método de Griess.

Tratamiento de las muestras

El procedimiento se realizó en los 18 ratones empleados en el modelo de escisión, se recolecto sangre por corte axilar en tubos Eppendorf para su posterior centrifugación, y obtención de suero.

Se tomaron 100 μL de suero de ratón, adicionando 300 μL de agua destilada con la que se obtuvo una dilución 1:4, la dilución se agitó en un Vortex para homogenizar y se agregaron 20 μL de una solución de ZnSO_4 al 30% para desproteínizar la muestra, posteriormente se separó el sobrenadante, colocándolo en un tubo que contenía cadmio plateado, se agito en un rocker durante 15 min y se centrifugó durante 5 minutos a 3500 rpm, finalmente se tomaron 200 μL de sobrenadante para el ensayo.

Curva estándar Nitritos

Para realizar la curva estándar se preparó una serie de diluciones a partir de una solución patrón que contiene 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nitrito de sodio, siguiendo la tabla n° 3 de diluciones y concentraciones de nitritos.

Tabla n° 3 Diluciones y concentraciones de nitritos

Curva estándar		
Tubos 13x75 mm	Estándar de nitrito de sodio	Agua destilada
Blanco	0 μL	900 μL
1	100 μL	800 μL
2	200 μL	700 μL
3	300 μL	600 μL
4	400 μL	500 μL
5	500 μL	400 μL

Adicionar 50 μL de Sulfanilamida en 150 mL de ácido acético al 15% V/V y guardar en frasco ámbar

Adicionar 50 μL de NED, esperar 30 min

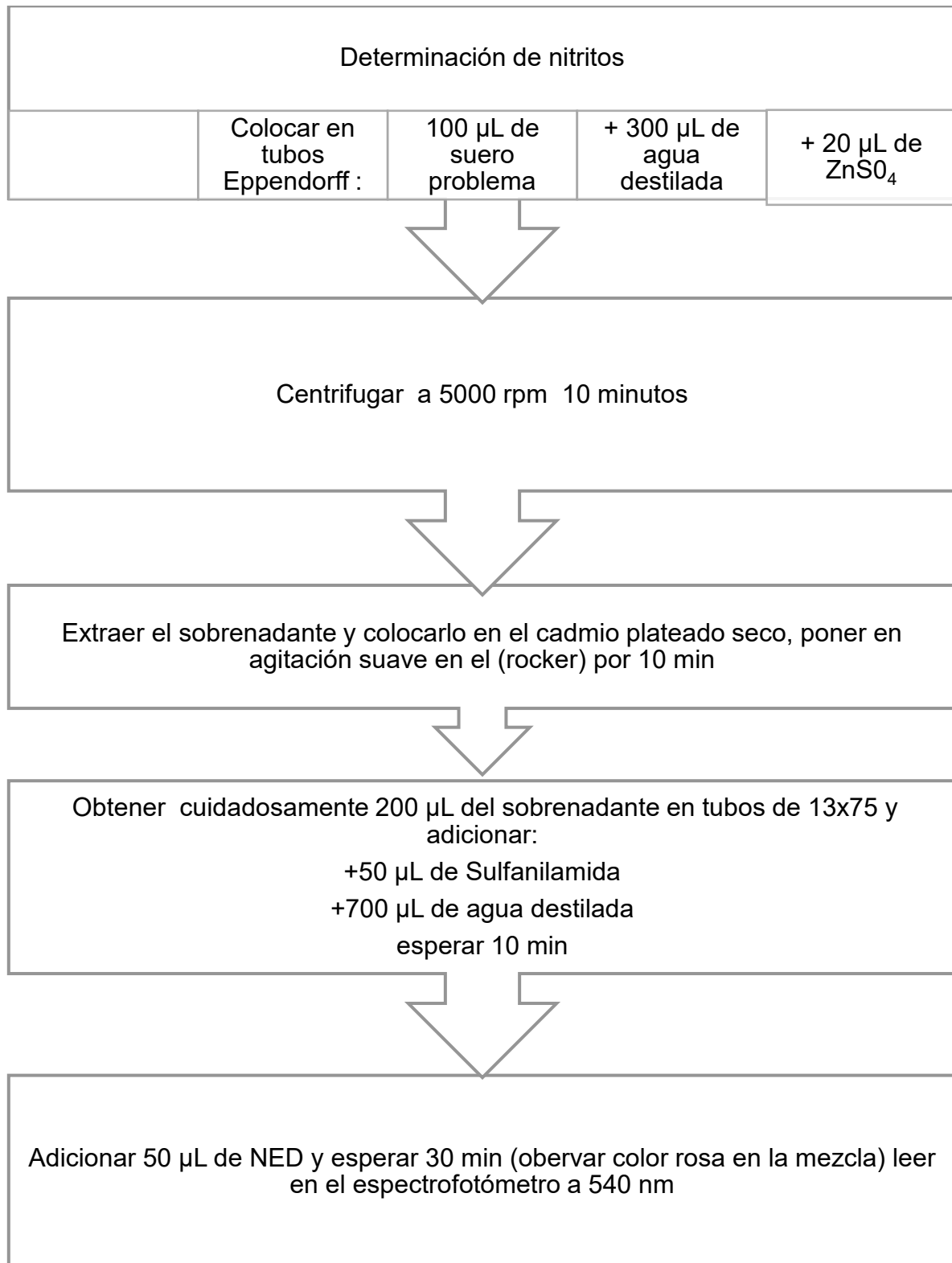
Leer a 540 nm

Factor de dilución: 20

Ensayo

A los 200 μL de sobrenadante obtenido se adicionaron 50 μL de Sulfanilamida y 700 μL de agua destilada, se dejó reposar 10 min y se agregaron 50 μL de

NED, después se deja reposar 30 min a temperatura ambiente (observar color rosa en la mezcla) y leyeron las absorbancias en el espectrofotómetro a 540 nm.



8.5 Determinación de Hidroxiprolina

Tratamiento de las muestras

Se recolectaron muestras de tejido cicatrizado de los 18 ratones que se ocuparon para el estudio, con ayuda de un sacabocados, el día que se sacrificaron y se guardaron en tubos Eppendorf hasta su uso.

Preparación de blanco.

Para la elaboración del blanco de la curva estándar de hidroxiprolina se realizó el siguiente procedimiento: Se colocaron 50 μL de agua destilada en tubos de 13x75, posteriormente se agregan 450 μL de Cloramina-T dejando oxidar por 20 minutos, se adicionaron 450 μL de ácido perclórico 3.15 M y se dejó reposar 5 minutos, cumplido el tiempo se adicionaron 500 μL de reactivo de Ehrlich incubando en baño María a 60 °C por 25 minutos, se dejó enfriar y se calibró el microespectrofotómetro a 557 nm.

Curva estándar determinación de hidroxiprolina

Para la determinación de la curva estándar de hidroxiprolina se realizó siguiendo la relación de diluciones y concentración correspondiente a la tabla n° 5.

HYP= hidroxiprolina.

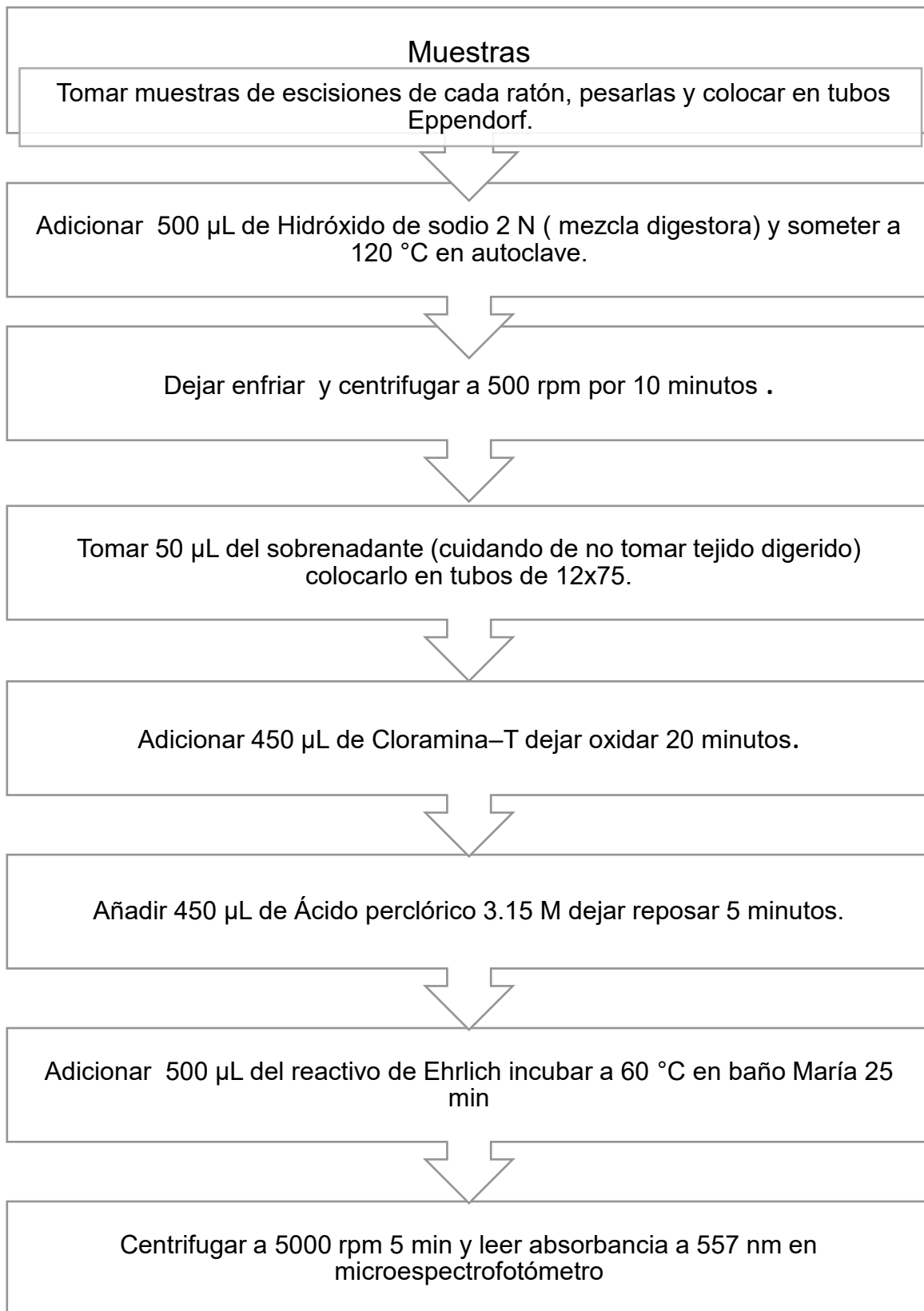
Tabla n° 5 Relación de diluciones y concentraciones de HYP

Tubo	Disolución	Concentración HYP
A	0.2 g HYP + 0.5ML HCL 0.001N	200 mg
B	250 μL de A + 250 μL de agua	100 mg
C	250 μL de B + 250 μL de agua	50 mg
D	250 μL de C + 250 μL de agua	25 mg
E	250 μL de D + 250 μL de agua	12.5 mg
F	250 μL de E + 250 μL de agua	6.25 mg
G	250 μL de F + 250 μL de agua	3.125 mg

Posteriormente se realizó el siguiente procedimiento: Se tomaron 50 μL de cada una de las diluciones preparadas en tubos de 12x75, posteriormente se adicionaron 450 μL de Cloramina-T y se dejó oxidar 20 min, cumplido el tiempo, se adicionaron 450 μL de ácido perclórico 3.15 M, se dejó reposar 5 min y se agregaron 500 μL de reactivo de Ehrlich incubando en baño María a 60 °C por 30 minutos, por último, se centrifugó por 5 minutos a 5000 rpm y se leyeron las absorbancias a 557 nm en el microespectrofotómetro.

Determinación de hidroxiprolina

El día que se ocuparon las muestras de piel cicatrizada se le adicionaron 500 μL de hidróxido de sodio 2N, se sometió a digestión en autoclave a 120 °C por 20 minutos. Una vez que las muestras fueron digeridas se centrifugaron y se tomaron 50 μL del sobrenadante de cada muestra para colocarlo en tubos de plástico limpios de 12x75, posteriormente a cada muestra se le adicionaron 450 μL de Cloramina-T y se dejó oxidar por 20 minutos a temperatura ambiente; una vez transcurrido el tiempo se agregó 450 μL de ácido perclórico 3.15M y se dejó reposar por 5 min, cumplido esto se agregó 500 μL del reactivo de Ehrlich, dicho compuesto forma un compuesto colorido, por lo que se dejó incubar en baño María a 60 °C por 30 minutos. Por último se centrifugaron los tubos y se leyeron las absorbancias del sobrenadante en el microespectrofotómetro a 557 nm.



8.6 Determinación de actividad antibacteriana

Material Biológico
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i>

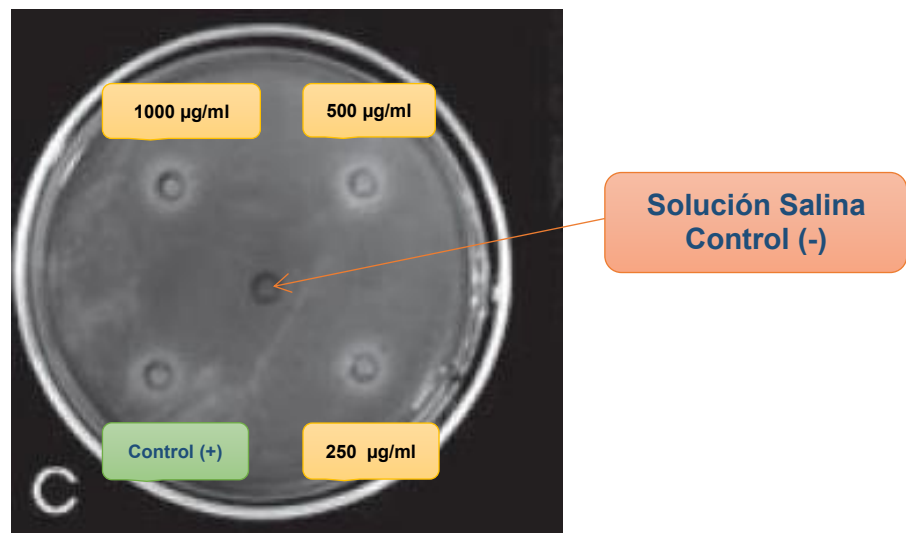
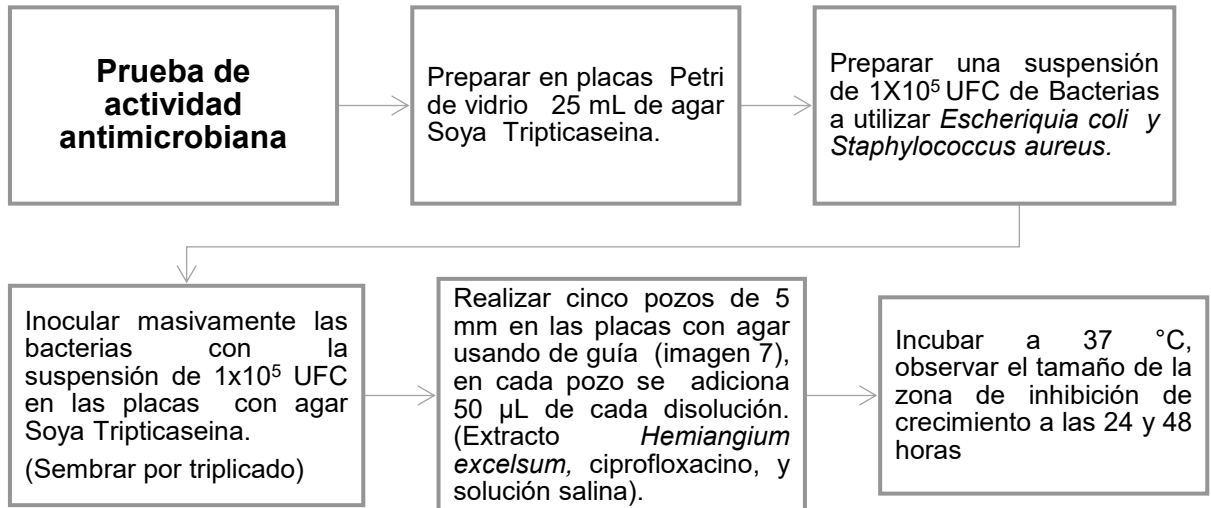


Figura n° 7 Pozos de controles en agar soya tripticaseína

8.7 Análisis estadístico

Los datos se analizaron a través de medias y desviación estándar como pruebas de comparación se usó ANOVA con un intervalo de confianza de 95%, se usó la prueba Tukey como post hoc, para tal efecto se usó el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 21.

9. Resultados

En la tabla y figura número 9.1 se muestra las medias y desviación estándar de las concentraciones de hidroxiprolina en el tejido cicatrizado de los diferentes grupos evaluados.

Se observa que no existe diferencia significativa $p= 0.224$ entre Madecassol, Vaselina y Cancerina.

Tabla 9.1 Hidroxiprolina en mg por g de tejido por grupo de estudio

Parámetros	Madecassol (+) n=6	Vaselina (-) n=6	Cancerina n=6
Hidroxiprolina (mg/g)	523.2 ± 80.270	447.3 ± 82.411	496 ± 53.284

Prueba de ANOVA de un factor (95% de confianza) con prueba de post hoc de Tukey, los valores corresponden a la media ± desviación estándar $p>0.05$.

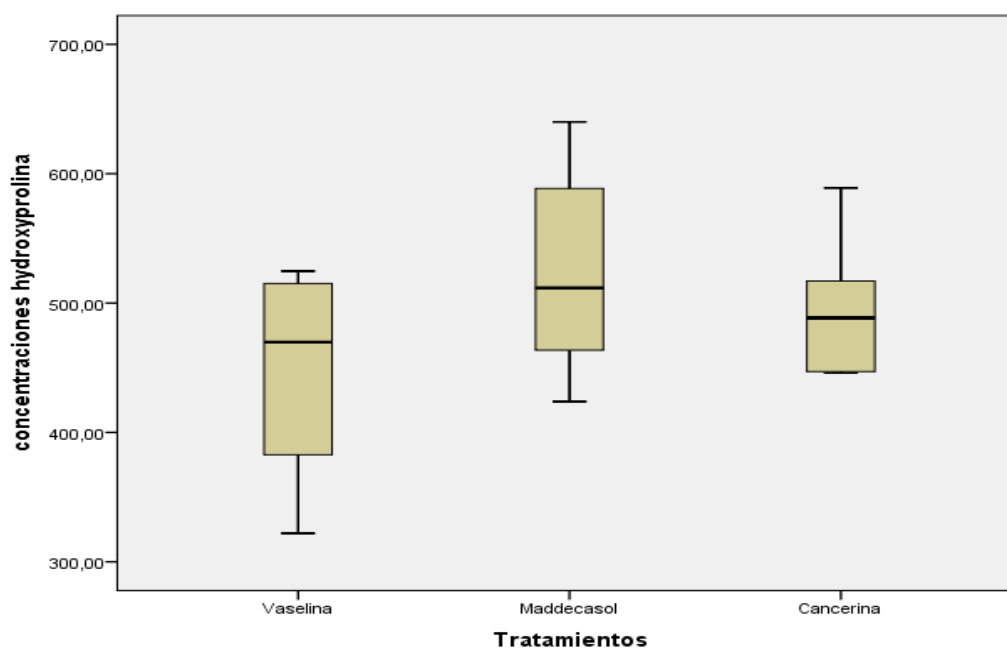


Figura 9.1 Comparación de hidroxiprolina en tres grupos

9.2 Comparación de nitritos determinados en suero (mg/mL)

En la tabla y figura número 9.2 se muestra las medias y desviación estándar de concentración de nitritos en suero.

Existen diferencias significativas $p= 0.029$ en el control positivo (Madecassol) siendo más eficiente que vaselina y cancerina.

Tabla 9.2 Nitritos en mg por dL de suero por grupo			
Parámetros	Madecasssol (+) n=6	Vaselina (-) n=6	Cancerina n=6
Nitritos (mg/dL)	6.2283 ± 1.794	4.6450 ± 0.649	4.2340 ± 0.500

Prueba de ANOVA de un factor (90% de confianza) con prueba post hoc de Tukey, los valores corresponden a la media ± desviación estándar, $p<0.05$.

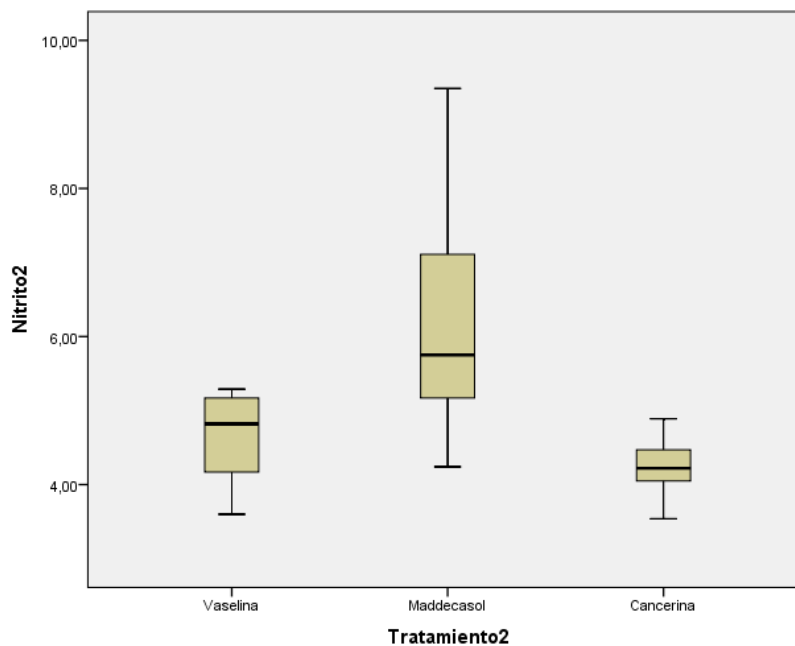


Figura 9. 2 Comparación de nitritos en tres tratamientos

9.3 Comparación de diámetros de las lesiones

En los primeros 8 días de tratamiento no se presentaron diferencia significativa con una $p\geq 0.05$ en las medias de los diámetros de las heridas, en la tabla número 9.3 y figura 9.3 se muestra el diametro de las lesiones por grupo medido en los dias 9, 10, y 11 del tratamiento, ya que hasta estos dias se presentaron diferencia

significativas, en el día 9 hay diferencia significativa, $p=0.001$, las heridas donde se aplicó madecassol fueron de menor tamaño, por lo que cancerina y vaselina son iguales en el tamaño de diámetro de las heridas, en el día 10 existe diferencias significativas $p=0.005$ en los tratamientos, siendo madecassol el tratamiento que tiene menores diámetros en las heridas y cancerina, vaselina se comportan igual en el tamaño de diámetro de la herida, en el día 11 existen diferencias significativas $p=0.005$, en los grupos tratados con madecassol y cancerina hubo reducción de tamaño del diámetro de las heridas en comparación con vaselina.

Tabla 9.3 Tamaño de diámetro (mm) en la lesión

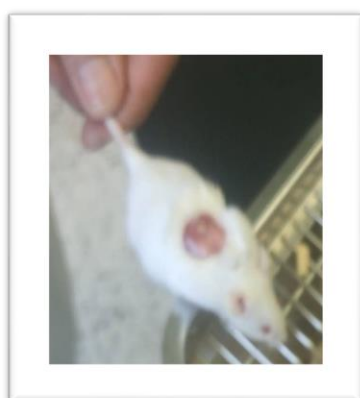
Día	Madecassol (+) n=6	Vaselina (-) n=6	Cancerina n=6
Día 9	6.7 ± 0.133*	9.9 ± 0.120	7.3 ± 0.108
Día 10	4.5 ± 0.137*	6.2 ± 0.041	6.5 ± 0.083
Día 11	3.5 ± 0.126**	5.9 ± 0.073	4.0 ± 0.130**

Prueba ANOVA de un factor (95% de confianza), los valores corresponden a la media ± desviación estandar.

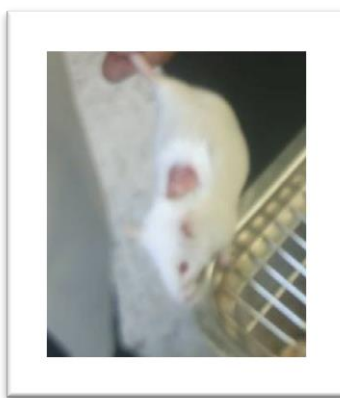
La diferencia de medias es significativa * $p < 0.05$ Madecassol Vs Vaselina Cancerina

** $p < 0.05$ Madecassol, Cancerina Vs Vaselina

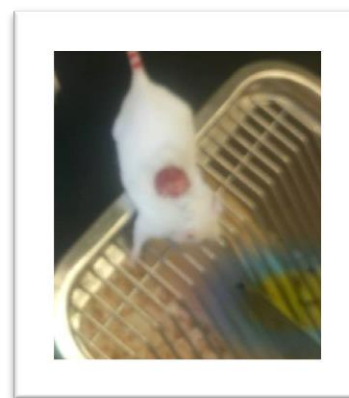
Día 1. Inicio de tratamiento



Madecassol

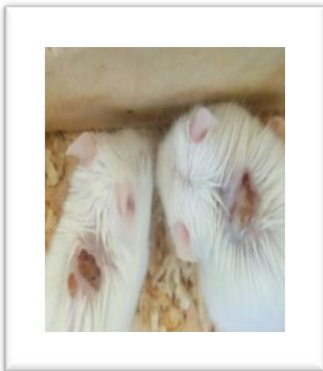


Cancerina

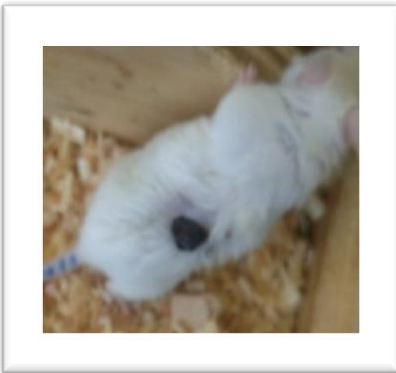


Vaselina

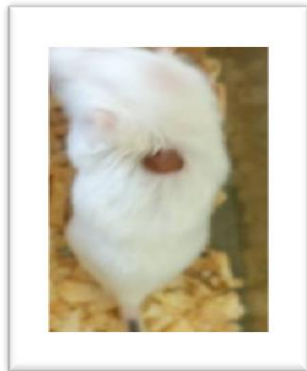
Día 8.



Madecassol

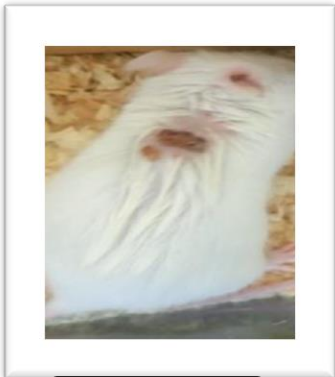


Cancerina

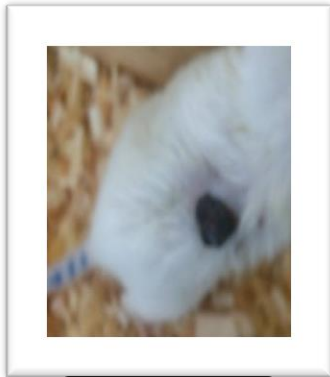


Vaselina

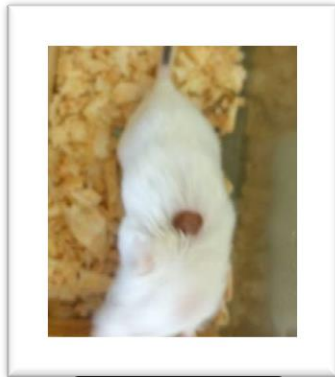
Dia 9



Madecassol

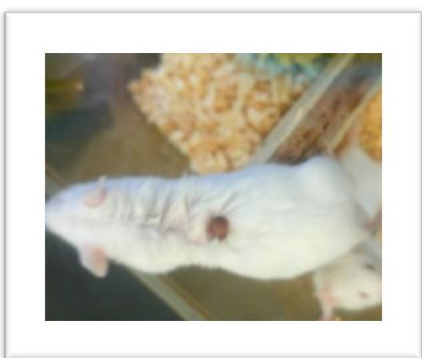


Cancerina

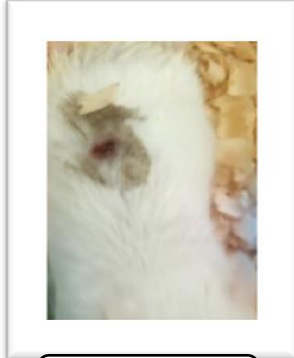


Vaselina

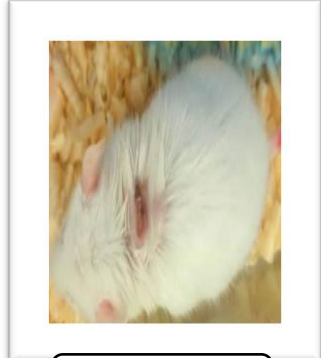
Dia 10



Madecassol



Cancerina



Vaselina

Día 11

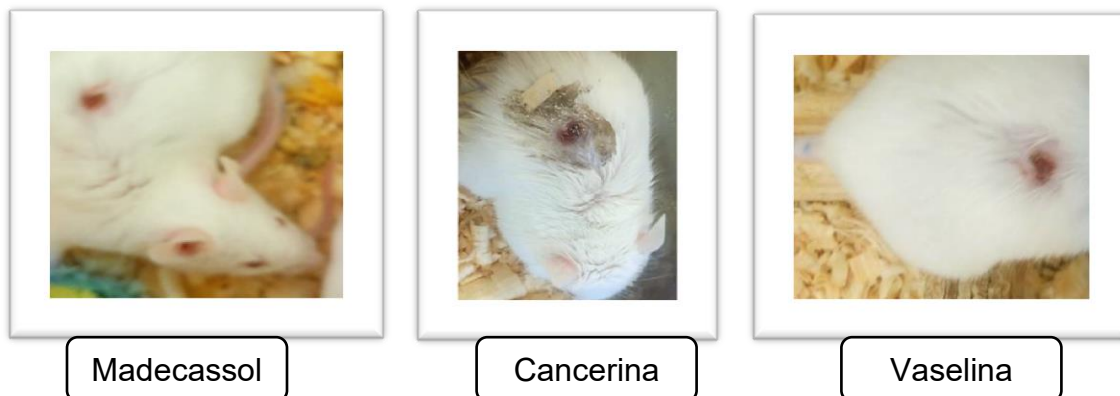


Figura 9.3 tamaño de diámetro en las lesiones de los diferentes tratamientos.

9.4 Determinación de actividad antimicrobiana

Se observó que el extracto acuoso de cancerina no tiene actividad antibacteriana, en la figura 9.4.1, la cepa de *S. aureus*, presenta crecimiento alrededor de los pozos en las diferentes concentraciones (125, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$) del extracto y control negativo (solución salina) en comparación del control positivo (ciprofloxacino), el cual presenta un halo de inhibición alrededor del pozo.

Por otro lado en la figura 9.4.2, la cepa *E. Coli* presenta crecimiento alrededor de los pozos en las diferentes concentraciones (125, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$) del extracto y control negativo (solución salina, y un halo de inhibición en el control positivo (ciprofloxacino), por lo cual el extracto acuoso no presenta actividad antimicrobiana.

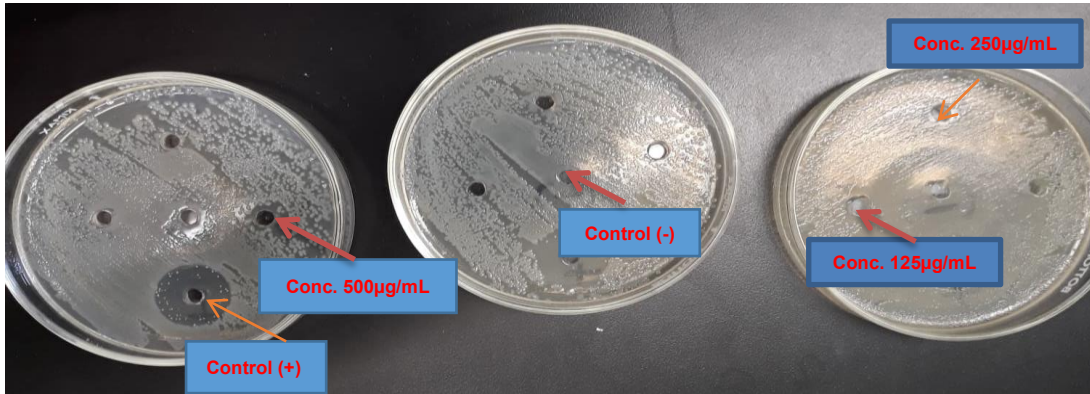


Figura número 9.4.1 Placas de agar Soya Tripticaseína inoculadas con *S. aureus*.

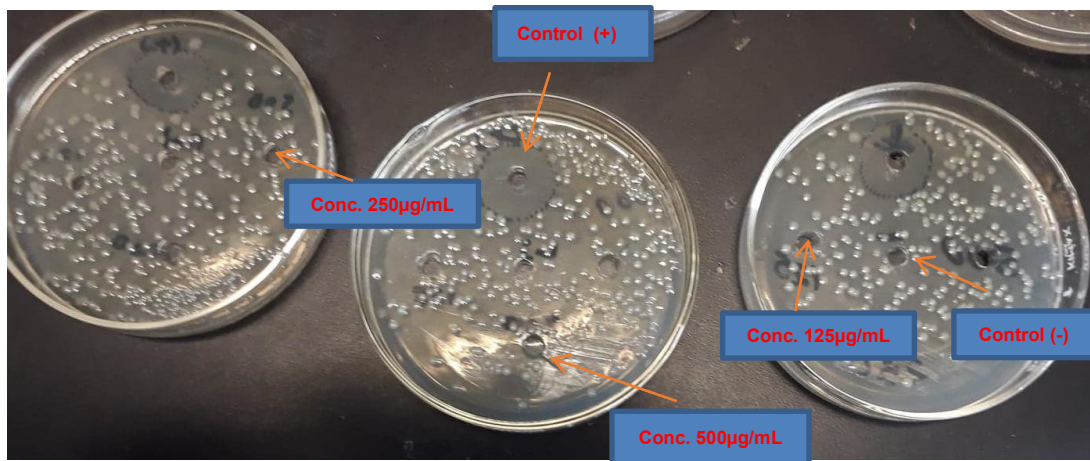


Figura numero 9.4.2 Placas de agar Soya Tripticaseína inoculadas con *E. Coli*.

10. Análisis de resultados

La hidroxiprolina es un aminoácido que se encuentra principalmente en el colágeno, proteína de la trama ósea, del tejido conjuntivo y de la piel. Junto con la prolina, su precursor, representan del 25% al 30% de los ácidos aminados totales que forman el colágeno.^{24, 26} El colágeno es la proteína más abundante del cuerpo humano, se ha descrito como factor de reparación de la epidermis, en particular como agente cicatrizante y está presente como agente que mejora el aspecto de la piel humana.

En este sentido, en nuestros resultados respecto a la concentración de hidroxiprolina, en los tres grupos no hay una diferencia significativa, ya que todos los tratamientos se parecen, aunque se esperaba que en el control positivo

(madecassol) existiera una mayor concentración de hidroxiprolina ya que este medicamento tiene una eficacia comprobada, la cual como marca la literatura ayuda a la regeneración uniforme de la piel por medio de un aumento en la síntesis de colágeno, esta proteína que es rica en aminoácidos como la hidroxiprolina, la cual proporciona átomos adicionales, capaces de formar puentes de hidrógeno que estabilizan la triple hélice del colágeno, que en cantidades insuficientes de hidroxiprolina pierde estabilidad térmica, resultando menos estable, y presentando manifestaciones clínicas evidentes, como fragilidad capilar elevada, teniendo como resultado hemorragias y cicatrización ineficiente de la piel, también se observó que la vaselina tuvo un comportamiento similar a los otros grupos, y se esperaba que no tuviera efecto cicatrizante.

Correspondiente en la cuantificación de nitritos, se ha señalado que tienen un papel importante en el cuerpo, actúan como neurotransmisor en el cerebro, regulador cardiovascular y ayuda en las defensas, que lo emplean para destruir microorganismos utilizando los nitritos para atacar ADN, proteínas y componentes de la pared celular, en nuestros resultados se puede observar que en los ratones tratados con madecassol, hubo mayores niveles de nitritos en el suero de los ratones, con una $p < 0.05$, lo cual muestra que este tratamiento es más eficiente ya que se ha señalado que, este metabolito ayuda a la eliminación de diferentes microorganismos y regeneración de la piel, siendo precursor del ácido nítrico, además se notó que el tratamiento de cancerina presentaba niveles iguales a los del control negativo (vaselina), por lo cual no hay una mejora durante el proceso de cicatrización por esta vía, ya que carece del aumento en la producción de ácido nítrico.³⁶

Respecto a los diámetros de las heridas de los diferentes grupos de ratones tratados, en donde se observa que en los primeros días de tratamiento no hubo diferencias significativas, es decir que en las heridas no existe diferencia alguna, en el proceso de cicatrización por lo tanto no hay una disminución del tamaño de la herida al aplicar los diferentes tratamientos, sin embargo se puede observar que en el tratamiento a base del extracto acuoso al 4% de cancerina, las heridas producidas se visualizan secas a comparación de los controles (madecassol,

vaselina), y que como es marcado en las diferentes referencias en los primeros seis días de ocurrir una lesión profunda, se forma un coágulo para tapar la herida, seguido de una migración de diferentes células sanguíneas las cuales ayudan a la eliminación de diferentes microorganismos, e inflamación, y se segregan algunas sustancias químicas que ayudan a la regeneración de la piel, posteriormente al noveno día de tratamiento se puede notar una diferencia significativa en el diámetro de las heridas en los tratamientos, siendo significativamente menor el de madecassol Vs Cancerina, Vaselina, en el décimo día se puede observar el mismo efecto, mientras que en el día once se puede notar que en algunos ratones se le cae la costra, lo cual indica que hay una contracción de la piel lesionada durante regeneración, así como diferencias significativa en las medias de los diámetros de las heridas de madecassol y cancerina, las cuales son significativamente menores que las tratadas con vaselina lo que sugiere que madecassol y cancerina son los tratamientos más eficientes en la regeneración de la piel dañada, y como es señalado en las referencias el madecassol es un medicamento de origen vegetal el cual ayuda a la formación de nuevo colágeno y proliferación de fibroblastos para una mejor cicatrización, la cancerina se comportó de manera similar al madecassol, notándose una mejoría en la reparación de la lesión, correspondiente con el tratamiento de vaselina se presenta una mejoría en la regeneración de la piel, aunque se esperaba que no presentara, ya que en la industria farmacéutica es utilizada como vehículo protector de la piel en diferentes productos.^{32, 33}

Correspondiente a la actividad antimicrobiana el extracto acuoso no presenta dicha propiedad en las diferentes concentraciones, ya que no inhibió el crecimiento de las cepas evaluada, se esperaba que presentara una inhibición ya que en algunos estudios fitoquímicos de la corteza, se determinó que tenía sesquiterpenos los cuales ayudan a limitar la dispersión del patógeno, no obstante de acuerdo a lo obtenido el extracto no presenta actividad antimicrobiana.¹⁴

11. Conclusión.

El extracto acuoso de *Hemiangum excelsum* al 4% carece de actividad cicatrizante en un modelo de ratones CD1. Tampoco presenta actividad antimicrobiana a las concentraciones evaluadas (150, 250, 500 µL) en cultivos microbiológicos.

- Respecto a la concentración de hidroxiprolina en el tejido cicatrizado de los ratones no muestra diferencia significativa, en ninguno de los tres tratamientos hay un aumento en la producción de colágeno, indicando que la planta no cuenta con actividad cicatrizante.

- En relación al segundo objetivo donde se cuantifico nitritos, los resultados indican que el tratamiento con madecassol presento niveles elevados del metabolito (6.22) lo que favorece la regeneración del tejido; los valores de los tratamientos con cancerina y con vaselina no presentan incremento significativo.

-Se compararon los diámetros de las lesiones, en los primeros ocho días de medición no se presenta diferencias significativas en el tamaño de la herida, al final del estudio se observó que los tratamientos con cancerina y madecassol presentan tamaños de herida más pequeños que con vaselina.

- En la evaluación de efecto antimicrobiano se observaron crecimiento alrededor de los pozos en las diferentes concentraciones del extracto lo cual nos indica que a estas concentraciones no hay efecto antimicrobiano.

12. Propuestas

- Evaluar el efecto cicatrizante de *Hemiangium excelsum* a concentración superior al 4%.
- Evaluar el efecto antimicrobiano de *Hemiangium excelsum* a concentraciones superiores a 150, 250, 500 μL .
- Realizar cortes histológicos de las heridas, para verificar los cambios morfológicos en los tejidos.

13. Referencias

1. Rodríguez I, Sampedro L, Rosas L, Meneses A. Cuidado de la biodiversidad y uso de plantas medicinales en indígenas migrantes del municipio de Acapulco, Guerrero. *Redalyc* 2009; <http://www.redalyc.org/html/2631/263139243055/> (Último acceso 20 de mayo de 2018).
2. Valdez B. En 2013, 75 mil amputaciones por pie diabético en México. *Milenio* 8 de enero 2014. <http://www.milenio.com/cultura/2013-75-mil-amputaciones-pie-diabetico-mexico> (Último acceso 20 de mayo 2018).
3. Muñeton P. Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. *Revista Digital Universitaria* 2009; 10(9). <http://www.revista.unam.mx/vol.10/num9/art58/int58.htm> (Último acceso 21 de mayo 2018).
4. Morón F, Jardines J. La medicina tradicional en las universidades médicas. *Revista cubana de Plantas Medicinales*. Enero 1997; 2(1) http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47961997000100008&script=sci_arttext&lng=pt (Último acceso 23 de mayo 2018).
5. OMS. Medicina tradicional, Medicamentos Esenciales y Política Farmacéutica (EDM) [Internet] [consultado 23 de Mayo 2018]. Disponible en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/
6. Cabrera L, Herrera A, Martínez M. Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana [Internet] Vol. VI1903. Vol. IX 1907. México UNAM (Último acceso 24 de mayo 2018).

7. OMS. Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales [Internet] [Consultado 4 de mayo 2018]. Disponible en:<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>

8. Revista Cofepris Protección y salud. *Uso de productos Herbolarios en México* 2016. Cofepris; <http://revistacofepris.salud.gob.mx/inter/2016/1/bienestar.html>. (Último acceso 23 de mayo 2018).

9. Diario Oficial de la Federación 4 de febrero de 1998. Reglamento de insumos de la salud. Remedios Herbolarios. artículo 88. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/ris.html> (Último acceso 23 de mayo 2018).

10. Villa M, Barajas J. *Estudio Anatómico De HIPPOCRATEA Hipocratea Excelsa HBK. Redalyc 1998: 43 (7)*. <http://www.redalyc.org/pdf/574/57404302.pdf>. (Último acceso 24 de mayo 2018).

11. Castillo Campos G, Medina Abreo M. HIPPOCRATEACEAE. *Flora de Veracruz* 2005: (137). <http://www1.inacol.edu.mx/publicaciones/resumenes/FLOWER/137-Castillo.pdf>. (Último acceso 24 de mayo 2018).

12. Berdonces J. *Gran Enciclopedia De Las Plantas Medicinales*. México: Océano:2007

13. IPN. Características generales de *Hemiangiun Excelsum*. SAPPI. http://sappi.ipn.mx/cgpi/archivos_anexo/20082748_6675.pdf. (Último acceso 24 de mayo 2018.)

14. UNAM. *Biblioteca digital de la medicina tradicional*.
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=cancerina&id=7327>(Último acceso 25 de mayo de 2018).
15. Kelley W. *Medicina Interna* 2^a ed. Argentina. Medica Panamericana 1992.
16. Universidad de Cantabria *Fisiología General*. Open course ware.
<https://ocw.unican.es/pluginfile.php/879/course/section/967/Tema%252011-Bloque%2520II-La%2520Piel.%2520Estructura%2520y%2520Funciones.pdf>
(Último acceso 26 de mayo 2018).
17. Frederik M. *Enfermedades de la piel*. Nueva Delhi. Jain Publisher 2005.
18. Wolff K, Goldsmith L, Katz S, Gilchrest B, Paller A and Leffell D.
Dermatología En Medicina General. 7^a ed. México. Medica Panamericana.
19. Kotcher J. *Instrumentación Quirúrgica*. 4^a ed. México. Medica Panamericana
20. Eriksen M, De Lara S, Álvarez A, Galarza G. *Anatomía Humana*. 2^a ed. México. UNAM 2002.
21. Pires M, Brizuela A, Lara A, Sáenz A, *Dermatol Venez* 2011 .49 (3).
<http://svderma.org/revista/index.php/ojs/article/viewFile/2/2>. (Último acceso 27 de mayo).
22. Daza J. *Evaluación Clínico – Funcional del Movimiento Corporal Humano*. Colombia. Medica Panamericana 2007.
23. Kenneth S. *Anatomía y Fisiología: La unidad entre forma y función*. 6^a Ed. México: Mc Graw Hill 2013.

24. *Castelo C. Enevejecimiento de la piel y las mucosas*. Madrid Medica panamericana. 2005.
25. *Romero. A. Atención Higiénica*. Madrid Editex: 2014.
26. *ETAT Pur. Hidroxiprolina*. <http://www.etatpur.es/index.php/hidroxiprolina-ficha-produce>.(ultimo acceso 5 de junio 2018).
27. *Garcia M. Martinez F. Silva L. Auxiliar De Enfermeria De La Comunidad Autonoma De extremadura*. Madrid editorial Mad. 2006.
28. *Valencia C. Cicatrización: Proceso de reparación tisular. Aproximaciones terapéuticas*. Investigaciones andinas Redalyc. 2010: 20(10).
29. *Oltra E, González C, Sánchez P. Suturas y Cirugía Menor Para Profesionales De Enfermería* 2ª ed. Bueno Aires: Médica Panamericana Argentina 2006.
30. *Méndez C, Hernán C. Patología Humana Básica Aplicada a la Rehabilitación*. Centro editorial Universidad de Rosario Colombia 2002.
31. *Tortora G, Derrickson B. Principios de Anatomía y Fisiología*. 11ª ed. México: Medica Panamericana, 2013.
32. *Duce A. Patología quirúrgica*. Madrid: España 2002.
33. *16- Arias J, Aller M. A, Arias J, Lorente L. Fisiopatología Quirúrgica*. España: Tébar. 1999
34. *Rodríguez J. Noguerales F. Patología Quirúrgica General*. Madrid Editorial Universitaria Ramón Areces. 2012.

35. Patiño F. Lesiones de Cirugía. 7^a ed. Colombia: Médica panamericana., 2000.
36. Atuesta J. Óxido nítrico y biología cutánea revista médica colombiana. Vol. 26 (4) [Consultada: 4 de Junio 2018] disponible en: <http://ceupromed.ucol.mx/morfo/articulos/articulos/oxidonitricoybiologiacutan ea.pdf>
37. Pamplona R. *Salud por las plantas medicinales*. Madrid: Safeliz: España: 2006
38. Kovacs H, Preuk M. *Cuida tu piel*. Buenos Aires: Robin book: Argentina: 1999.
39. OCW. UPM. Los Principios Activos de las Plantas Medicinales. Universidad Pltécnica de Madrid. <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema6.pdf>. (último acceso 10 de junio 2018).
40. Muñoz F. *Plantas Medicinales y Aromáticas*. Mundi Prensa. Barcelona: 2002.
41. F. Woesner. The determination of hydroxyproline in tissue and Protein Samples containing small proportions of this inmino Acid. Archives Biochemistri and Biophysic. 1961

14. Anexos

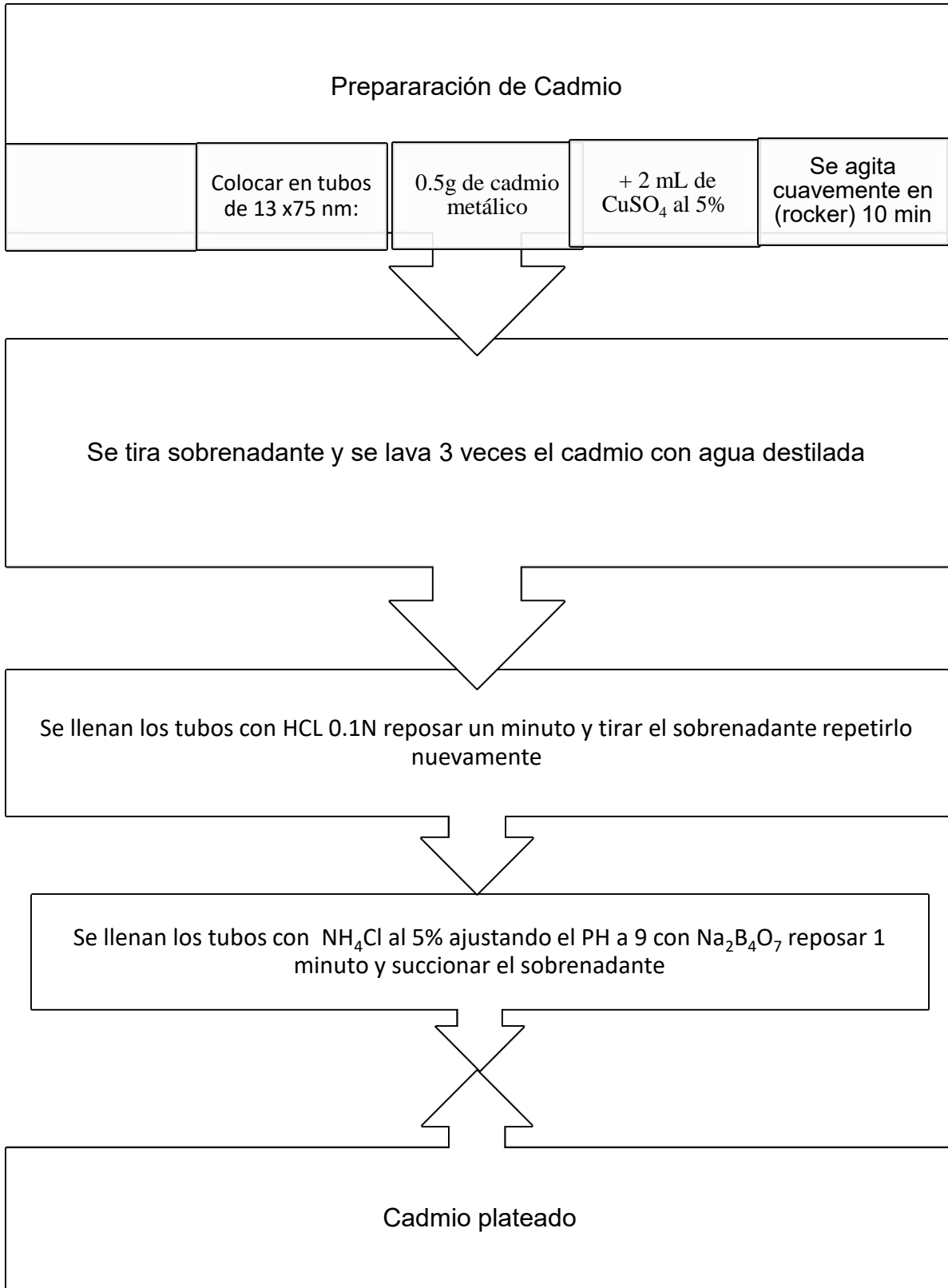
Anexo I Preparación de reactivos para determinación de nitritos

❖ Sulfanilamida

Disolver 0.5 g de sulfanilamida en 150 mL de ácido acético al 15% guardarlo en frasco ámbar.

❖ NED

Disolver 0.2 g de N-(1-naftil)-etilendiamino diclorohidrato en 150 mL de ácido acético al 15% V/V guardarlo en frasco ámbar.



Anexo II Preparación de reactivos para determinación de hidroxiprolina

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 el pH a 6.5 y se aforo el volumen a 1L de agua destilada.

Ácido perclórico

Para preparar una solución a 3.15 M, se diluyeron 27 mL de ácido perclórico al 70% en 100 mL de agua destilada.

Reactivo de Ehrlich

Una solución al 20% se preparó poco días antes de su uso, se pesaron 20 g de p-dimetilaminobenzaldehido y 100 mL de Metilcelsolve (metoxietanol), se colocó la solución en un baño María a 60 °C para disolver el polvo.

Cloramina- T

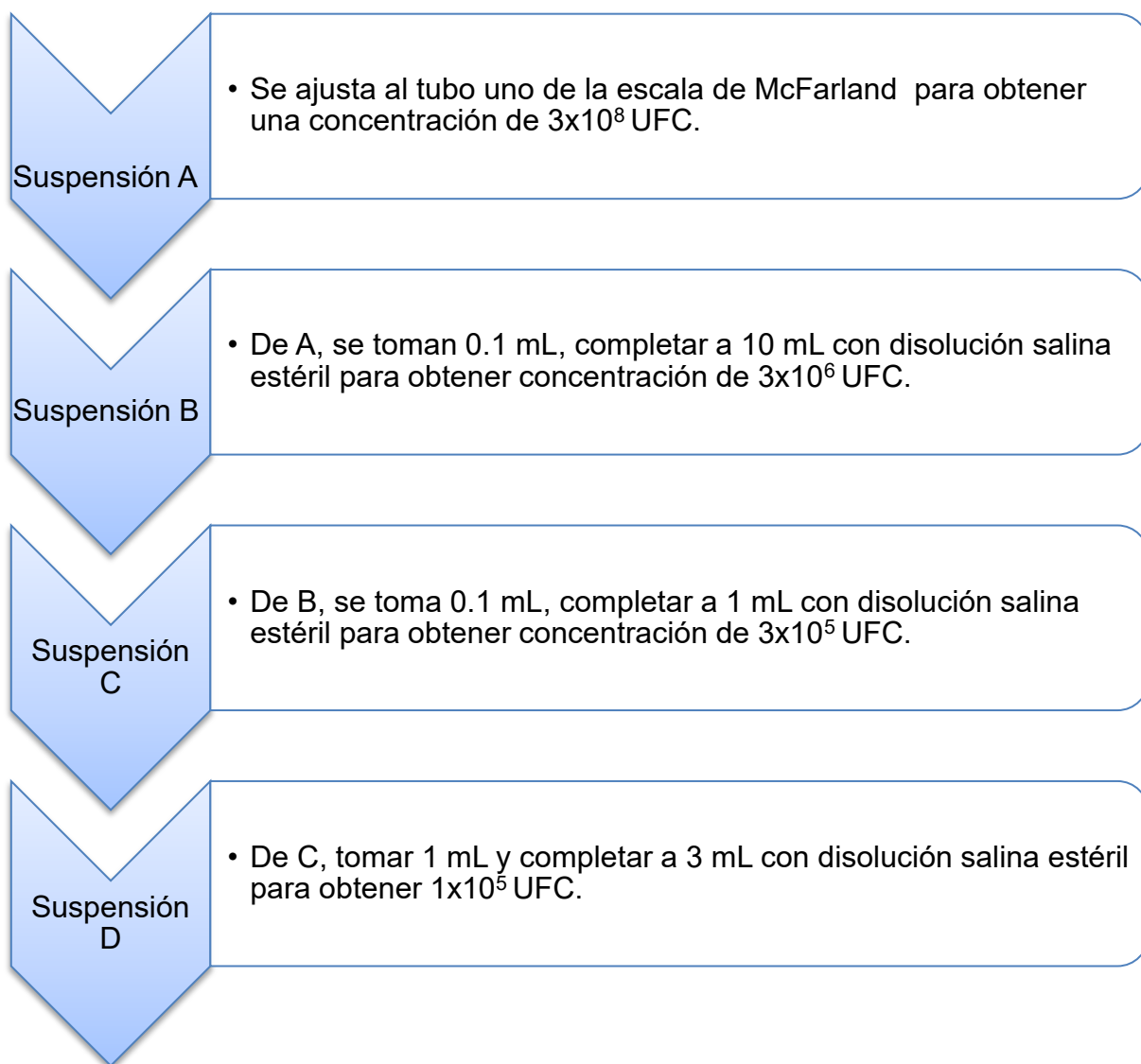
La solución fue preparada poco días antes de su uso, se disolvieron 0.2 g de Cloramina-T en 20 mL de agua destilada; posteriormente se añadieron 30 mL de metoxietanol y 50 mL de Buffer a pH 6.5.

Solución estándar de Hidroxiprolina

La solución estándar se preparó pesando 0.2 g de hidroxiprolina estándar los cuales se diluyeron en 0.5 mL de HCL 0.001N La solución se colocó en baño María a 60 °C para disolver el polvo.

Anexo III Preparación de reactivos determinación de actividad antimicrobiana

Preparación de suspensión de bacterias 1×10^5



Anexo IV. Preparación de Ciprofloxacino

Se preparó una disolución de 20 mg /10 mL de ciprofloxacino (100 µg/50 µL) como control positivo y como control negativo solución salina isotónica.