



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**“Caracterización química y actividad cicatrizante del aceite esencial de
Bursera morelensis Ramírez”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

M. en C. JUDITH SALAS OROPEZA

DIRECTORA DE TESIS

**DRA. MARÍA MARGARITA CANALES MARTÍNEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

COMITÉ TUTOR

DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

INSTITUTO DE QUÍMICA UNAM

DR. ARMANDO PÉREZ TORRES

FACULTAD DE MEDICINA UNAM

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2020



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.

AGRADECIMIENTOS

- Al Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México; por mi formación doctoral.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado (CVU: 347857; becario: 239888).
- A la Universidad Nacional Autónoma de México por los apoyos económicos que financiaron el proyecto de investigación de mis estudios de doctorado (UNAM PAPIIT: IN205020, IN210918).

Al Comité Tutor:

- Dra. María Margarita Canales Martínez
 - Dr. Manuel Jiménez Estrada
 - Dr. Armando Pérez Torres

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

- A Dios por todo.
- A mis padres, Octavio y Victoria, por ser mi apoyo incondicional y mi ejemplo a seguir en la vida.
- A mi esposo, Rodolfo, por ser mi compañero de vida, por todo tu amor, apoyo y ayuda, por trabajar a mi lado en todos nuestros proyectos profesionales y personales.
- A mi tutora, Doctora Margarita Canales Martínez, por todo su apoyo y confianza, por compartir de forma tan generosa sus conocimientos y recursos. Gracias por enseñarme con su ejemplo, que, para ser un buen investigador, primero se tiene que ser una buena persona.
- Al Doctor Armando Pérez Torres, por su enorme disposición para el trabajo, por todas sus enseñanzas. Por ser siempre amable y por su buen humor.
- Al Doctor Manuel Jiménez Estrada, por todas sus observaciones y consejos.
- Al Doctor Andrés Castell Rodríguez, por todo el apoyo, los consejos y enseñanzas. Por su calidez, cordialidad y sus modos siempre cariñosos.
- Al Doctor Marco Aurelio Rodríguez Monroy, por todo su apoyo, ayuda, consejos y enseñanzas.
- A la M. en C. Evelin Pulido Camarillo, por ser una magnífica compañera y maestra, porque además de ser excelente como profesional, eres excelente persona.
- A todos los compañeros de los laboratorios de Farmacognosia, Inmunología, Filogenia de Sistema Inmune de Piel y Mucosas y el laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos; por ser siempre un equipo cordial y amistoso.

CONTENIDO

CONTENIDO	4
ÍNDICE DE FIGURAS	6
Abreviaturas	7
1.0 RESUMEN	8
1.1 ABSTRACT	9
2.0 INTRODUCCIÓN	10
3.0 Antecedentes	11
3.1 Medicina Tradicional en México	11
3.2 Aceites Esenciales	14
3.3 <i>Bursera morelensis</i>	15
3.4 Piel	17
3.5 Cicatrización	19
4.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
5.0 HIPÓTESIS	21
6.0 OBJETIVOS	21
6.1 Objetivo General	21
6.2 Objetivos Particulares	21
7.0 MATERIALES Y MÉTODOS	22
7.1 Obtención y caracterización del AE de <i>B. morelensis</i> .	22
7.1.1 Área de recolecta	22
7.1.2 Material Vegetal	22
7.1.3 Extracción del aceite esencial	23
7.1.4 Caracterización química	23
7.2 Actividad cicatrizante	24
7.2.1 Animales	24
7.2.2 Citotoxicidad	24
7.2.3 Prueba de irritación de piel	25
7.2.4 Eficacia cicatrizante, método tensiométrico.	25
7.2.5 Modelo de herida por incisión (MHI)	26
7.3 Histología	27
7.3.1 Obtención y preparación de muestras	27
7.3.2 Tinción Hematoxilina – Eosina	27

7.3.3 Tinción tricrómica de Masson	27
7.4 Análisis <i>in vitro</i> con fibroblastos	28
7.4.1 Aislamiento de fibroblastos de piel.	28
7.4.2 Cultivo de fibroblastos en andamios de hidrogeles de fibrina (AHF).	28
7.4.3 Viabilidad celular (Vida/muerte)	28
7.4.4 Proliferación celular	29
7.4.5 Migración celular	30
7.5 Análisis estadístico	30
8.0 RESULTADOS	31
8.1 Caracterización química del AE de <i>B. morelensis</i>	31
8.2 Citotoxicidad y prueba de irritación.	32
8.3 Actividad cicatrizante	35
8.4 Pruebas <i>in vitro</i> con fibroblastos	43
9.0 DISCUSIÓN	52
10.0 CONCLUSIONES	58
11.0 REFERENCIAS	58
APÉNDICE I. Estudios referentes a actividades biológicas del género <i>Bursera</i>	71
APÉNDICE II. Comparación de índices de Kovats	72
APÉNDICE III. Control positivo	73
APÉNDICE IV. Método tensiométrico (modificado de Salas et al., 1994).	73
APÉNDICE V. Isoflurano	74
APÉNDICE VI. Técnica histológica.	75
APÉNDICE VII. Artículo de investigación derivado de los estudios de doctorado.	75
APÉNDICE VIII. Artículo de investigación publicado durante los estudios de doctorado (coautor).	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Resumen del proceso de cicatrización.	20
Figura 2	Mapa de la ubicación geográfica de la región Cañada en el estado de Oaxaca, México.	22
Figura 3	Cromatograma obtenido del AE de <i>B. morelensis</i>	31
Figura 4	Citotoxicidad del aceite de <i>B. morelensis</i> en comparación con la citotoxicidad de la doxorubicina.	33
Figura 5.	Apariencia de la piel en prueba preliminar de irritación.	34
Figura 6.	Histología de piel en tratamientos de prueba de irritación por 3 días.	35
Figura 7	Apariencia de las heridas en el primer y último día de tratamiento de la prueba de eficacia de cicatrización (EC).	36
Figura 8	Gráfica de eficacia de cicatrizante (EC).	37
Figura 9.	Gráfica de la velocidad de cierre de herida.	38
Figura 10.	Gráfica de la contracción de herida (CH).	39
Figura 11	Apariencia de las heridas en el primer, tercero, quinto y último día de tratamiento de la prueba de contracción de herida (CH).	41
Figura 12.	Histología de muestras de piel en el día 10 de tratamiento de la prueba de contracción e herida.	42
Figura 13.	Histología de muestras de piel en el día 3 de tratamiento e la prueba de contracción e herida.	43
Figura 14.	Ensayo de viabilidad celular de fibroblastos cultivados en monocapa.	44
Figura 15.	Ensayo de viabilidad celular de cultivos de fibroblastos en andamios de hidrogel de fibrina (AHF)	45
Figura 16.	Ensayo de proliferación celular en andamios de hidrogel de fibrina (AHF).	46
Figura 17.	Ensayo de proliferación celular de cultivos de fibroblastos tratados con diferentes concentraciones de AE en monocapa	47
Figura 18.	Ensayo de proliferación celular de cultivos de fibroblastos tratados con diferentes concentraciones de PIN y FEL	48
Figura 19.	Ensayo de migración celular, cultivos de fibroblastos en monocapa tratados con AE.	49
Figura 20.	Ensayo de migración en cultivos en monocapa de fibroblastos teñidos con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE).	50
Figura 21.	Modelo de migración en AHF y fibroblastos teñidos con (CFSE).	51
Figura 22.	Diagrama de dispositivo para efectuar el método tensiométrico.	74

Abreviaturas

AE: Aceite esencial.

CG: Cromatografía de gases.

SIS: Sistema inmune cutáneo (por sus siglas en inglés) Skin immune system.

EC: Eficacia cicatrizante.

CH: Contracción de herida.

CANT: Control de absorción no tratada.

PSH: Piel sin herida.

C-: Heridas no tratada como control negativo.

C+: Heridas tratadas con Recoverón NC, como control positivo.

AM: Aceite mineral (Vehículo).

AE25: Aceite esencial al 25%.

AE10: Aceite esencial al 10%.

PIN: α -pineno al 9%.

FEL: α -felandreno al 1%.

FPH: Fibroblastos de piel humana.

AHF: Andamios de hidrogel de fibrina.

CMC: Cultivos en monocapa.

1.0 RESUMEN

Bursera morelensis se usa en la medicina tradicional mexicana para tratar heridas en la piel. Es un árbol endémico conocido como "aceitillo", se ha verificado la actividad antibacteriana y antifúngica de su aceite esencial (AE); también actúa como un antiinflamatorio. Todas estas actividades biológicas hacen que el AE de *B. morelensis* sea un candidato para acelerar el proceso de curación de heridas. El objetivo del presente trabajo fue determinar las propiedades de curación de heridas del AE de *B. morelensis* en modelos *in vitro* e *in vivo*. El AE se obtuvo por hidrodestilación, con un rendimiento del 0.19%. El análisis químico se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS); encontrando 18 compuestos de tipo terpenoide, de los cuales los más abundantes fueron: *p*-mentano (38.41%), β -felandreno (35.25%); α -pineno (8.37%), cariofileno (5.19%), β -mirceno (3.6%), sabineno (3.54%) y *p*-cimeno (2.1%). Previo a las pruebas *in vivo*, se verificó la actividad citotóxica del AE, en macrófagos peritoneales de ratones BALB/C; y se realizó una prueba preliminar de irritación; encontrando una baja citotoxicidad y baja irritación, demostrando que el AE es seguro para pruebas en animales. En el modelo murino, se evaluaron la eficacia cicatrizante (EC) y la contracción de heridas (CH); en los siguientes grupos experimentales: piel no tratada sin herida o piel sana (PSH); heridas no tratadas como control negativo (C -); control positivo heridas tratadas con Recoverón NC control (C +); heridas tratadas con aceite mineral (AM) (vehículo); heridas tratadas con aceite esencial al 25% (AE25); heridas tratadas con aceite esencial al 10% (AE10); heridas tratadas con α -pineno al 9% (PIN); y heridas tratadas con α -felandreno (FEL) al 1%. Encontrando que la mayor EC la presentaron los tratamientos con PIN (21.16%) y FEL (19.23%); seguido por AE10 (20.3%) y AE25 (14.71%). PIN y FEL presentaron la mayor velocidad de cierre, siendo esto evidente desde el tercer día de tratamiento. La mayor CH la presentaron los tratamientos con α -pineno (85.25%) y α -felandreno (83.51%); seguido por AE10 (67.28%) y AE25 (67.64%). Las pruebas *in vitro*, con fibroblastos cultivados en monocapa (CMC) y en andamios de hidrogel de fibrina (AHF), mostraron que tanto el AE como el PIN y FEL no reducen la viabilidad celular ni inducen la proliferación de fibroblastos. En los modelos de migración celular se encontró que el AE promueve la migración celular. El conjunto de resultados obtenidos en este trabajo, permiten

sugerir que un mecanismo de acción probable del AE de *B. morelensis*, durante el proceso de cicatrización, es la promoción de la migración de fibroblastos al sitio de la herida; haciéndolos activos en la producción de colágena en etapas tempranas, y más tarde, promueve la remodelación de esta colágena.

1.1 ABSTRACT

Bursera morelensis is used in traditional Mexican medicine to treat wounds on the skin. It is an endemic tree known as "aceitillo", the antibacterial and antifungal activity of its essential oil (EO) has been verified; it also acts as an anti-inflammatory. All these biological activities make *B. morelensis* EO a candidate for accelerating the wound healing process. The aim of the present work was to determine the wound healing properties EO of *B. morelensis* *in vitro* and *in vivo* models. EO was obtained by hydrodistillation, with a yield of 0.19%. The chemical analysis was carried out by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS); Finding 18 compounds of terpenoid type, of which the most abundant were: *p*-mentane (38.41%), phelandrene (35.25%); α -pinene (8.37%), caryophyllene (5.19%), β -mircene (3.6%), sabinene (3.54%) and *p*-cymene (2.1%). Prior to *in vivo* tests, the cytotoxic activity of EO was verified in peritoneal macrophages of BALB/C mice; and a preliminary irritation test was performed; finding low cytotoxicity and low irritation, demonstrating that EO is safe for animal testing. In the murine model, healing efficiency (HE) and wound contraction (WC) were evaluated; in the following experimental groups: untreated skin without wound or healthy skin (HS); wounds not treated as negative control (C -); positive control wounds treated with Recoveron NC control (C +); wound treated with mineral oil (MO) (vehicle); wounds treated with 25% essential oil (EO25); wounds treated with 10% essential oil (EO10); wounds treated with α -pinene 9% (PIN); and wounds treated with 1% α -phelandrene (PHEL). Finding that the highest HE was presented by treatments with PIN (21.16%) and PHEL (19.23%); followed by EO10 (20.3%) and EO25 (14.71). PIN and PHEL presented the highest closure speed, this being evident from the third day of treatment. The highest WC was presented by treatments with α -pinene (85.25%) and α -phelandrene (83.51%);

followed by EO10 (67.28%) and EO25 (67.64). *In vitro* tests, with fibroblasts cultured in monolayer (FCM) and in fibrin hydrogel scaffolds (FHS), demonstrated that both EO and PIN and PHEL do not reduce cell viability or induce fibroblast proliferation. In cell migration models, EO was found to promote cell migration. The set of results obtained in this work allows us to suggest that a probable mechanism of action of the EO of *B. morelensis*, during the healing process, is the promotion of fibroblast migration to the wound site; making them active in the production of collagen in early stages, and later, it promotes the remodeling of this collagen.

2.0 INTRODUCCIÓN

En México las plantas medicinales son el recurso material más amplio y valioso de la medicina indígena tradicional (Zolla, 1980). Esto debido a la gran diversidad tanto biológica como cultural, derivada de una compleja historia tanto biogeográfica (Espinosa et al., 2006) como cultural; parte de esta complejidad se ve reflejada en la riqueza de conocimiento herbolario, ya que se ha estimado que alrededor de 3000 plantas medicinales son usadas en México (Linares et al., 1999)

El género *Bursera* forma parte de las plantas medicinales de uso popular en México, en el país se pueden encontrar 84 especies (de las cuales 80 son endémicas) distribuidas principal en los bosques tropicales secos del país (Becerra, 2005); estas plantas se caracterizan por tener un sistema de canales de resinas responsables de sus exudados (Messina et al., 2015). Los efectos biológicos de estas plantas (citotoxicidad, actividad anti proliferativa, antimicrobiana, insecticida y antiinflamatorio), han sido atribuidos a sus aceites esenciales, diterpenos, triterpenos, esteroides y lignanos; (Canales et al., 2005; Carretero et al., 2008; Serrano-Parrales et al., 2012; Carrera-Martínez et al., 2014; Messina et al., 2015).

Bursera morelensis es un árbol endémico de México que ha sido reportado en el tratamiento de heridas en la piel (Canales et al., 2005; Serrano-Parrales et al., 2012), de esta planta se sabe que posee una alta cantidad de aceites esenciales (respecto a otras plantas del mismo género); así mismo, se ha verificado que extractos metanólicos de esta planta poseen actividad antiinflamatoria, analgésica y antioxidante (Serrano-Parrales et al., 2012) mientras que el aceite esencial actúa

como antiinflamatorio (Carrera-Martínez et al., 2014) razón por la cual se considera que tiene características que contribuyen a acelerar el proceso de cicatrización.

La reparación de una herida da como resultado la formación de una cicatriz. Para fines prácticos el proceso de cicatrización ha sido dividido en tres etapas secuenciales, para cada etapa se ha estimado el tiempo necesario para que ocurra y se ha determinado cuales son los tejidos y tipos celulares involucrados (Karodi et al., 2009). La primera de estas fases es la inflamatoria o aguda; la cual inicia con la cascada de coagulación para detener la hemorragia; a la par, se activan los mecanismos de defensa (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) (Martin y Leibovich, 2005; Enoch y Leaper, 2007). La segunda fase es la proliferativa, en ella las células epidermales, endoteliales y fibroblastos se multiplican (Wilgus, 2008), generando tejido de granulación inicial (Diegelmann y Evans, 2004); durante la etapa proliferativa ocurren la angiogénesis y la formación de tejido de granulación maduro, así mismo, en esta etapa se restaura la función de barrera del epitelio. La tercera fase es la remodelación, en esta el tejido de granulación es sustituido por fibras de colágena recién sintetizadas, ocurre entonces un proceso de síntesis y remodelación a fin de cerrar completamente la lesión y recobrar la homeostasis del tejido dañado (Diegelmann y Evans, 2004; Gurtner et al., 2008).

Aunque actualmente existen en el mercado una amplia gama de fármacos auxiliares en el proceso de cicatrización, es importante caracterizar las plantas utilizadas de manera tradicional a fin de verificar su aplicación terapéutica; por todo lo anterior el objetivo central de este trabajo, es determinar la composición química y las propiedades cicatrizantes del aceite de *Bursera morelensis* Ramírez; en un modelo de ratón.

3.0 Antecedentes

3.1 Medicina Tradicional en México

Desde los antiguos valles de Mesopotamia hasta las selvas tropicales del Amazonas, la humanidad ha buscado plantas para alimentarse y nutrirse, biomateriales para vivir y tratar el dolor y la enfermedad. Es probable que una gran cantidad de nuevas sustancias químicas y vías metabólicas estén ocultas en los genomas de las plantas

en espera de ser descubiertas. Aunque se conocen estructuras para 200.000 productos naturales, solo el 15% de las 350.000 especies de plantas estimadas han sido investigadas por su química (Wurtzel y Kutchan 2016).

En México, existen registros de 3015 plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades comunes (Argueta et al., 1994, Linares et al., 1999). Esta sabiduría de origen antiguo o tradicional continúa proporcionando salud y bienestar a la población de pocos recursos, por lo que es importante continuar con su estudio, rescatando el conocimiento ancestral y promoviendo su uso (Hurtado-Rico et al., 2006).

El uso de plantas medicinales y tratamientos tradicionales está relacionado con una visión particular del mundo. Como ha señalado Andrade-Cetto (2009), la presencia de casi 10,000 grupos indígenas, con aproximadamente 85 idiomas diferentes, muestra la fuerza y el reconocimiento de una concepción de la salud que se ha construido durante siglos. Sin embargo, no es necesario pertenecer a ninguna cultura indígena para tener acceso a prácticas curativas y creencias influenciadas por el conocimiento ancestral (Taddei-Bringas et al., 1999).

Actualmente, la tendencia a utilizar medicina complementaria y alternativa (que incluye plantas medicinales) ha aumentado, esto podría deberse a dos razones: la primera tiene que ver con el costo, la segunda con la percepción de los pacientes; ya que éstos están expuestos a tratamientos estándar que, en ocasiones, no solo son costosos, sino que también muestran varios efectos secundarios que eventualmente les desalientan. Por el contrario, se cree que las terapias alternativas tienen pocas consecuencias para el cuerpo, además, su proximidad a las creencias de las personas, la percepción de la enfermedad y el bienestar las hacen populares (Jacobo-Herrera et al., 2016).

Los metabolitos especializados de las plantas (por ejemplo, flavonoides, taninos, alcaloides, terpenos) sirven como recursos ricos para el desarrollo de fármacos. Los efectos moleculares y fisiológicos de los extractos y componentes de plantas medicinales a menudo se caracterizan en estudios de investigación de sistemas de mamíferos (animales de laboratorio). Casi 100 compuestos derivados de plantas

estaban en ensayos clínicos en 2007, para este mismo año, aproximadamente el 60% de los fármacos utilizados para el tratamiento de cáncer habían sido aislados de productos naturales, de los cuales, las plantas habían sido la fuente más importante; a partir de 2008, el 68% de todos los productos farmacéuticos eran derivados de plantas o inspirados en plantas (Gordaliza, 2007; Zhu et al., 2012; Wurtele et al., 2012). Asimismo, en la revisión de Alonso-Castro et al., 2011, se menciona que alrededor del mundo se conocen más de 3000 plantas con propiedades anticancerígenas.

Se puede afirmar que México posee una amplia variedad de especies de plantas que pueden ser proveedoras importantes de compuestos medicinales. Para evitar la extinción de estas plantas y sus compuestos activos, es necesario proteger y promover la explotación racional de esta fuente de compuestos químicos prometedores. Por ejemplo, el Taxol, un compuesto antitumoral, se aísla de *Taxus brevifolia* y *Taxus baccata*, para producir 2.5 kg de este compuesto, se requieren 27,000 toneladas de corteza de *Taxus brevifolia* y aproximadamente 12,000 árboles talados (Rates, 2001). Actualmente, la demanda del Taxol se ha incrementado, para cubrir esta demanda, se ha recurrido al cultivo en plantaciones de *T. brevifolia* y *T. baccata* (este se utiliza para obtener el precursor 10-DAB para realizar semisíntesis de Taxol); además, se exploran nuevas estrategias tales como la conversión química, de productos que anteriormente se consideraban desechos durante la extracción de Taxol y ahora son considerados precursores que permiten semisíntesis de Taxol más económica (Xue et al., 2020)

Para preservar los recursos vegetales, como fuente de metabolitos de importancia para el cuidado de la salud, primero es importante conocerlos. En los últimos años, la disminución de los costos asociados con la secuenciación y el ensamblaje de los datos genómicos llevaron a la liberación de un gran número de secuencias genómicas de plantas completas, incluidas varias de plantas medicinales (Rai et al., 2017). Se debe realizar un escrutinio más intenso de los medicamentos a base de plantas, incluidos estudios rigurosos sobre su composición química y ensayos clínicos, antes de que se puedan realizar las afirmaciones en relación a su eficacia

terapéutica. Este nuevo conocimiento, después podría ser utilizado para establecer plataformas para la ingeniería metabólica y permitir la producción sostenible de fitoquímicos medicinales (Scossa et al., 2018). Encontrar formas alternativas para la producción de estos compuestos, fuera de sus respectivos hospedadores de plantas nativas, también es relevante para preservar los recursos naturales en sus hábitats nativos (Skirycz et al., 2016).

3.2 Aceites Esenciales

Los aceites esenciales (AE) son mezclas complejas de compuestos naturales volátiles, constituidos principalmente por hidrocarburos terpenoides, terpenos oxigenados y sesquiterpenos; terpenoides y constituyentes aromáticos y alifáticos se caracterizan por tener un fuerte aroma; son sustancias líquidas, aromáticas y volátiles, de características lipofílicas, son sintetizados por plantas aromáticas a través del metabolismo secundario de éstas (Vargas y Bottia, 2008; Guan et al., 2019).

Los componentes terpénicos de los AE se derivan de tres rutas biosintéticas: (a) la ruta del fosfato de metileritritol (mep), que conduce a mono- y diterpenos; (b) la ruta del mevalonato, que conduce a sesquiterpenos; y (c) la vía shikimato a fenilpropanoides; la identidad y la cantidad relativa de estas sustancias volátiles en el AE es bastante variable (Franz y Novak, 2010; Lenardão et al., 2016).

En la naturaleza, los AE juegan un papel importante para las plantas, dándoles protección contra las bacterias, virus, hongos, insectos y herbívoros. También atraen a los insectos para que sirvan como dispersores de polen y de semillas (Bakkali et al., 2008).

Los AE se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las Asteraceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Pinaceae, Rosaceae, Rutaceae, Apiaceae, entre otras (Stashenko, 1996).

La obtención de AE a partir de diferentes partes de las plantas se realiza a través de métodos físicos, que pueden incluir el uso de dióxido de carbono líquido o microondas, principalmente destilación a baja o alta presión, empleando agua

hirviendo o vapor caliente (hidrodestilación); extracción con solventes lipófilos y, algunas veces, con dióxido de carbono supercrítico (Rubiolo et al., 2010, Usai et al., 2016).

El producto de extracción puede variar en calidad, cantidad y composición, según el clima, la composición del suelo, el órgano de la planta, la edad y la etapa del ciclo vegetativo (Masotti et al., 2003; Angioni et al., 2006 Bakkali et al., 2008; Usai et al., 2016; de Groot y Schmidt, 2016).

La cromatografía capilar de gases es la técnica de elección para el análisis de AE, debido a la volatilidad y la polaridad de sus componentes, combinando dos fases estacionarias de polaridad diferente. La identificación de los componentes del AE se realiza, generalmente, mediante datos cromatográficos (índices de Kováts, índices de retención lineal, tiempo de retención relativo, bloqueo del tiempo de retención) y/o datos espectrales, principalmente por espectrometría de masas (Rubiolo et al., 2010).

Las características de los AE los han convertido en productos muy valorados por la industria, para uso en aplicaciones alimentarias, cosméticas y farmacéuticas, Estos metabolitos secundarios se han relacionado como potentes antioxidantes, eliminadores de radicales libres y quelantes de metales, que también presentan propiedades antinociceptivas, neuroprotectoras, anticonvulsivas y antiinflamatorias, reportados en estudios preclínicos, que se caracterizan como posibles fuentes para el desarrollo de nuevos fármacos (Miguel, 2010; Silva et al., 2013; Lenardão et al., 2016; Orchard y van Vuuren, 2017)

3.3 *Bursera morelensis*

Bursera Jacq. ex L. (familia *Burseraceae*, orden *Sapindales*), un género monofilético (Becerra et al., 2012) que consta de aproximadamente 105 especies, es un taxón dominante en bosques tropicales secos, también abunda en los desiertos y sabanas de robles del sur de México, donde se pueden encontrar aproximadamente 85 especies, de la cuales 80 son endémicas (Becerra, 2005). Se ha dividido en dos subgéneros, *B. subg. Bursera* y *B. subg. Elafrio*. Las especies del subgénero *Bursera*

tienen 3-5 componentes florales (tetramérica o pentamérica), frutos bivalvos y corteza que generalmente exfolia en coloridas hojas de papel o en escamas, un rasgo que es responsable de su nombre derivado del vocablo Azteca "cuajote", que significa árbol leproso. El subgénero *Elaphrium* se caracteriza por una corteza áspera gris rojiza sin pelar, flores tetraméricas y frutos trivalvados (Becerra 1999, Gigliarelli et al., 2015). Estas plantas se caracterizan por tener un sistema de canales de resinas responsables de sus exudados (Messina et al., 2015).

Bursera morelensis Ramírez es un árbol endémico de México, es una especie de distribución disyunta, común en el sector oriental de la Depresión del Balsas, apareciendo también en la cuenca del Papaloapan y en la del río Tehuantepec, además, presente en los cañones de los afluentes del Pánuco. Su uso medicinal, ha sido reportado en el tratamiento de heridas en la piel (Canales et al., 2005; Serrano-Parrales et al., 2012), de esta planta se sabe que posee una alta cantidad de aceites esenciales, respecto a otras plantas del mismo género (ver Apéndice I); así mismo, se ha verificado que extractos metanólicos de esta especie poseen actividad antiinflamatoria, analgésica y antioxidante (Serrano-Parrales et al., 2012); mientras que el AE actúa como antiinflamatorio (Carrera-Martínez et al., 2014) y tiene actividad antimicrobiana (Canales et al., 2017) y antifúngica (Rivera-Yañez et al., 2017).

Actualmente diversos estudios han demostrado que el aceite esencial de *B. morelensis* contiene gran concentración de compuestos volátiles, principalmente monoterpenos procedentes de la corteza, entre los terpenos que se han encontrado en gran abundancia son α -pineno y α -felandreno (Zúñiga et al., 2005; Canales-Martínez et al., 2017; Rivera-Yañez et al., 2017; Carrera-Martínez et al., 2014), además se ha demostrado en diferentes trabajos que ambos poseen una actividad anti-inflamatoria; ya que Kim y colaboradores (2015) sugirieron que α -pineno (PIN) suprime significativamente la producción de Ciclooxygenasa 2 (COX-2), los cuales son esenciales para una inflamación, por otro lado también se ha demostrado que inhibe al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 1 beta (IL-1 β) e Interleucina 6 (IL-6) durante una pancreatitis aguda (Bae et al., 2012). Asimismo se

ha encontrado que el α -felandreno (FEL) inhibe la producción de citocinas pro inflamatorias como TNF- α e IL-6 (Siqueira et al., 2016).

Las diversas actividades biológicas demostradas por el AE de *B. morelensis*, y de algunos de los terpenos que lo componen; indican que este AE tiene potencial como agente benéfico en la reparación de heridas.

3.4 Piel

La piel es la frontera física y funcional que separa al cuerpo del ambiente externo, desempeña un papel fundamental en la defensa contra agentes alérgenos y patógenos (Czarnowicki et al, 2017; Leung y Guttman-Yassky, 2014).

La piel se divide en tres capas, la más externa es la epidermis (origen ectodérmico), consiste en una capa de proteínas y lípidos de 15 a 30 nm de espesor, recubierta por la capa cornificada (estrato córneo), la cual constituye la barrera física de la piel (Nishifuji y Yoon, 2013). La dermis (origen mesodérmico) es la segunda capa, compuesta por fibras de colágeno y elastina en una matriz amorfa de mucopolisacáridos, es un tejido conectivo de soporte, posee apéndices, plexos vasculares y nerviosos que la atraviesan; el grosor de la dermis varía considerablemente, según la localización anatómica; su estructura fina varía un poco, según la profundidad (dermis superficial o papilar, dermis reticular o profunda) (Kanitakis, 2002). La tercera capa es la subcutis, también llamada hipodermis (*panniculus adiposus*), es la parte más profunda de la piel, es una capa lipídica subdérmica, desempeña un papel importante en la termorregulación, el aislamiento, la provisión de energía (almacén nutricional) y la protección contra lesiones mecánicas (Kanitakis, 2002, Debeer et al., 2013). La piel también está asociada a diversas estructuras como folículos pilosos, glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas, nervios, vasos sanguíneos y linfáticos (Elias, 2007; Proksch et al., 2008; Rushmer et al., 1966; Summerfield et al., 2015).

La capa epidérmica superior está cubierta por una superficie queratinosa protectora, misma que permite la eliminación de microorganismos mediante la eliminación de queratinocitos y secreciones sebáceas ácidas, esto produce un ambiente hostil para

los microorganismos. Además de estas defensas, la piel también consiste en una microflora natural que ofrece protección adicional al inhibir, de manera competitiva, el crecimiento de bacterias patógenas; al competir por los nutrientes y los sitios de unión y al producir productos metabólicos que inhiben el crecimiento microbiano. La microflora natural de la piel incluye especies de bacterias como *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Brevibacterium*, *Propionibacterium* y levaduras como *Candida* (Orchard y van Vuuren, 2017).

Los estudios proteómicos de piel microdisecionada han encontrado que hay entre 155 y 174 proteínas diferentes en la misma, con los constituyentes principales que consisten en: colágenas (I, II, III, VI, XII y XIV), proteínas de la matriz extracelular (elastina, lumican, mimecan, prolargin, periostina, decorina); queratinas ([tipo I citoesquelético 9, 10, 13, 14, 15 y 16] y [de tipo II citoesquelético 1, 2, 5 y 75]); y proteínas celulares (vimentina, desmoplaquina, actina, miosina, tubulina, laminina, histonas, anexinas y proteína 14-3-3) (Mikesh et al., 2013). La forma en que la mecánica estructural de la piel se relaciona con el ensamblaje de estos componentes de la matriz sigue siendo, en gran parte, desconocida (Wong et al., 2016).

El término Sistema inmune cutáneo (SIS por sus siglas en inglés), fue acuñado por primera vez, en 1986, por Bos y Kapsenberg, para describir el objeto de estudio de la inmunodermatología. Actualmente, el término hace referencia a la red de células efectoras y mediadores moleculares de la piel, que constituyen un altamente sofisticado sistema de defensa contra agresiones externas, tales como patógenos, agentes químicos, radiación ultravioleta, entre otras (Bos, y Kapsenberg, 1986). Para mantener la homeostasis cutánea, debe mantenerse en armonía la interacción entre diversos componentes inmunes presentes en los diferentes compartimentos de la piel; así como la interacción entre las respuestas inmunitarias innata y adaptativa. El SIS incluye componentes celulares (queratinocitos, células de Langerhans, fibroblastos, mastocitos, macrófagos, células endoteliales o leucocitos reclutados) y una amplia variedad de mediadores inflamatorios solubles (péptidos antimicrobianos, AMP por sus siglas en inglés), citocinas y quimiocinas (Abdallah, 2017).

3.5 Cicatrización

Una cicatriz es el resultado del proceso de sanación de una herida. Se pueden definir dos tipos de cicatrización: de primera y de segunda intención; el primer caso ocurre cuando la herida se trata con algún mecanismo de cierre (sutura, cintas, grapas, etc.) en un periodo de 12 a 24 horas post lesión. El segundo tipo se presenta cuando hay una pérdida extensiva de tejido (traumas severos o quemaduras graves), razón por la cual la arquitectura habitual de la piel no es regenerada; el periodo de tiempo de este tipo de cicatrización depende del tamaño de la herida (Enoch y Leaper, 2007).

La cicatrización se divide en tres fases secuenciales, cada una de estas fases tiene un periodo de tiempo propio, así como tejidos y linajes celulares particulares (Karodi et al., 2009). La primera de estas fases es la inflamatoria o aguda; en ésta, mediante las plaquetas y la formación de fibrina se detiene la hemorragia, así mismo, son activados mecanismos de defensa (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) (Martin y Leibovich, 2005; Enoch y Leaper, 2007). A continuación viene la fase proliferativa de células epidermales, endoteliales y de fibroblastos (Wilgus, 2008), que generarán un tejido de granulación inicial (Diegelmann y Evans, 2004); la migración de los queratinocitos sobre la dermis lesionada marca el principio de esta fase, posteriormente, nuevos vasos sanguíneos son formados (angiogénesis), y los brotes de capilares asociados con fibroblastos y macrófagos sustituyen la matriz de fibrina con tejido de granulación, lo que forma un nuevo sustrato para la migración de queratinocitos en etapas de reparación posteriores; los queratinocitos se localizan detrás de la zona proliferativa, maduran y al final restauran la función de barrera del epitelio; el factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGFA por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), son los reguladores positivos de la angiogénesis más importantes (Gurtner et al., 2008). En la última fase, el tejido granular es remodelado mediante la generación de fibras de colágeno nuevas y se produce la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos, que aumentan la fuerza tensil y permiten la aproximación de los bordes de la lesión (Diegelmann y Evans, 2004; Gurtner et al., 2008). Un resumen de este proceso se puede ver en la Figura 1.

Aunque actualmente existe en el mercado una amplia gama de fármacos auxiliares en el proceso de cicatrización, es importante caracterizar las plantas utilizadas de manera tradicional a fin de verificar su aplicación terapéutica. Por todo lo anterior, el objetivo central de este trabajo es: determinar la composición química y las propiedades cicatrizantes del aceite esencial de *Bursera morelensis* en un modelo murino.

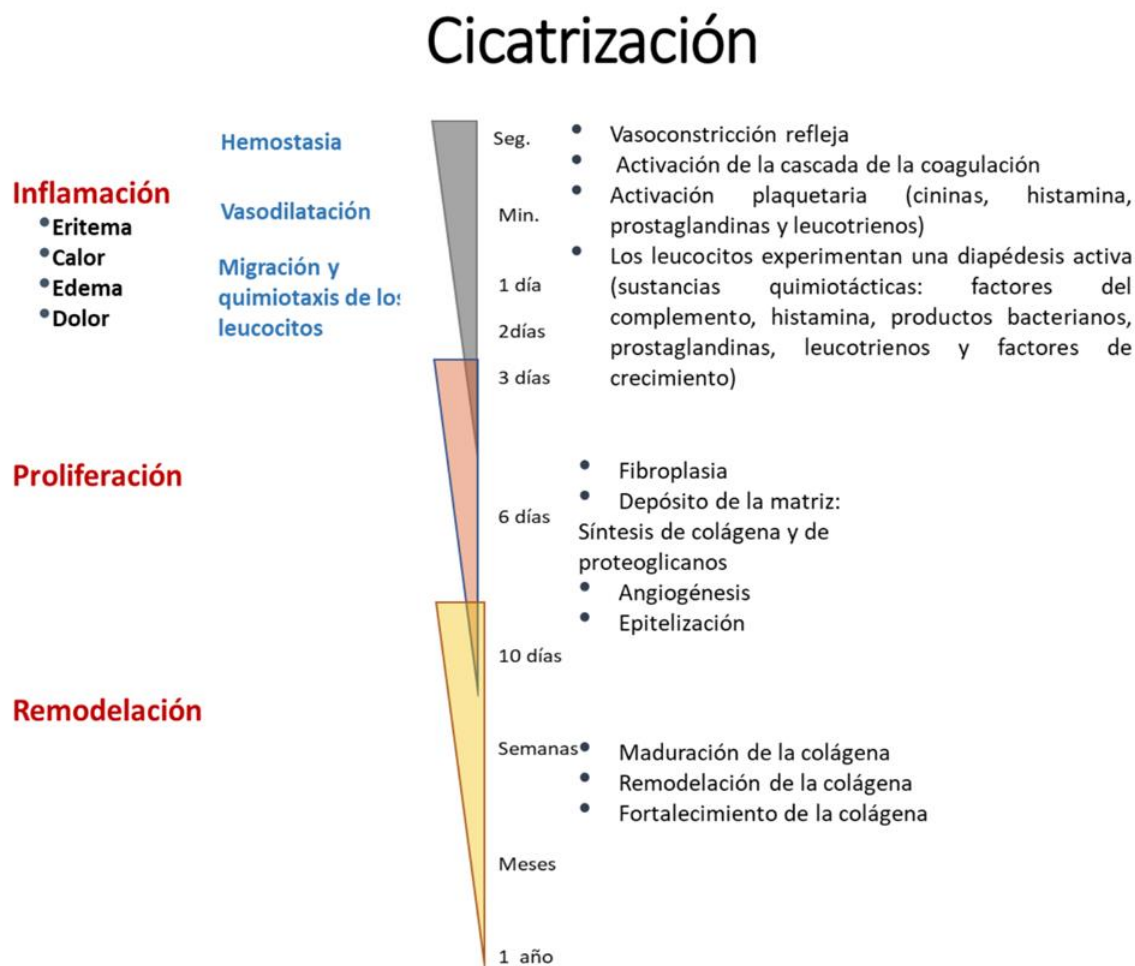


Figura 1. Resumen del proceso de cicatrización, dividido en las tres fases típicas y sus eventos más importantes a lo largo del tiempo. (Imagen elaborada por Salas-Oropeza).

4.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Bursera morelensis es un árbol endémico de México que ha sido reportado en el tratamiento de heridas en la piel. Se sabe que posee una alta cantidad de AE, del cual se ha verificado actividad antiinflamatoria y antimicrobiana, mientras que del extracto metanólico se ha demostrado actividad antiinflamatoria, analgésica y

antioxidante, por lo cual la pregunta es: ¿el AE promoverá el proceso de cicatrización?

5.0 HIPÓTESIS

Bursera morelensis, es una planta utilizada en la medicina tradicional con el fin de aliviar heridas infectadas; así mismo, existen evidencias de que en su composición química contiene compuestos con efectos antiinflamatorios, antimicrobianos y antioxidantes; características deseables en productos pro-cicatrización; consecuentemente, es probable que el AE de esta especie, así como dos de sus principales componentes α -pineno y α -felandreno, promuevan el proceso de cicatrización.

6.0 OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Determinar la composición química y las propiedades cicatrizantes del AE de *Bursera morelensis* Ramírez.

6.2 Objetivos Particulares

1. Determinar la composición química del AE de *B. morelensis*.
2. Determinar la citotoxicidad del AE de *B. morelensis*, α -pineno y α -felandreno.
3. Determinar el efecto cicatrizante del AE de *B. morelensis*, α -pineno y α -felandreno
4. Evaluar eficacia cicatrizante (EC) del AE de *B. morelensis*, α -pineno y α -felandreno.
5. Evaluar la contracción de herida (CH) con AE de *B. morelensis*, α -pineno y α -felandreno.
6. Evaluar la velocidad de cierre de herida de AE de *B. morelensis*, α -pineno y α -felandreno.
7. Aplicar prueba de proliferación celular al AE de *B. morelensis*, α -pineno y α -felandreno.
8. Aplicar pruebas de inducción de la migración celular en fibroblastos con AE de *B. morelensis* y α -pineno y α -felandreno.

7.0 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Obtención y caracterización del AE de *B. morelensis*.

7.1.1 Área de recolecta

La recolecta del material vegetal se realizó en el municipio de Teotitlán de Flores Magón, ubicado en la región conocida como la Cañada Oaxaqueña, asentada a un costado de la sierra Madre Occidental. Es la región geográfica más pequeña del estado de Oaxaca, México, ubicándose al este de las montañas de Nochixtlán y Coixtlahuaca y al oeste de la zona montañosa del distrito de Cuicatlán. Teotitlán de Flores Magón se localiza a 170 kilómetros al noroeste de la ciudad de Oaxaca; a 64 kilómetros al sureste de la ciudad de Tehuacán, estado de Puebla; a 316 kilómetros al sureste de la Ciudad de México; y a 65 kilómetros al oeste de Huautla de Jiménez. Geográficamente se encuentra comprendido entre los 18°08' de latitud norte y los 97°04' de longitud oeste, con una altitud de 1,020 metros sobre el nivel del mar (Figura 2). El clima predominante es templado, con una temperatura media de 25°C, con lluvias en los meses de mayo, junio, agosto y septiembre, con vientos moderados en los meses de octubre y noviembre (INAFED, 2010).

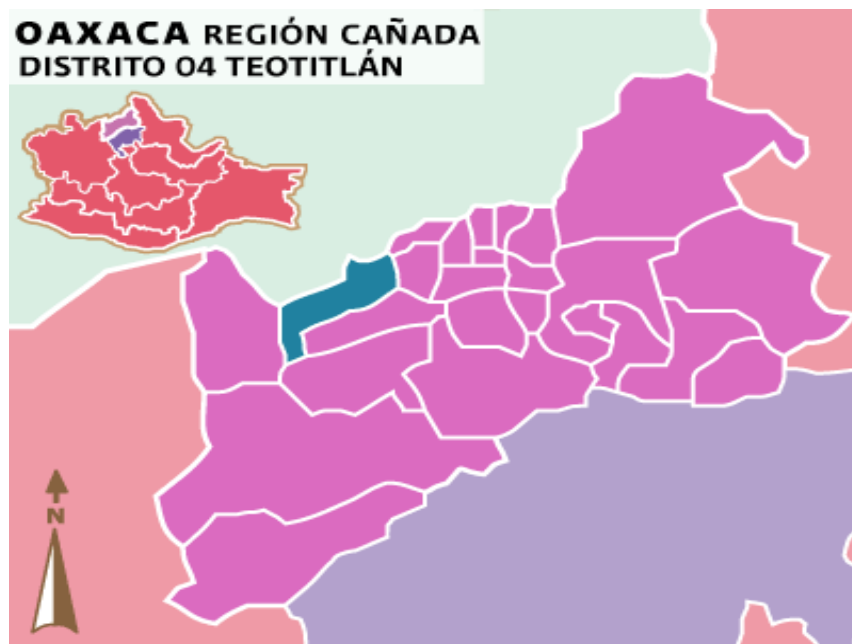


Figura 2. Mapa de la ubicación geográfica de la región Cañada en el estado de Oaxaca, México.

7.1.2 Material Vegetal

La recolecta se realizó durante la época de secas (marzo 2016), por tal motivo los árboles no presentan hojas, se cortaron las ramas más jóvenes, las cuales fueron

empaquetadas en bolsas plásticas y recubiertas por un filme plástico para su transporte al laboratorio, donde fueron almacenadas en el cuarto frío (4°C) hasta su procesamiento para obtener el AE. Partes del material recolectado se depositaron en el Herbario Nacional de México (MEXU) de la Universidad Nacional Autónoma de México; y en el herbario IZTA, en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (especímenes de vales: IZTA 42123).

7.1.3 Extracción del aceite esencial

Las ramas fueron cortadas en fragmentos de aproximadamente 2 cm, con estos fragmentos se formó un lecho compacto en el fondo del matraz de bola de 1000 mL; a este lecho se agregó agua destilada suficiente para cubrir la muestra vegetal. El matraz fue acoplado a un doble condensador de paso (diseñado en el laboratorio de Farmacognosia de la FES Iztacala-UNAM), el condensador, a su vez, se conectó a una fuente de agua fría circulante; el matraz se colocó sobre una manta de calentamiento (SEV-Prendo, MC301-9, México). El proceso de destilación duró entre 40 y 60 minutos. El AE se recolectó en frascos viales de 5 mL, mientras que la fase acuosa fue desechada. Para calcular el porcentaje de rendimiento de la extracción se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento de extracción } \left(\frac{g}{g} \right) = \frac{a}{b} \times 100$$

donde: “**a**” es el peso en gramos obtenidos de AE y “**b**” es el peso del material vegetal en gramos. El AE se almacenó a -4°C protegido de la luz.

7.1.4 Caracterización química

El AE de *B. morelensis* fue analizado cualitativa y cuantitativamente en un cromatógrafo de gases (CG), modelo 6850 (Agilent Technologies, USA), equipado con una columna HP-5ms (Agilent Technologies, 30 m x 0.25 mm i.d., y 0.25 µL film thickness, USA). La columna fue programada de la siguiente manera: 20°C durante 3 minutos, incrementando a 300°C (20°C/min). La temperatura del inyector fue 280°C. Los porcentajes de las áreas de pico fueron determinados usando el software integrador RTE (Agilent Technologies, USA). La identificación de los compuestos fue llevada a cabo mediante el espectrómetro de masas (SM) que está acoplado al cromatógrafo de gases (CG-S Modelo 5975C Agilent Technologies, USA). Las

muestras fueron ionizadas por impacto electrónico de 70 eV, la temperatura alcanzada por la fuente de ionización fue 230°C. Las condiciones de separación fueron: temperatura inicial de 30°C por dos minutos, ascendiendo con dos rampas; la primera de 20°C/min hasta alcanzar 230°C, y la segunda, incrementando de 8° C/min hasta alcanzar 300°C, esta temperatura fue mantenida por cinco minutos. Helio fue usado como fase móvil, con un flujo de 1 µL/min, con un volumen de inyector de 1µL, usando un inyector tipo Split. La identificación de los componentes químicos se realizó mediante la base de datos NIST Library versión 8.0 (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, Gaithersburg, MD, USA.) y por las comparaciones con los índices de retención basado en el HP-5ms (Apéndice II) (Rivera-Yañez et al., 2017).

7.2 Actividad cicatrizante

7.2.1 Animales

Fueron utilizados ratones machos de la cepa CD1 de 6 a 8 semanas de edad, mismos que se dividieron en grupos experimentales compuestos por 5 organismos. La cantidad de grupos se determinó según las necesidades de cada ensayo. Los ratones se obtuvieron del bioterio para animales de laboratorio de la FES-Iztacala, UNAM, México. Durante el periodo de experimentación de cada prueba, los animales se mantuvieron en condiciones estándar con alimento y agua *ad libitum*; todo bajo la norma NOM-062-ZOO-1999, referida al uso y manejo de los animales de laboratorio utilizados en investigación científica.

7.2.2 Citotoxicidad

La citotoxicidad se determinó utilizando el ensayo de tinción con cristal violeta. Se realizó con macrófagos peritoneales de ratones BALB/c sembrados a 1.5×10^4 células/pocillo, tratados con diferentes concentraciones de AE (de 1 mg/ml a 4×10^{-4} mg/mL) en DMEM-F12/L glutamina (Biowest, Francia), suplementada con suero fetal bovino al 10% (Biowest, Francia), penicilina/estreptomicina al 1% (Biowest, Francia) y a continuación, incubación a 37 °C y CO₂ 5% durante 24 h. Posteriormente, se eliminó el medio y las células restantes se tiñeron a temperatura ambiente, durante 12 minutos, con 50 µL/pocillo de solución de cristal violeta (cristal violeta al 1% en metanol al 20%/agua destilada), luego se lavaron varias veces con agua destilada.

La absorbancia se midió a 595 nm. La viabilidad relativa se calculó de la siguiente manera:

$$Viabilidad\ realtiva = \frac{AE - absobancia\ de\ fondo}{CANT - absorbancia\ de\ fondo} \times 100$$

Donde: AE es absorbancia experimental y CANT es control de absorbancia no tratada. Los porcentajes de viabilidad se compararon con los obtenidos con doxorubicina. Los ensayos se realizaron por triplicado (modificado de Tu et al., 2013).

7.2.3 Prueba de irritación de piel

Para esta prueba se utilizó un grupo experimental. Inicialmente el pelo del dorso de los animales fue recortado usando una rasuradora automática y enseguida se depiló utilizando Veet® crema depilatoria corporal para piel sensible. La piel del dorso de los ratones fue depilada 24 horas antes de iniciar las pruebas, transcurrido este tiempo fueron aplicados 10 µL de AE al 25% (AE25) cada 12 horas, en un periodo de 72 horas; a la par, se monitoreo la posible aparición de signos de irritación tales como eritema, exudados cutáneos o cambios en la textura de la piel (Siqueira, 2016). Al finalizar el ensayo, los ratones fueron sacrificados y la piel recuperada para análisis histológico.

7.2.4 Eficacia cicatrizante, método tensiométrico.

Los ratones se asignaron a 8 grupos. Veinticuatro horas después de la depilación, los organismos se anestesiaron por inhalación de isoflurano (ver apéndice v). Se utilizaron procedimientos asépticos y antisépticos en la piel depilada y se realizó una incisión de 1 cm. Los grupos se clasificaron de la siguiente manera: Grupo 1: piel no tratada sin herida o piel sana (PSH); Grupo 2: heridas no tratadas como control negativo (C-); Grupo 3: tratamiento de heridas con Recoverón NC® (Armstrong Lab, México. Apéndice III), como control positivo (C +); Grupo 4: heridas tratadas con aceite mineral (AM) (vehículo); Grupo 5: heridas tratadas con AE al 25% (AE25); Grupo 6: heridas tratadas con AE al 10% (AE10); Grupo 7: heridas tratadas con α-pineno al 9% (PIN); y Grupo 8: heridas tratadas con α-felandreno (FEL) al 1%. Las heridas de los Grupos 4 a 8 se trataron de forma epicutánea con 10 µL del tratamiento

respectivo, mientras que las heridas del grupo de control se cubrieron con la crema Recoverón cada 12 h. Todos los tratamientos se aplicaron durante 10 días. Después de este tiempo, los ratones se sacrificaron usando una cámara de CO₂. Inmediatamente después del sacrificio, se midió la resistencia de la herida a la tensión según el método tensiométrico (modificado de Salas et al., 1994, Apéndice IV). El porcentaje de eficacia de curación de heridas se calculó como:

$$\% \text{ eficacia de cicatrización} = \frac{GC}{GS} \times 100$$

Donde: **GC** = gramos en que abre la piel cicatrizada y **GS** = gramos para abrir la piel sana.

7.2.5 Modelo de herida por incisión (MHI)

Para este modelo se replicaron los 8 grupos de EC, con 6 ratones cada grupo. Los ratones fueron depilados 24 horas antes de iniciar los experimentos (tal como se describió anteriormente). Los animales se anestesiaron por inhalación de isoflurano (Apéndice V); las heridas fueron generadas usando un bisturí cilíndrico para biopsias de 5mm, procurando siempre que la profundidad de la herida no rebasara la hipodermis; los tratamientos y grupos experimentales fueron los mismos que los utilizados para evaluar EC; cada dos días se midió el diámetro de la herida con un calibrador vernier digital y se calculó la contracción de la herida (CH) usando la ecuación siguiente:

$$100 - \frac{\text{Día } x}{\text{Día } 0} \times 100$$

Donde: Día x = diámetro de herida en día post herida específico; Día 0 = diámetro de la herida en el día cero. En el décimo día, los ratones fueron sacrificados en cámara de CO₂, la piel del dorso donde se infringió la herida fue retirada, fijada en formol al 10% y procesada para su posterior análisis histológico.

A la par de este experimento de MHI, 8 grupos más de ratones conformados por 3 ratones cada uno, fueron tratados por tres días con las mismas características del ensayo de CH de 10 días; transcurrido este tiempo, los ratones fueron sacrificados y la piel se recuperó para análisis histopatológico.

7.3 Histología

7.3.1 Obtención y preparación de muestras

La piel del área de la herida se obtuvo haciendo un corte rectangular alrededor de ésta, a una distancia de más o menos 0.5 cm; posteriormente, se fijó con formol al 10% y se deshidrató en alcoholes de concentración creciente hasta llegar a alcohol absoluto (tren de deshidratación). Después, el tejido fue pasando por solventes intermediarios como xileno (en donde las muestras suelen transparentarse), una vez deshidratadas las muestras fueron incluidas en parafina y, posteriormente, fueron cortadas con micrótopo y procesadas para llevar a cabo las tinciones.

7.3.2 Tinción Hematoxilina – Eosina

Para realizar la tinción, los cortes se colocaron por 24 horas en un horno para ser desparafinados por medio de calor. Posteriormente, los cortes se hidrataron realizando lavados con xilol y alcoholes en orden de concentración decreciente y, finalmente, con agua (tren de hidratación). Una vez hidratadas las muestras, se efectuó la tinción con Hematoxilina por 5 minutos, seguido de lavados con agua amoniacal; posteriormente, las laminillas se tiñeron con Eosina por 5 minutos; transcurrido este tiempo, las laminillas se pasaron por tren de deshidratación para prepararlas para el montaje con resina sintética. Transcurridas 24 horas, se llevaron a cabo las observaciones al microscopio (Cardiff et al., 2016).

7.3.3 Tinción tricrómica de Masson

Después de desparafinar los cortes, se siguen los mismos pasos que la tinción hematoxilina–eosina hasta llegar a la hematoxilina, donde después de estar 5 minutos en este colorante, se lavan los cortes con agua destilada, se tiñen con la solución escarlata- fucsina ácida de 2 a 5 minutos, se lavan con agua destilada y se tratan con la solución de ácido fosfomolibdico–fosfotúngstico durante 10 a 15 minutos; posteriormente, se tiñen las muestras con azul de anilina por 15 minutos y se lavan, se diferencian con ácido acético al 1% durante 5 minutos, se deshidratan, aclaran y montan las muestras para poder ser observadas al microscopio (Sida et al., 2019).

7.4 Análisis *in vitro* con fibroblastos

7.4.1 Aislamiento de fibroblastos de piel.

Los fibroblastos se aislaron de piel humana, obtenida mediante donación con consentimiento informado por escrito. La piel fue tomada de donadores voluntarios sanos, utilizando un bisturí cilíndrico para biopsias de 5 mm, en condiciones sépticas y antisépticas; la piel así obtenida fue inmediatamente depositada en solución Hank con antibiótico, posteriormente en campana de flujo laminar, las muestras de piel fueron cortadas en fragmentos más pequeños, cada uno de estos fragmentos se cultivaron en medio Dulbecco Eagle Modified Low Glucose (DMEM-LG) suplementado con suero fetal bovino (FBS) 10%, y antibióticos (penicilina 100 U / mL, estreptomycin 100 mg / mL y gentamicina 100 mg / mL), todos de Gibco BRL (Rockville, MD, EE. UU.) y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. El medio de cultivo se reemplazó cada dos días, después de 2 semanas de cultivo se retiraron los explantes (fragmentos de piel). Los fibroblastos se cultivaron hasta alcanzar aproximadamente el 80% de confluencia y las células se separaron con tripsina al 0.05% / 0.02% / EDTA y se sembró para generar células suficientes para los siguientes ensayos; así como para generar una reserva para posteriores análisis (Vázquez et al., 2019).

7.4.2 Cultivo de fibroblastos en andamios de hidrogeles de fibrina (AHF).

Andamios de hidrogeles de fibrina (AHF) fueron preparados a partir de plasma no purificado de individuos donantes. Las muestras de plasma humano de donantes sanos, fueron proporcionadas por el banco de sangre del Hospital General de Iguala, Guerrero, México, del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE). Se obtuvo plasma por fraccionamiento primario de la sangre total. Se preparó una suspensión de fibrina de 200 µL con 136 µL de plasma, 24 µL de NaCl al 0.9%, 40 µL de CaCl₂ 1% y 5000 células, y luego se incubaron a 37°C por 30 min para inducir la polimerización. Posteriormente, se añadió a los AHF medio DMEM suplementado (Vázquez et al., 2019).

7.4.3 Viabilidad celular (Vida/muerte)

La viabilidad celular se analizó en AHF y en cultivos en monocapas (CMC) cultivadas durante 3 días a través de tinciones de homodímero de etidio y calceína (kit

LIVE/DEAD, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para las pruebas en hidrogeles de fibrina, se sembraron 5000 células incubadas durante 24 y 48 horas, con medio DMEM suplementado con los siguientes estímulos: AE 1 mg/mL, AE 0.1 mg/mL, AE 0.001 mg/mL; y Tween 0.1%. Para los ensayos en monocapa, se sembraron 5000 células/cm² en cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich), fueron cultivadas por 24 horas con medio DMEM suplementado y fueron estimuladas con: AE 1 mg/mL, AE 0.1 mg/mL, AE 0.001 mg/mL; FEL 0.1 mg/mL, FEL 0.01 mg/mL; PIN 0.1 mg/mL, PIN 0.01 mg/mL. El control de muerte se obtuvo tratando células, en ambas condiciones, con etanol durante 30 minutos antes de la tinción; el control de células vivas fue con células cultivadas con medio DMEM suplementado sin AE. Se tomaron imágenes panorámicas (100 ×) utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 80i (Nikon, Shinagawa, Tokio, Japón) con el software NIS-Elements F4 (Nikon). Para la estimación de la viabilidad, las células se contaron manualmente, ya que era difícil delimitar los límites celulares en cultivos de hidrogel de fibrina con un software (Vázquez et al., 2019).

7.4.4 Proliferación celular

Para el ensayo de proliferación celular, se analizaron células CMC y en HGF, los cuales se incubaron con reactivo PrestoBlue durante 1 hora, luego se colocaron los sobrenadantes en placas de 96 pocillos. La absorbancia del contenido en cada pocillo se midió a una longitud de onda de 570 nm utilizando un lector de placas espectrofotométricas (Thermo Multiskan Ascent Type 354). Para ambos ensayos, los estímulos fueron: AE 1 mg/mL, AE 0.1 mg/mL, AE 0.001 mg/mL; FEL 0.1 mg/mL, FEL 0.01 mg/mL; PIN 0.1 mg/mL, PIN 0.01 mg/mL. En las pruebas con hidrogel de fibrina, los andamios sin células se consideraron los controles negativos, las células crecidas con DMEM suplementado se consideraron el control positivo. Para los ensayos en monocapa, el control positivo fueron células crecidas sin estímulo, el control negativo fue medio sin células. Cada experimento se llevó a cabo tres veces (Vázquez et al., 2019).

7.4.5 Migración celular

En monocapa: Se cultivó en placa de seis pozos fibroblastos teñidos y sin teñir con carboxifluoresceína, una vez que la monocapa fue confluyente, se aplicaron los siguientes estímulos al medio DMEM suplementado: aceite esencial al 0.01 mg/mL, como control positivo factor de crecimiento de fibroblastos (FGF por sus siglas en inglés) 10 ng/mL, control negativo medio sin estímulo. En estos cultivos se simuló una herida. La respuesta de las células fue monitoreada mediante observación al microscopio por 48 horas (Liang et al., 2007). A la par se realizó otro experimento de características similares, pero con células teñidas con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) (Quah y Parish, 2010). La respuesta de las células fue monitoreada mediante observación a las 24 y 48 horas en microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 80i (Nikon, Shinagawa, Tokio, Japón) con el software NIS-Elements F4 (Nikon).

Prueba de migración en hidrogel de fibrina: En placa de 96 pozos se construyeron nueve AHF con 5×10^3 células teñidas con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE). A otros nueve andamios, en los que no se sembraron fibroblastos, se agregaron los estímulos de la siguiente manera: tres con 10 ng/mL de FGF, tres con AE 0.01 mg/mL y tres sin estímulo alguno. Una vez polimerizados todos los AHF, fueron extraídos del pozo y depositados en placas de seis pozos (en estas placas el diámetro del pozo es mayor) de la siguiente manera: un andamio con células frente a un andamio con estímulos separados 1 mm de distancia, una vez hecho esto, el pozo se llena con una nueva solución para AHF y se deja polimerizar, todo ello con el fin de envolver los primeros dos andamios (Chaires-Rosas, et al., 2019). La respuesta de las células fue monitoreada mediante observación a las 4 y 24 horas en microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 80i (Nikon, Shinagawa, Tokio, Japón) con el software NIS-Elements F4 (Nikon).

7.5 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como el error estándar medio de la media. El análisis de los datos se realizó mediante un análisis de varianza con una prueba posthoc de

comparación múltiple de Tukey-Kramer ($p < 0,01$) utilizando el software GraphPad Prism 7 (versión 7.00, GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

8.0 RESULTADOS

8.1 Caracterización química del AE de *B. morelensis*

Se colectaron 2.0013 kg de material de ramas de *B. morelensis* y se obtuvieron 3.783 g de AE, dando un rendimiento igual a 0.19%. La densidad del aceite fue de 0.8 g/mL. Mediante el análisis de CG-EM se identificaron 18 compuestos en el AE (Figura 3).

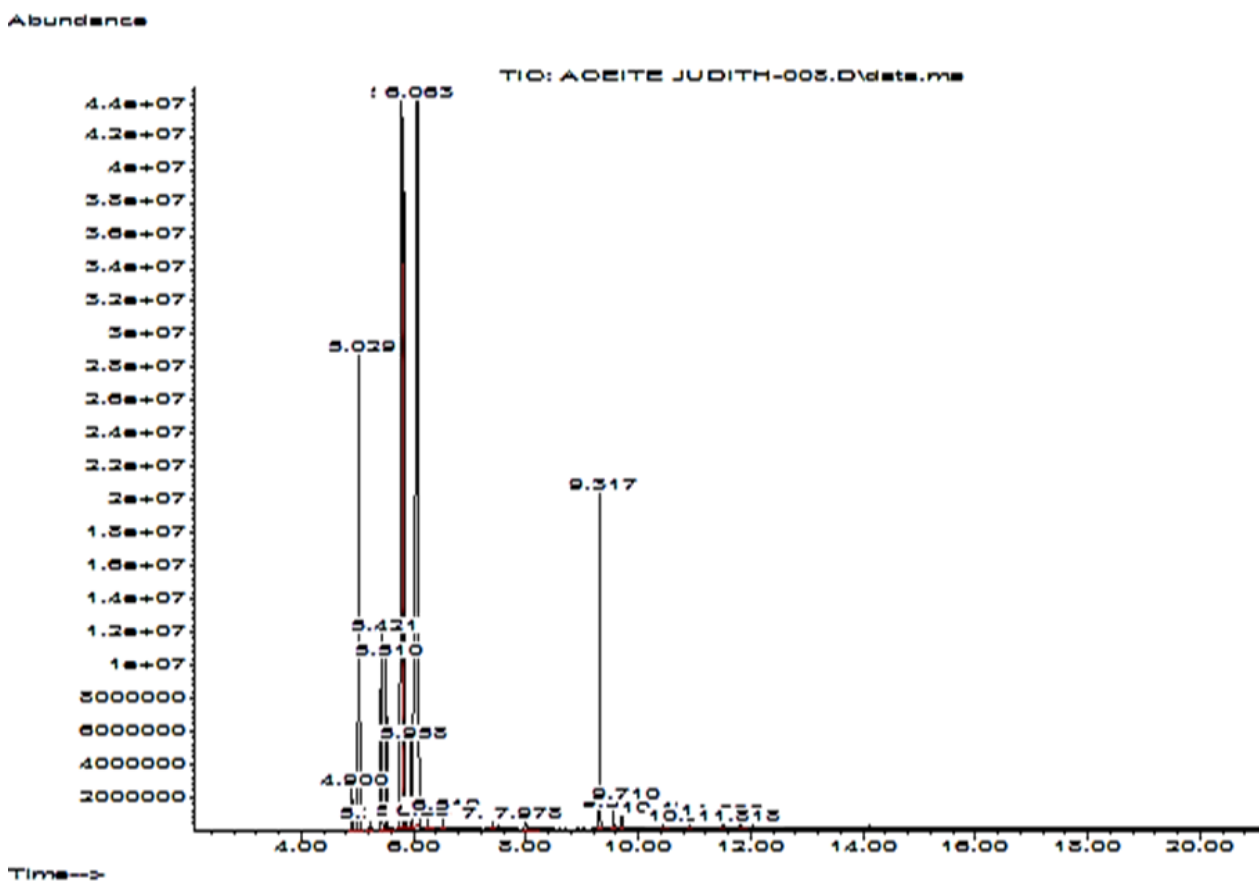


Figura 3. Cromatograma obtenido del AE de *B. morelensis*

Los principales compuestos fueron p-mentano (38,41%) y β -felandreno (35,25%). Otros componentes importantes fueron: α -pineno (8.37%), cariofileno (5.19%), óxido de cariofileno (0.26), β -mirceno (3.6%), sabineno (3.54%) y p-cimeno (2. 1%) (Cuadro 1).

Cuadro 1 Composición química del AE de *Bursera morelensis*

TR (min)	Compuesto	Abundancia (%)	IS
4.900	α -Felandreno	0.80	90
5.029	α -Pinoeno	8.37	97
5.229	Camfeno	0.13	96
5.421	Sabineno	3.54	93
5.510	β -Mirceno*	3.6	87
5.782	β -Felandreno*	35.25	68
5.878	α -Terpineno	0.16	94
5.958	<i>p</i> -Cimeno	2.1	97
6.063	<i>p</i> -Mentano*	38.41	83
6.255	γ -Terpineno	0.18	97
6.519	Terpinoleno	0.3	97
7.409	Terpinen-4-ol	0.14	94
7.978	<i>p</i> -Ment-1(7)-en-2-one	0.34	93
9.317	Cariofileno	5.19	99
9.557	α -Caryofileno	0.28	99
9.710	Germacreno D	0.44	96
10.431	Cariofileno óxido	.260	98
10.912	β -Eudesmol	0.14	93

IS: índice de similitud o coincidencia entre la biblioteca y los espectros de masas obtenidos.

*: la identificación de estos compuestos es parcial porque el IS es inferior al 90%.

8.2 Citotoxicidad y prueba de irritación.

Con respecto a la prueba de citotoxicidad, los resultados muestran que el AE de *B. morelensis* tuvo un porcentaje de mortalidad del 24% a una concentración de 1.2 mg/mL, que fue significativamente menor que la concentración inhibitoria media máxima (CI₅₀) de doxorubicina, que fue de 0.85 μ g/mL. Esto significa que la citotoxicidad del AE fue casi 1000 veces menor que la doxorubicina (Figura 4).

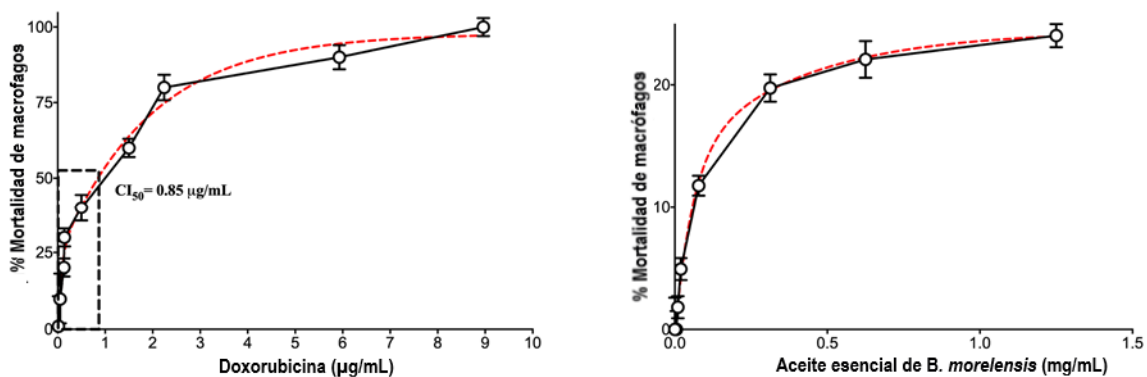


Figura 4. Citotoxicidad del aceite de *B. morelensis* en comparación con la citotoxicidad de la doxorubicina.

En cuanto a la prueba de irritación, se observó que la piel tratada con AE25 mostró un ligero enrojecimiento 12 horas después de la primera aplicación; posteriormente y alrededor de las 24 horas el enrojecimiento disminuyó. Transcurridas 72 horas no se detectó enrojecimiento de la piel, pero se pudo observar una ligera descamación (Figura 5). El análisis histopatológico de la piel de las heridas tratadas con AE25 mostró un aumento del número de células muertas, según la presencia de núcleos picnóticos. Además, se observaron detritos celulares en la epidermis de la piel tratada con AE25. Este aumento en la presencia de células en el área tratada es, probablemente, parte de una respuesta celular primaria para que este aceite sea reconocido como agente extraño. Del mismo modo, la presencia de detritos celulares podría indicar la actividad de los macrófagos (Figura 6).

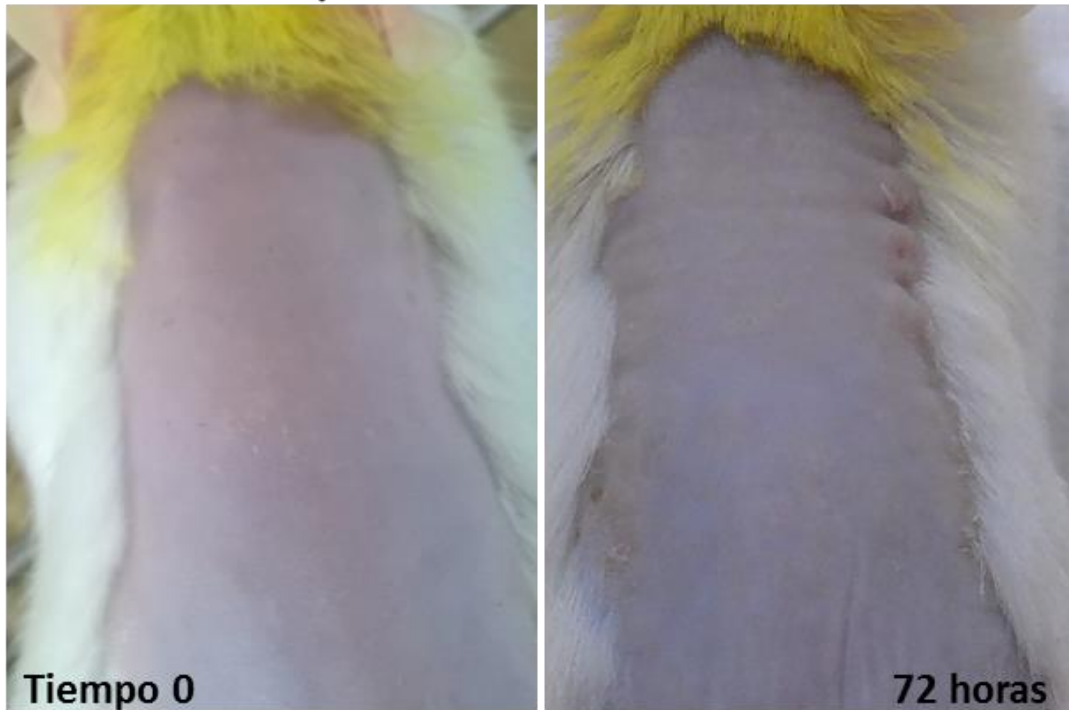


Figura 5. Apariencia de la piel en prueba preliminar de irritación. Tiempo 0: apariencia de la piel 24 horas después de la depilación y previa a la primera aplicación de AE de *B. morelensis* al 25%. 72 horas: apariencia de la piel transcurridas 72 horas posteriores a la primera aplicación de AE25 y con un total de 6 aplicaciones.

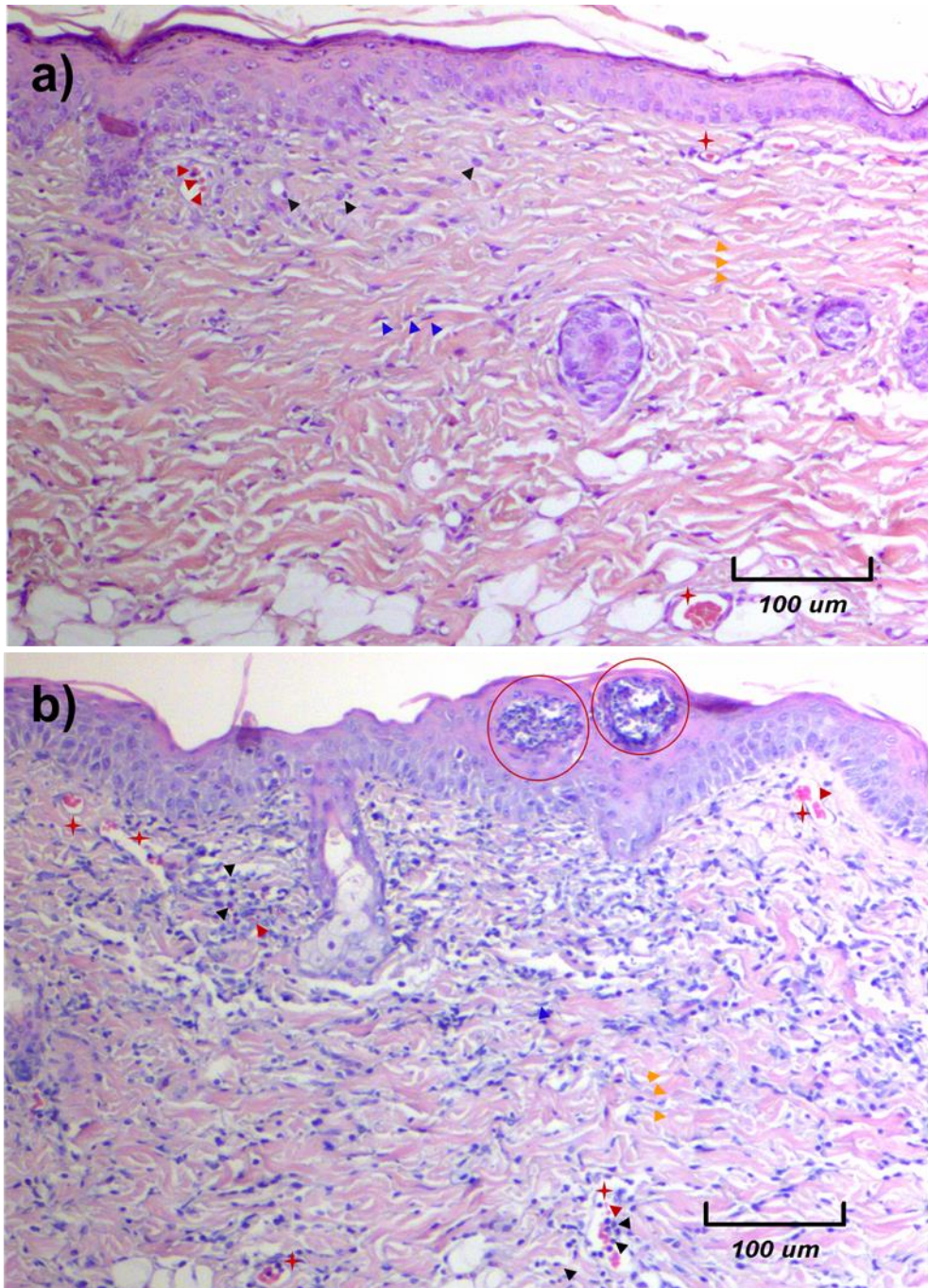


Figura 6. Histología de piel en tratamientos de prueba de irritación por 3 días. Las muestras se tiñeron con hematoxilina y eosina (H/E). (a) Control de muestras de pieles sanas no tratadas. (b) En pieles sanas tratadas con aceite esencial de *B. morelensis* al 25%. (AE25), Se observan detritos celulares (círculos rojos). Todas las fotos fueron tomadas con un aumento de 10X. ▶ Eritrocitos, ▶ fibras de colágeno, ▶ células basofílicas (Hematoxilina positiva), ▶ fibroblastos, + vasos sanguíneos.

8.3 Actividad cicatrizante

Dado que los resultados de citotoxicidad e irritación indicaron que se podía usar el aceite esencial de forma segura, se procedió a probar la actividad cicatrizante. Para

evaluar la EC, se hicieron heridas longitudinales en el dorso de los ratones; como se muestra en la Figura 5, todas las heridas habían cerrado después de 10 días; asimismo, en los ratones tratados con AE10 y terpenos, en general se observa una mejor apariencia de la piel, mientras que en los controles la cicatriz es más evidente, en el AE25 se observa una ligera descamación (Figura 7).

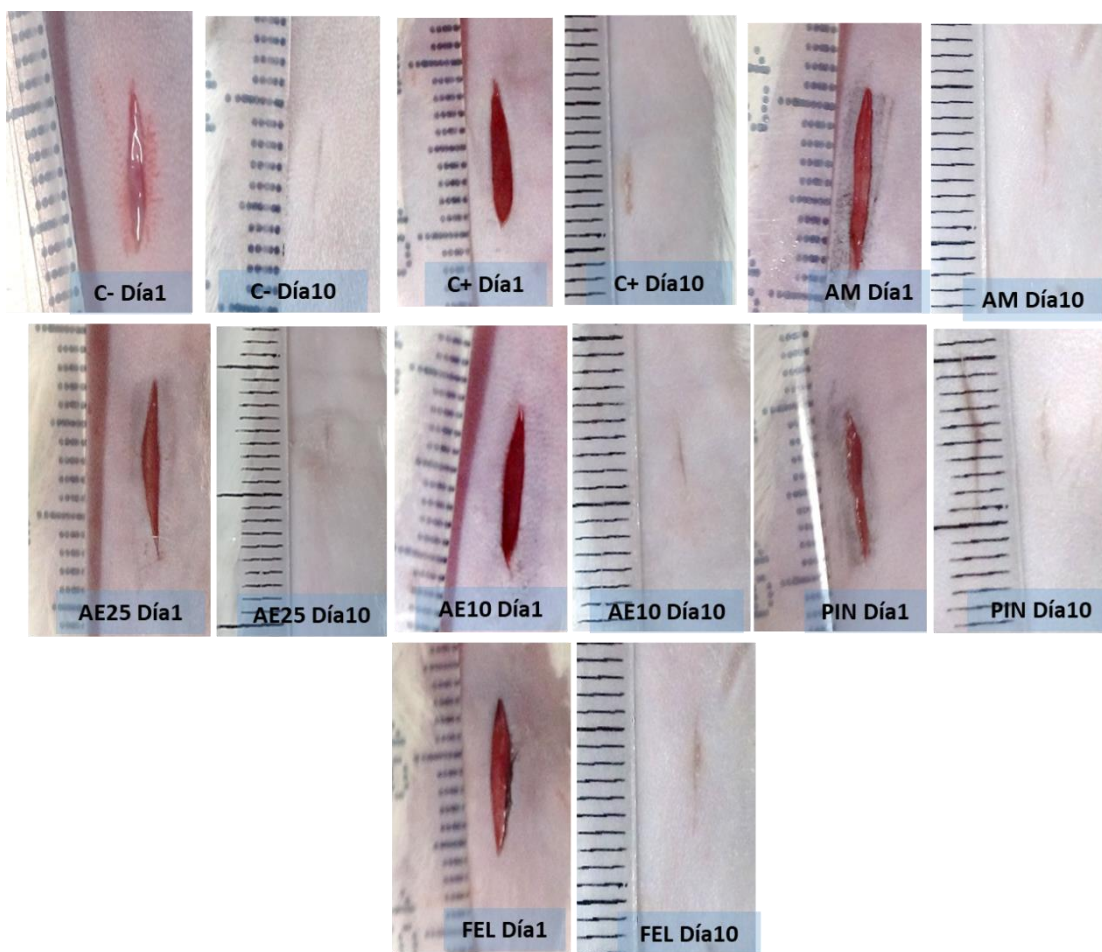


Figura 7. Apariencia de las heridas en el primer y último día de tratamiento de la prueba de eficacia de cicatrización (EC). Herida sin tratamiento (HST), control positivo (C +), AE [25%] (AE 25); Aceite esencial [10%] (AE 10) durante 10 días de tratamiento.

Transcurridos los diez días de tratamiento se midió el porcentaje de EC, para lo cual se utilizó la prueba tensiométrica, encontrando los siguientes resultados: herida sin tratamiento (C-) mostró 9.18% de EC, C+ 13.03%; mientras que los tratamientos con AE de *B. morelensis* arrojaron los siguientes resultados: AE10 20.3% y AE25 14.71%. Los resultados de EC para los tratamientos con los monoterpenos fueron los siguientes: PIN 21.16 y FEL 19.23% (Figura 8).

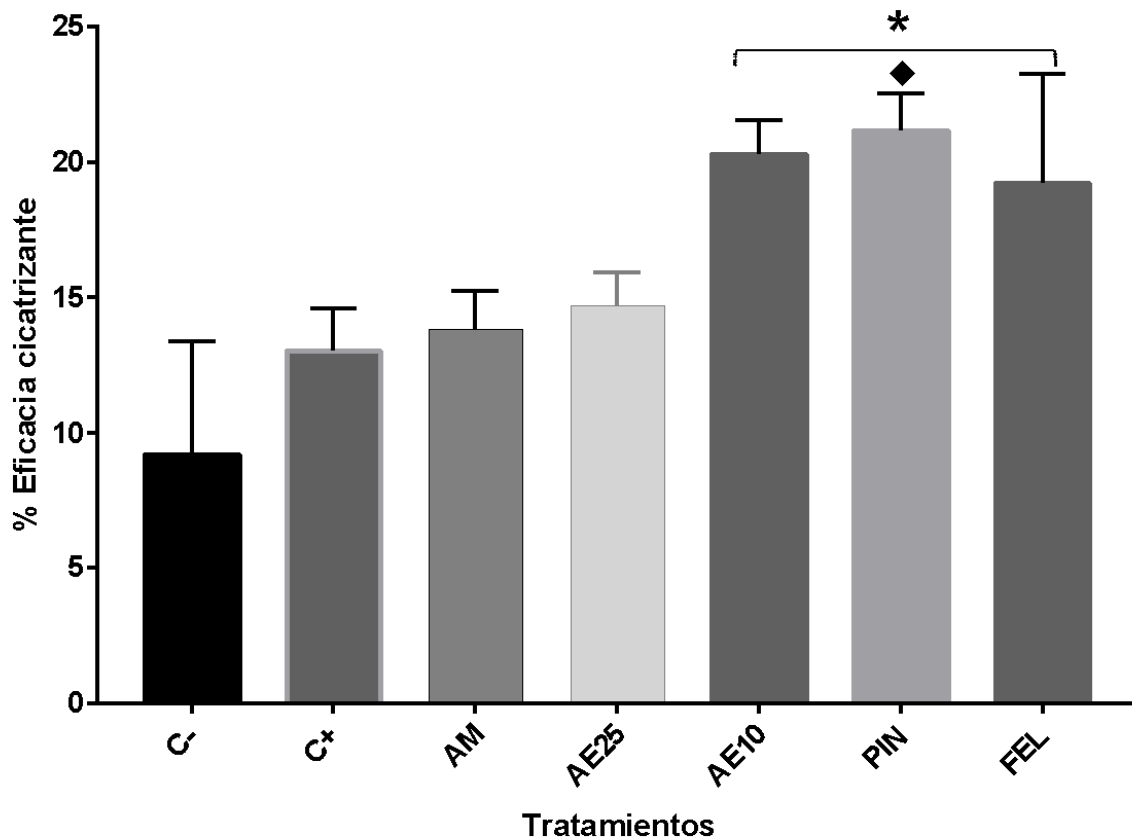


Figura 8. Gráfica de la eficacia de cicatrización (%EC) . C- Herida sin tratamiento. C+ control positivo Recoverón NC. AM vehículo, aceite mineral. AE10 aceite esencial al 10%. AE25 aceite esencial al 25%. PIN α - pineno al 9%. FEL α -felandreno al 1%. * Diferencia significativa con respecto a C-. • Diferencia significativa con respecto a C+. ◆ Diferencia significativa con respecto a AM. (P < 0.01).

Para evaluar la contracción de la herida y la velocidad de cierre de herida se utilizó un modelo de herida por incisión, midiendo el diámetro y calculando el porcentaje de cierre en el día 3, 5, 7, 9 y 10, encontrando que desde el día 3 los tratamientos con PIN y FEL mostraron los mayores porcentajes de cierre de herida. Se observó que las heridas tratadas con AE25 y AE10 tuvieron una velocidad de cierre mayor a la de los tratamientos control (C-, C+ y AM), mientras que Felandreno y pineno fueron los que produjeron un cierre con mayor velocidad (Figura 9).

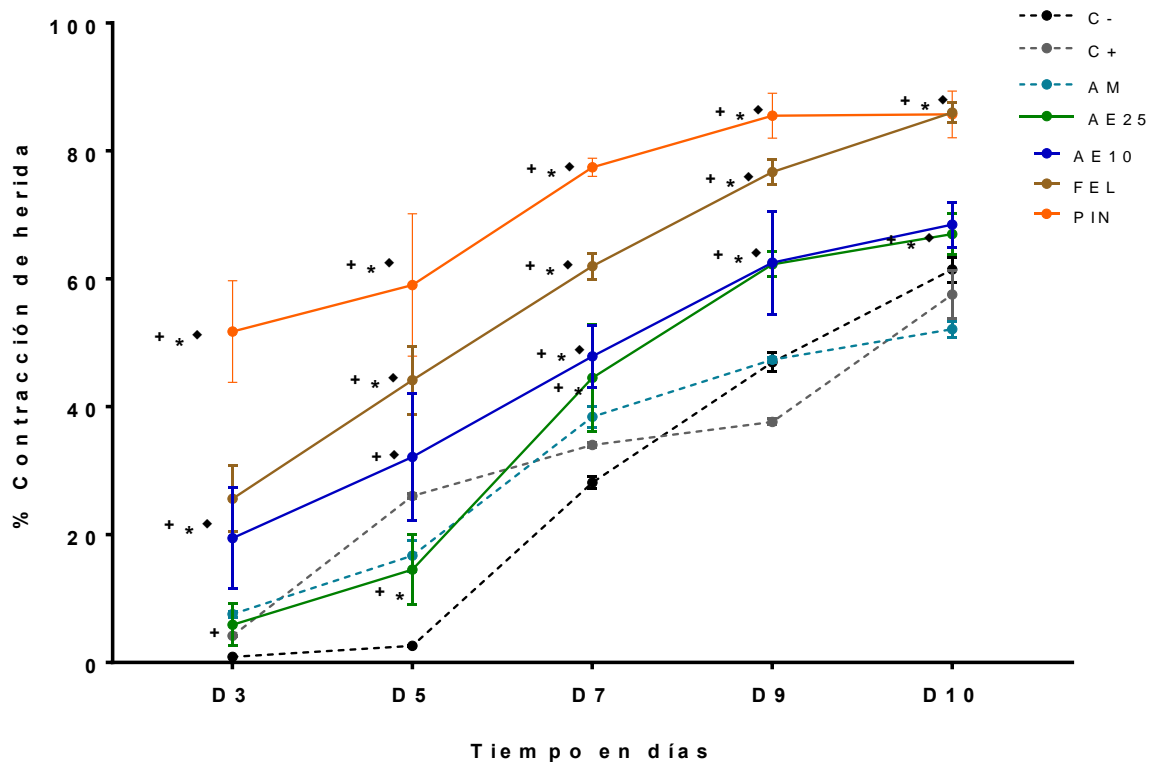


Figura 9. Gráfica de la velocidad de cierre de herida; diámetro de las heridas bajo diferentes tratamientos a lo largo del tiempo. C- Herida sin tratamiento. C+ control positivo Recoverón NC. AM vehículo, aceite mineral. AE10 aceite esencial al 10%. AE25 aceite esencial al 25%. PIN α - pineno al 9%. FEL α -felandreno al 1%. + Diferencia significativa con respecto a C-. * Diferencia significativa con respecto a C+. ♦ Diferencia significativa con respecto a AM. (P < 0.01).

Después de diez días de tratamiento, el porcentaje del CH fue el siguiente: C⁻ 45%; C⁺ 55.3%; AM 47%; AE25 67.64%, AE10 67.28%; PIN 85.25% y FEL 83.51%; encontrando diferencias significativas entre los tratamientos con AE y terpenos con el C⁻, C⁺ y AM; asimismo, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con AE10 y AE25 y PIN y FEL (Figura 10).

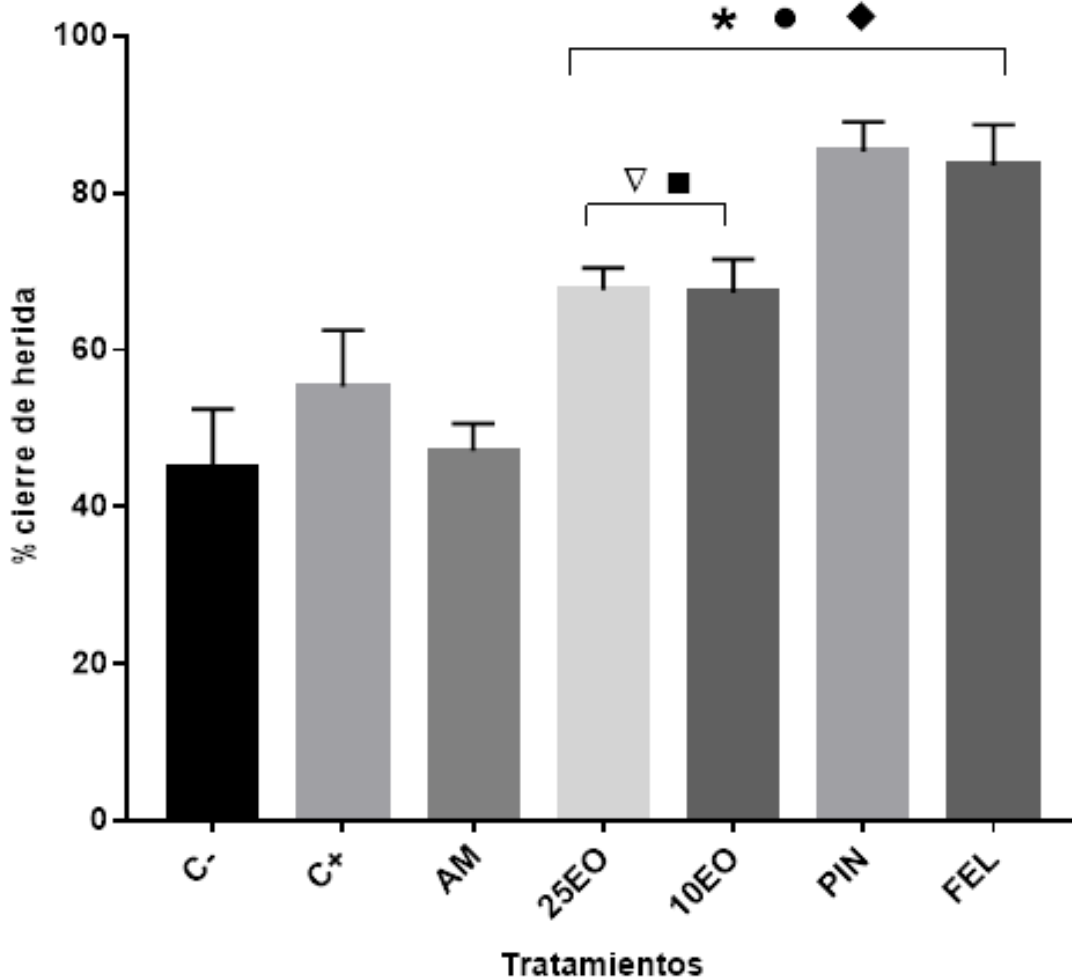


Figura 10. Gráfica de la contracción de herida; comparación de los diámetros de las heridas bajo diferentes tratamientos en el décimo día. C⁻ Herida sin tratamiento. C⁺ control positivo Recoverón NC. AM vehículo, aceite mineral. AE10 aceite esencial al 10%. AE25 aceite esencial al 25%. PIN α - pineno al 9%. FEL α -felandreno al 1%. * Diferencia significativa con respecto a C⁻. • Diferencia significativa con respecto a C⁺. ♦ Diferencia significativa con respecto a AM. ▽ Diferencia significativa con respecto a PIN. ■ Diferencia significativa respecto a FEL ($p < 0.01$).

Asimismo, en la Figura 11, se puede apreciar la apariencia de las heridas tratadas a lo largo del tiempo del experimento. En el día 10 los ratones de los tratamientos C⁻, y C⁺ presentaron costras, siendo los ratones C⁺ quienes presentaron las costras más grandes; por su parte, en los organismos tratados con ambas concentraciones de AE no hay presencia de costras y si una textura más homogénea; en el caso de los tratamientos con los terpenos, se observa que los extremos de las heridas se aproximaron ya que, al parecer, los terpenos actuaban como adhesivos manteniendo

unidos los extremos orientados de cabeza a cola; dando como resultado heridas con forma longitudinal (alargadas con dirección hombro a hombro del ratón) y, en consecuencia, cicatrices con esta forma.

La apariencia de las heridas coincide con el análisis histopatológico a los 10 días de tratamiento; donde se aprecia que en la PSH, con ambas tinciones (Hematoxilina-Eosina y tricrómica de Masson), las tres capas de la piel estaban claramente definidas, se pueden distinguir los folículos pilosos, glándulas, vasos sanguíneos, fibroblastos y núcleos de células azul-púrpura oscuro; con la tinción de Masson, las fibras de colágeno se aprecian de color azul uniforme, formando una red/matriz uniforme, donde se observan algunos de los fibroblastos (forma de huso) que producen el colágeno. En las micrografías de los tratamientos con AE se observó un aspecto más homogéneo de la piel, con una buena cantidad de colágena y entramados más complejos que en AM y C⁺; pero menos que HST. Se observa que en la estructura del tejido cicatricial de AM hay grandes huecos con formas esféricas, probablemente estos estuvieran rellenos con lípidos o con el propio AM, el cual fue disuelto por los solventes utilizados durante el procesamiento histológico. En C⁺ se puede observar con la tinción de Masson la presencia de infiltrado inflamatorio. Por último, en las micrografías tanto de PIN y FEL se observan invaginaciones de la epidermis, probablemente provocados por la aproximación de extremos de las heridas (Figura 12).

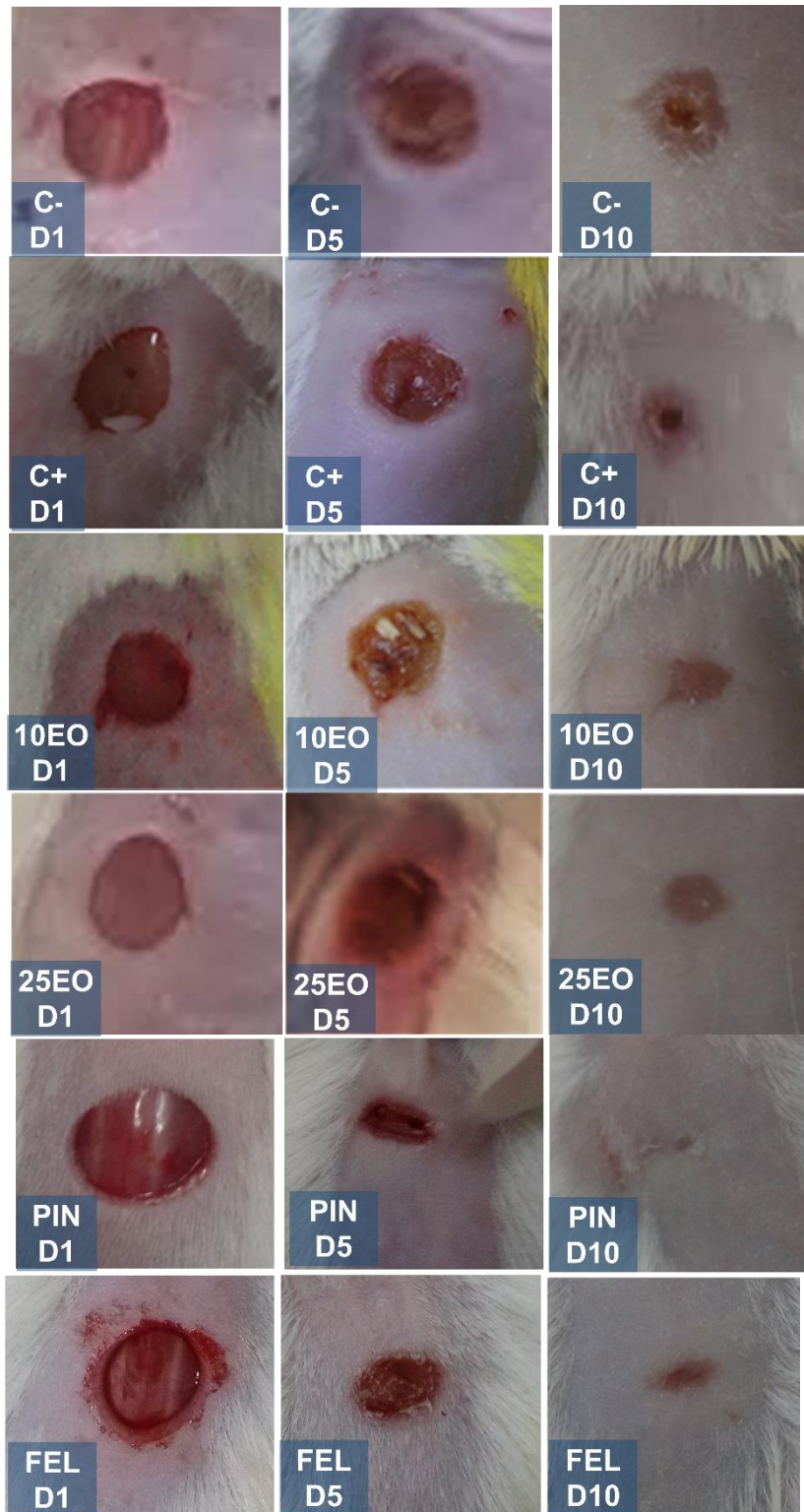


Figura 11. Apariencia de las heridas en el primer, tercero, quinto y último día de tratamiento de la prueba de contracción de herida (CH).

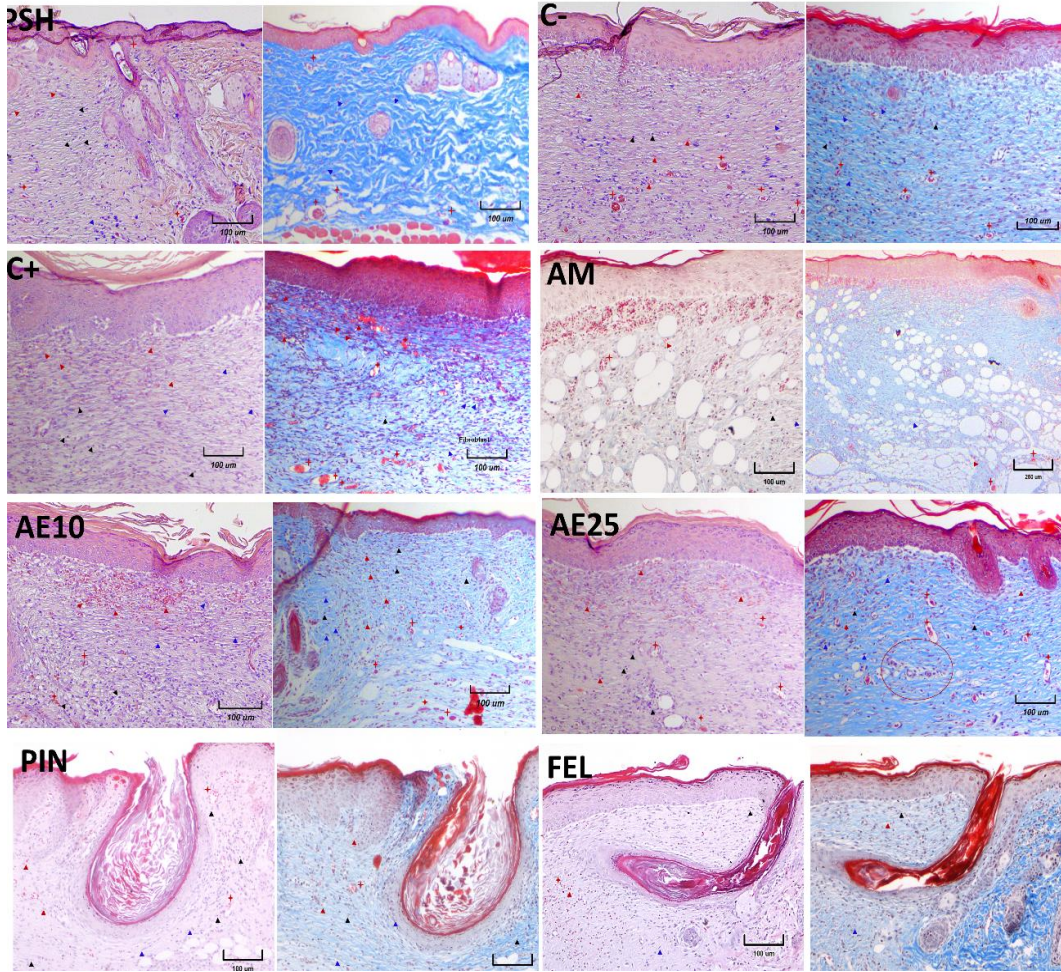


Figura 12. Histología de muestras de piel en el día 10 de tratamiento de la prueba de contracción e herida. Las muestras fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H-E) y Tricrómica de Masson. Todas las fotografías fueron tomadas con una magnificación de 10X. PSH piel sana. C- herida sin tratamiento. C+ Recuperación NC. AE10 aceite esencial al 10%. AE25 aceite esencial al 25%. ▶ Eritrocitos, ► células basófilas, ► fibroblastos, + vasos sanguíneos.

En el análisis histopatológico de los ratones tratados durante tres días, se observó en todos los tratamientos la presencia de costras e infiltrado inflamatorio, asimismo, se puede notar que en ningún caso se observa la arquitectura típica de la piel, ya que en tres días el proceso de reparación de herida es aún prematuro. Sin embargo, en las micrografías teñidas con tricromía de Masson se aprecia que en los tratamientos AE10, AE25, PIN y FEL, existen ligeros depósitos de colágena (fibras azules); asimismo, en las tinciones de H-E, se observa en PIN y FEL la presencia de epidermis incipiente, destacando la presencia de lo que parecen vasos sanguíneos. En C+, AE10, AE25, PIN y FEL es posible apreciar tejido de granulación inmaduro,

que consiste en macrófagos, linfocitos y fibroblastos gruesos, acompañados de brotes vasculares tempranos dentro del líquido edematoso (Figura 13).

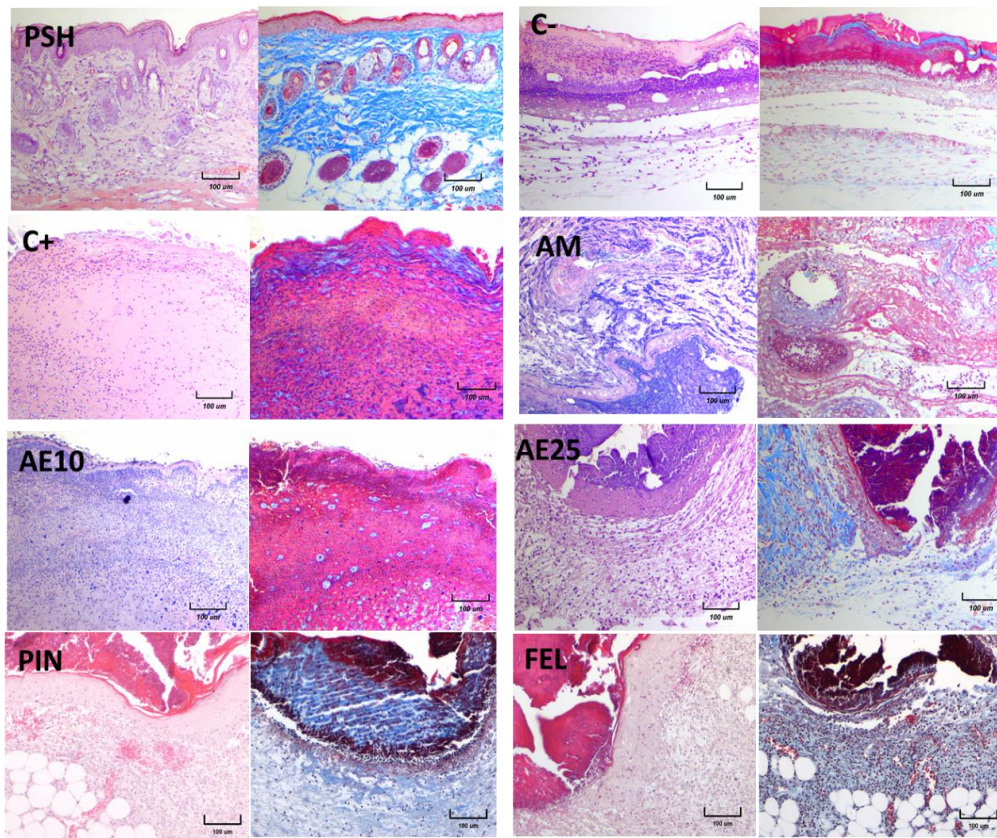


Figura 13. Histología de muestras de piel en el día 3 de tratamiento e la prueba de contracción e herida. **Las muestras fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H-E) y Tricrómica de Masson. Todas las fotografías fueron tomadas con una magnificación de 10X. PSH piel sana. C- herida sin tratamiento. C+ Recuperón NC. AE10 aceite esencial al 10%.**

8.4 Pruebas *in vitro* con fibroblastos

Una vez probada la actividad cicatrizante del AE de *B. morelensis*, se realizaron una serie de pruebas *in vitro*, para tratar de entender el mecanismo de acción. La primera de estas pruebas fue la de viabilidad celular, para ello, se aplicó en el ensayo de vida/muerte a los AHF, encontrando que a menor concentración de AE, mayor viabilidad celular, ya que en los tres tiempos el AE 0.01 mg/mL, muestra mayor cantidad de células en verde y menor cantidad de núcleos rojos; además se puede observar que la densidad celular aumenta conforme avanzan los días, lo que indica que los AHF y estimulados con AE 0.01 mg/mL, son propicios para el cultivo de fibroblastos (Figura 14).

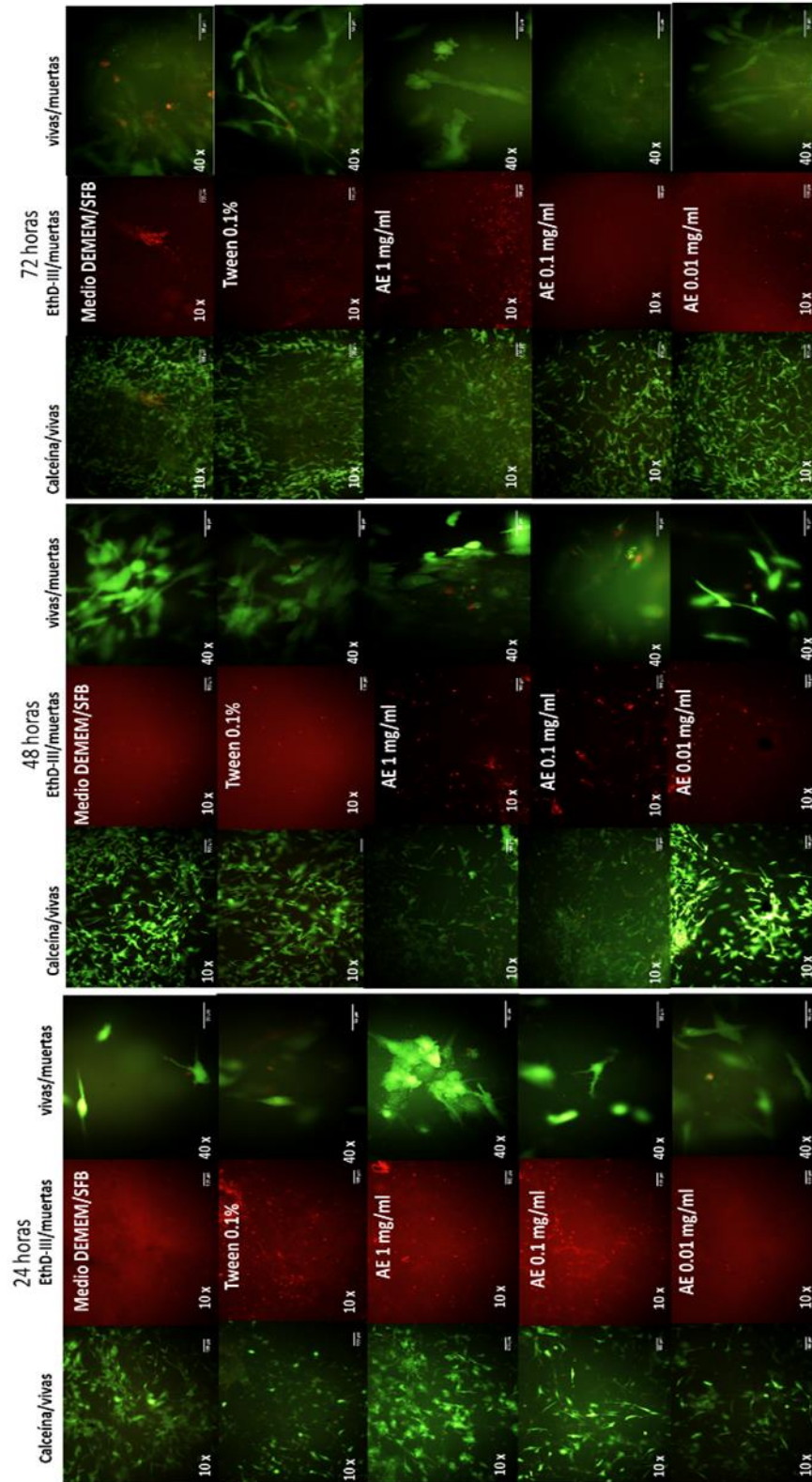


Figura 14. Ensayo de viabilidad celular, tinción vida/muerte sobre cultivo de fibroblastos en AHF, a las 24, 48 y 72 horas post-estímulo con AE 1, 0.1 y 0.01 mg/m.

La viabilidad mediante tinción de vida/muerte, también se probó en monocapa, después de 24 horas de haber aplicado los estímulos; en esta prueba, además del AE en tres concentraciones (1, 0.1 y 0.01 mg/mL), se aplicó FEL y PIN en dos concentraciones cada una (0.1 y 0.01 mg/mL). Con esta prueba corroboramos los resultados anteriores, que indican que el AE de *B. morelensis* no afecta la viabilidad de los fibroblastos, ya que se observan pocos núcleos rojos (células muertas), esto mismo ocurre con PIN y FEL en sus dos concentraciones (Figura 15).

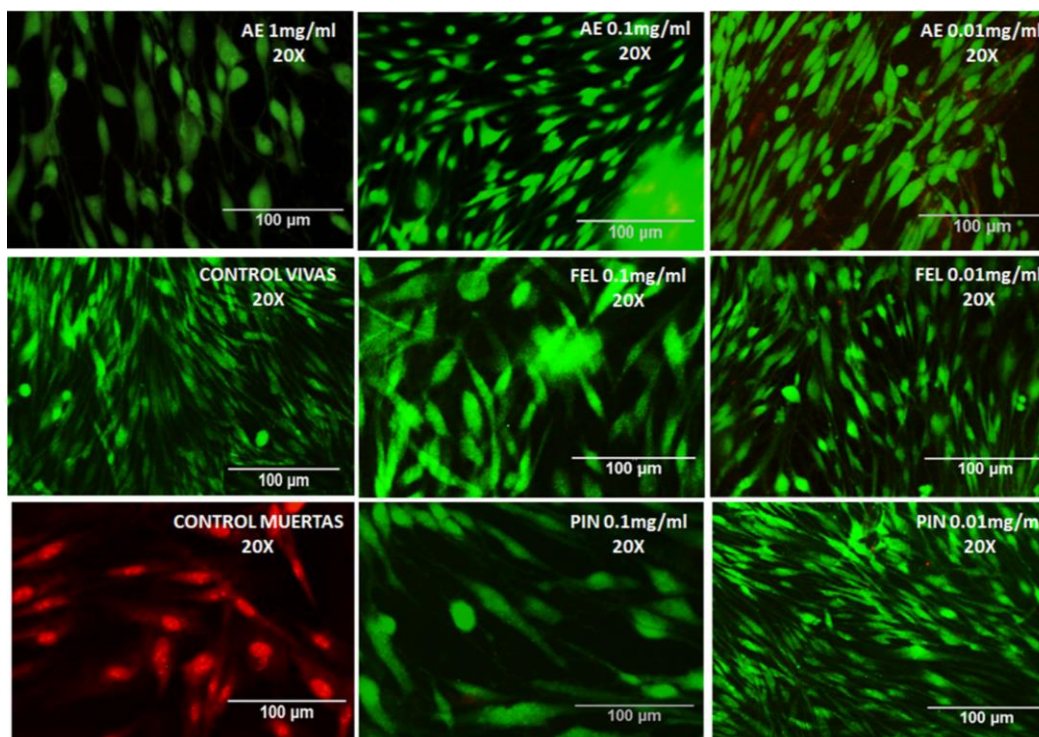


Figura 15. Ensayo de viabilidad, tinción vida/muerte sobre cultivo de fibroblastos en monocapa, a las 24 horas post-estímulo con AE 1, 0.1 y 0.01 mg/mL, PIN 0.1 y 0.01 mg/mL, FEL 0.1 y 0.01 mg/mL.

Una vez evaluada la viabilidad en cultivo monocapa y en AHF, la proliferación celular se evaluó mediante un ensayo PrestoBlue, donde la absorbancia es directamente proporcional a la proliferación celular. Como se muestra en la Figura 16, la absorbancia aumentó proporcionalmente con respecto al número de días en cultivo para los fibroblastos en los AHF. Además, a las 24 horas de cultivo, no hubo diferencias en la tasa de proliferación de los estímulos. Para las 48 horas la absorbancia de los estímulos con aceite disminuyó, lo que podría indicar una no muy drástica disminución en la actividad metabólica de estas células, ya que a las 72

horas hubo un aumento claro de la absorbancia en todos los estímulos; lo cual, indica proliferación celular.

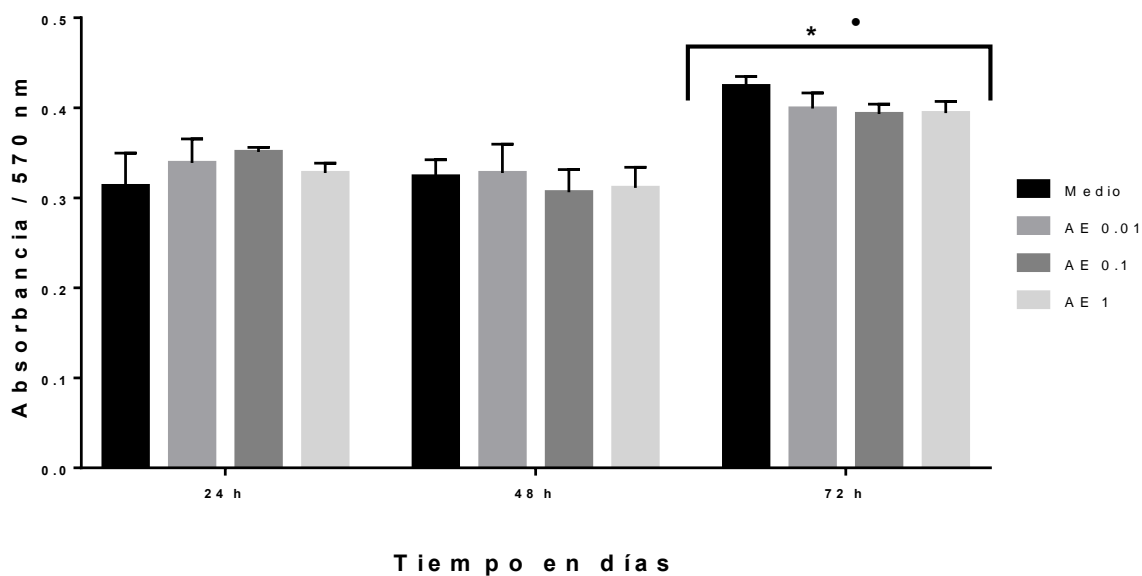


Figura 16. Ensayo de proliferación celular en andamios de hidrogel de fibrina (AHF). La absorbancia de resazurina indica la proliferación de fibroblastos en AH, con control de absorbancia de fibrina sin células y Tween. Los estímulos aplicados: Medios DMEM suplementado, AE 0.01 mg/mL; AE 0.1 mg/mL y AE 1 mg/mL. A las 24, 48 y 72 h. * Diferencias significativas con respecto a 24 horas de crecimiento de cada estímulo. • Diferencias significativas con respecto a 48 horas de crecimiento de cada estímulo ($p < 0.01$).

En cuanto a la proliferación en monocapa, el ensayo con PrestoBlue, se encontró que la absorbancia aumentó conforme avanzaron las horas. Es evidente que mayor concentración de AE menor proliferación de fibroblastos, esto se ve en la Figura 17 donde las barras que corresponden al AE 1 mg/mL son las más pequeñas, aunque se pudo ver un incremento de la absorbancia a lo largo del tiempo, esta absorbancia permaneció siempre por debajo de las barras del control de crecimiento con medio DMEM suplementado.

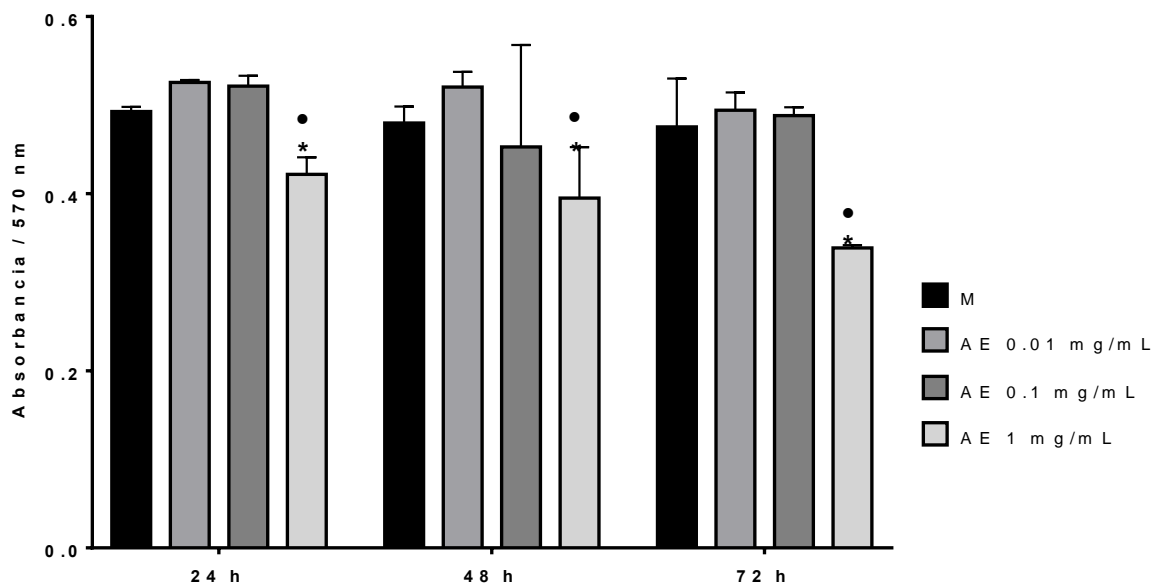


Figura 17. Ensayo de proliferación celular de cultivos de fibroblastos tratados con diferentes concentraciones de AE en monocapa. La absorbancia de resazurina indicó la proliferación de fibroblastos con control de absorbancia con medio más Tween. Los estímulos aplicados: M: medio DMEM suplementado; AE 0,01 mg / ml; AE 0,1 mg / ml y AE 1 mg / ml. * Diferencias significativas con respecto a M. • Diferencias significativas con respecto a AE 0.01 ($p < 0.01$).

En la prueba de proliferación, donde los estímulos fueron los terpenos, también se encontró que a mayor concentración de PIN o FEL hay menor absorbancia y, consecuentemente, menor proliferación. Cabe señalar que los terpenos, en todas las concentraciones, muestran un importante aumento en la absorbancia después de 24 horas de tratamiento; aunque en ningún caso supera al control de crecimiento (DMEM suplementado). Adicionalmente y como dato muy interesante, se observó que el estímulo con PIN 0.01 alcanzó valores de absorbancia muy parecidos a los del control de crecimiento a partir de las 48 horas (Figura 18).

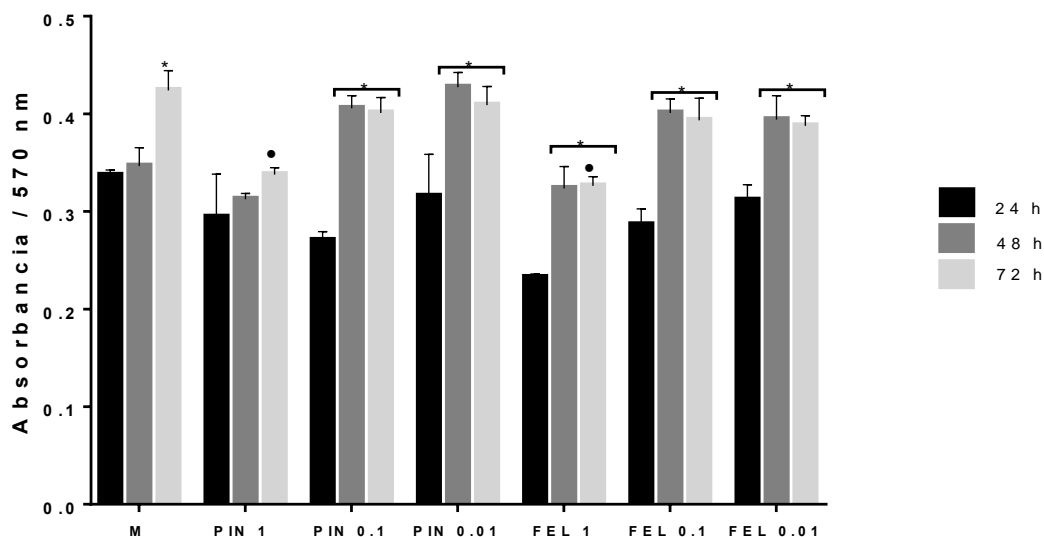


Figura 18. Ensayo de proliferación celular de cultivos de fibroblastos tratados con diferentes concentraciones de PIN y FEL. en monocapa. La absorbancia de resazurina indica la proliferación de fibroblastos. Los estímulos aplicados a las 24, 48 y 72 h: M: medio DMEM suplementado, PIN 1: α -pineno 1 mg / mL; PIN 0,1: α -pineno 0,1 mg / ml; PIN 0,01 α -pineno 0,01 mg / ml; FEL 1: α -felandreno 1 mg / ml; FEL 0,1: α -felandreno 0,1 mg / ml; FEL 0.01: α -felandreno 0.01 mg / mL * Diferencia significativa con respecto a las 24 horas de cada estímulo. • Diferencia significativa con respecto al crecimiento a las 72 horas de M (medio de crecimiento). (p <0,01).

Dadas nuestras observaciones en el primer experimento de migración, se corrió un segundo ensayo, para el cual las células fueron teñidas con fluorescencia, se utilizó una concentración de AE igual a 0.001 mg/mL. En la Figura 20 se observa claramente que a las 24 horas hay migración a la zona de herida, en la placa con AE se puede observar, además, que esta migración es muy localizada, observándose un cúmulo de células en los extremos de la herida que se van introduciendo en el espacio vacío.

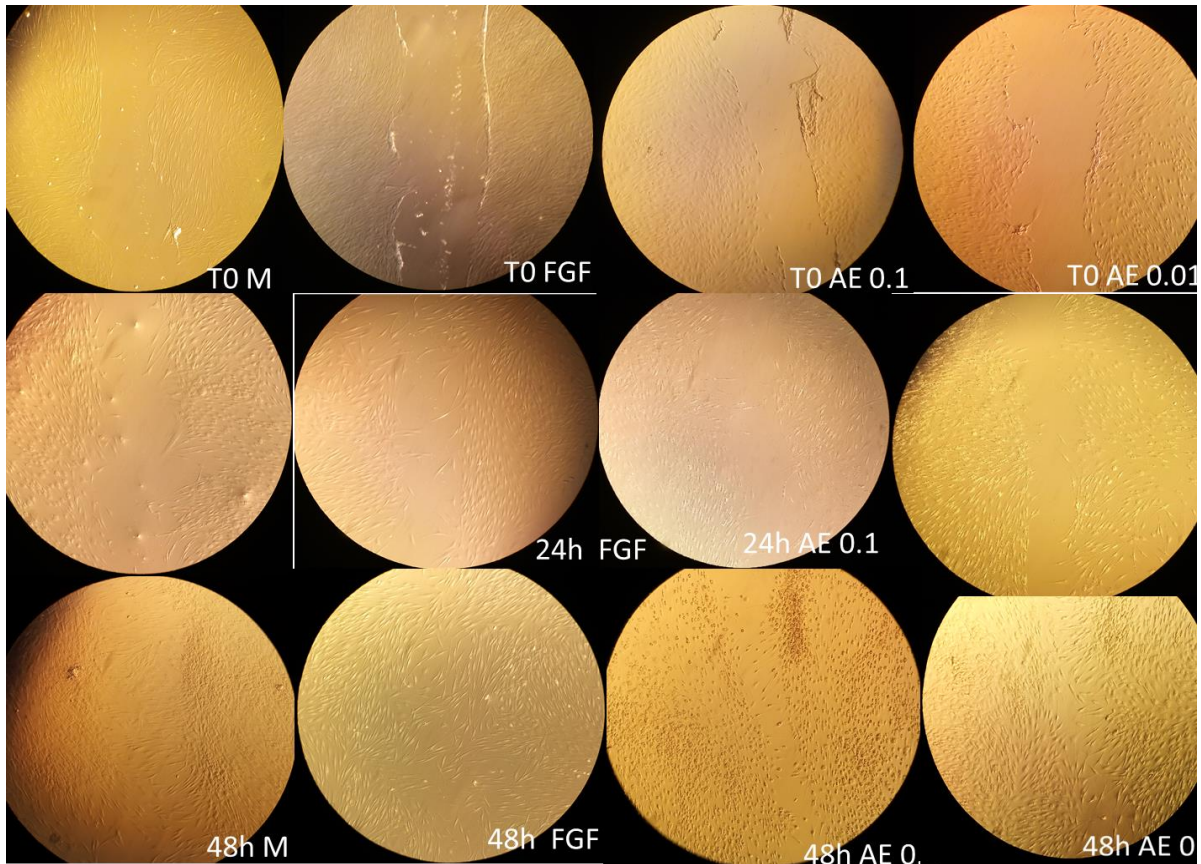


Figura 19. Ensayo de migración celular, cultivos de fibroblastos en monocapa tratados con AE. Se simuló una herida en el centro de la monocapa y enseguida fueron aplicados los estímulos: M: medio DMEM suplementado; FGF: factor de crecimiento de fibroblastos; AE: 0.1 y 0.01 mg/mL. Las fotografías corresponden al tiempo 0 (inmediatamente después haber infringido la herida). A las 24 horas y a las 48 horas posteriores a la aplicación de estímulos.

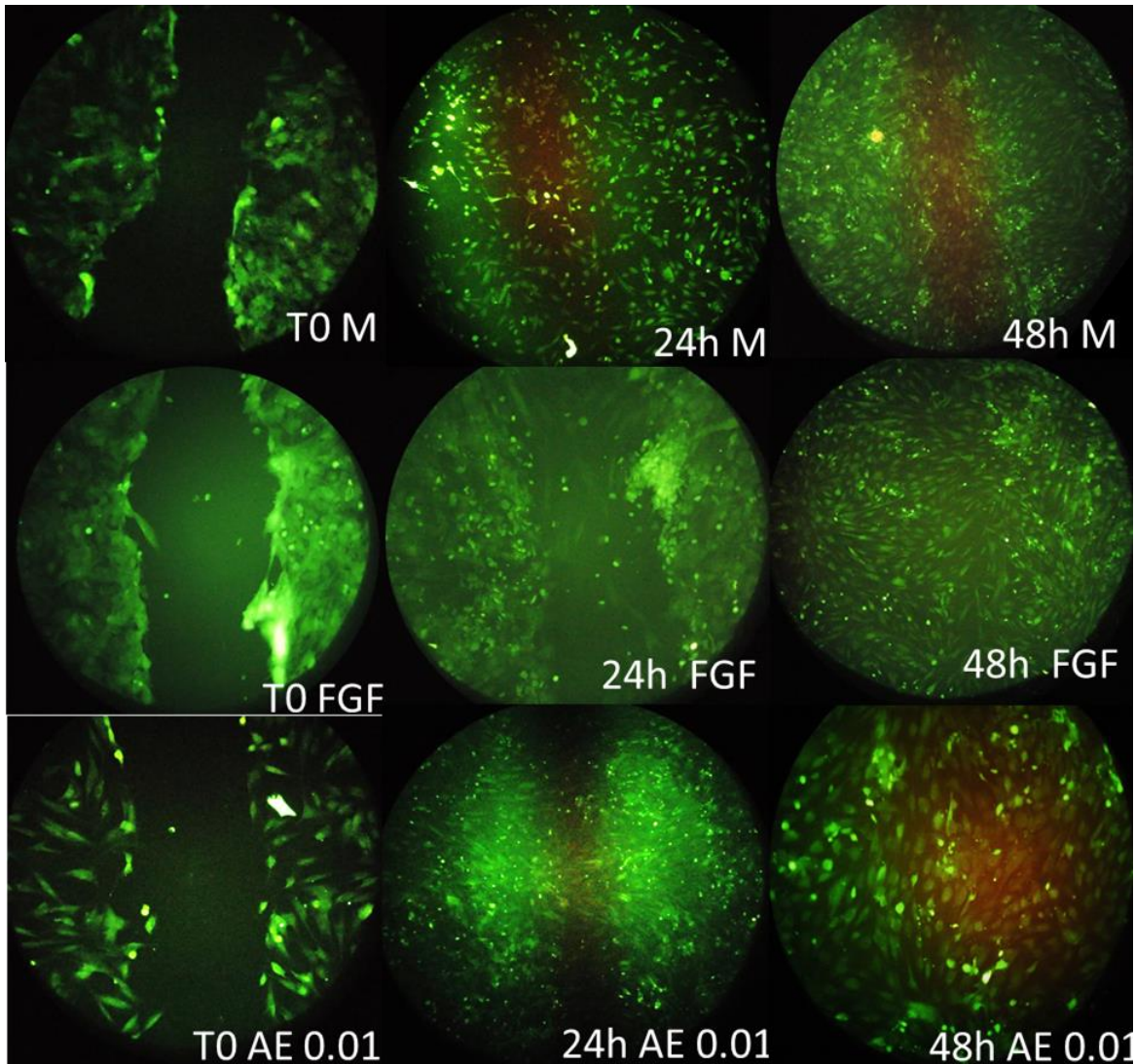


Figura 20. Ensayo de migración en cultivos en monocapa de fibroblastos teñidos con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE). Se simuló una herida en el centro de la monocapa y enseguida fueron aplicados los estímulos: M: DMEM suplementado; FGF: factor de crecimiento de fibroblastos; AE: 0.01 mg/mL. Las fotografías corresponden al tiempo 0 (inmediatamente después haber infligido la herida). A las 24 horas y a las 48 horas posteriores a la aplicación de estímulos.

Para verificar que el AE promueve la migración de fibroblastos, se llevó a cabo el ensayo de migración en AHF, utilizando un doble andamiaje, dentro de andamios polymerizados en placas de 6 pozos, se incluyeron un par de pozos separados a 1 mm de distancia entre sí, en uno de estos andamios había células teñidas con fluorescencia, mientras que, en el otro se agregó uno de los tres estímulos: DMEM suplementado, FGF y AM 0.01 g/mL. En las imágenes se observa que, a las 24 horas, los fibroblastos comenzaron a salir del primer andamiaje extendiéndose en

dirección a donde estaba el estímulo, siendo particularmente evidente en el AE (Figura 21).

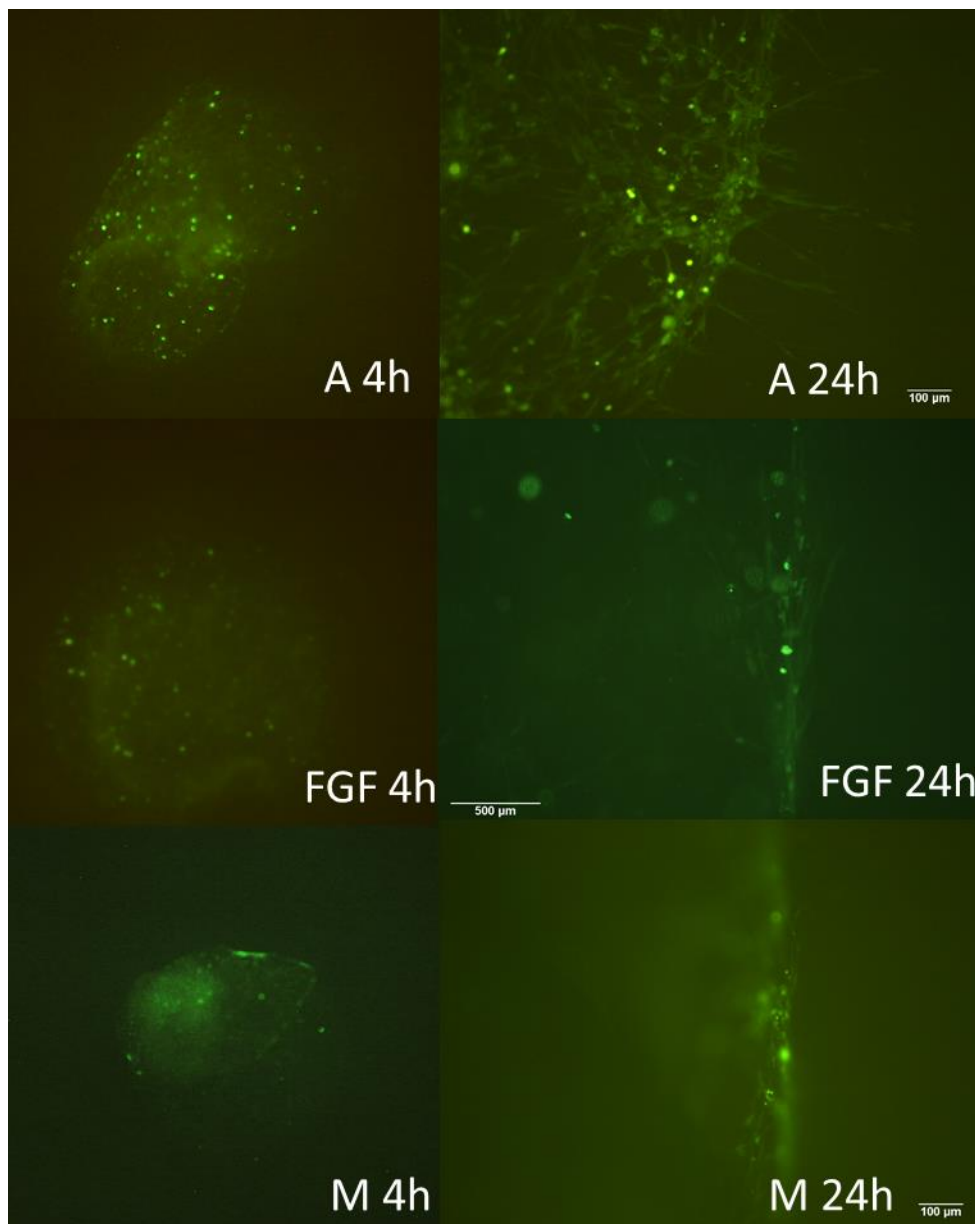


Figura 21. Modelo de migración en cultivos celulares en andamiso de hidrogel de fibrina (AHF) con fibroblastos teñidas con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE), a las 4 horas y 24 horas posteriores al montaje de los andamios,

9.0 DISCUSIÓN

El rendimiento del AE fue de 0.19%; los rendimientos de extracción dependen del tipo de especie y de los segmentos de plantas utilizados, pero un rendimiento muy bajo, como el 1%, puede ser muy valioso cuando contiene componentes raros (Aziz et al., 2018).

Respecto a la composición química del AE, se ha encontrado que varios de sus componentes principales están presentes en la composición de AE de otras plantas con actividades biológicas probadas; tal es el caso del más abundante de los terpenos en el AE de *B. morelensis*, el *p*-mentano, el cual es uno de los principales terpenos presentes en el AE de *Mentha crispata*, del cual, recientemente, se descubrió que tiene actividad antiparasitaria en *Trypanosoma brucei* (de Sousa et al., 2016); Asimismo, ha sido reportado un isómero de *p*-mentano (*m*-mentano) en la AE de *Jatropha neopauciflora* (Pax), que se ha confirmado actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholera* (Hernández-Hernández et al., 2016). El segundo compuesto en abundancia fue el β -felandreno, que se ha identificado en AE de especies de pino como *Juniperus formosana* (Guo et al., 2016); así como el AE de *Zanthoxylum bungeanum*, un aceite que tiene potencial en el tratamiento de la psoriasis (Li et al., 2016). El α -pineno es el principal constituyente de la resina de *Pistacia atlantica*, que ha sido utilizada para tratar quemaduras, mostrando un aumento de la concentración del factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF) y del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), además, aumenta la angiogénesis (Haghdoost et al., 2013). El α y el β -pineno están presentes en la composición del AE de *Salvia officinalis*, tienen actividad antiinflamatoria *in vitro* debido a la inhibición de la producción de óxido nítrico (ON) en macrófagos de ratón (Abu-Darwish et al., 2013). En pruebas *in vitro*, se encontró que el cariofileno y el óxido de cariofileno inhiben la genotoxicidad de un condensado de humo de cigarrillo (Di Giacomo et al., 2017). El cariofileno del AE de *Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte tiene propiedades anticancerígenas, antioxidantes y antimicrobianas (Dahham et al., 2015). El β -mirceno, administrado por vía oral a animales experimentales, demostró una actividad protectora importante en un modelo de úlcera gástrica (Bonamin et al., 2014). El sabineno ha

revelado una fuerte actividad antiinflamatoria mediada por la inhibición de la producción de óxido nítrico (ON) en macrófagos (Valente et al., 2013). Finalmente, el *p*-cimeno fue uno de los principales compuestos identificados en el aceite de tomillo y se evidenció su capacidad para prevenir la peroxidación lipídica (Burkovská et al., 2007).

Para identificar citotoxicidad del AE de *B. morelensis* se realizó una prueba de citotoxicidad, utilizando doxorubicina como control positivo, encontrando que la citotoxicidad del AE fue casi 1000 veces menor que la doxorubicina (Figura 3); lo anterior se debe a que la doxorubicina es uno de los antibióticos de antraciclina más eficaces, con un amplio espectro antitumoral (Chhikara et al., 2011). Se ha reconocido que varios componentes del AE actúan como moléculas de múltiples objetivos. Con el fin de desarrollar nuevos fármacos antitumorales, se ha demostrado que varios AE tienen una alta eficacia contra las células cancerosas humanas y una baja toxicidad para las células humanas normales. Se ha encontrado que algunos componentes de AE, como los terpenos, son eficaces contra una amplia gama de cánceres, por ejemplo, geraniol, D-limoneno y otros monoterpenos (Stringaro et al., 2018).

Los resultados de citotoxicidad y de la prueba de irritación, donde se encontraron alteraciones menores en el análisis histopatológico (células picnóticas y actividad de macrófagos, Figura 5), indican que la AE de *B. morelensis* se puede usar en la aplicación tópica para heridas; debido a que a una concentración de 1.2 mg/mL, sólo el 24% de los macrófagos peritoneales fueron inhibidos, en comparación con la doxorubicina, donde la CI_{50} fue = 0.85 μ g/mL, esto mostró que el AE a la concentración probada no fue citotóxico.

En cuanto a la actividad cicatrizante, los resultados muestran que ambos tratamientos con AE y con terpenos tienen una mejor estructura del tejido cicatricial y un mayor depósito de colágeno (Figura 11); además, el análisis histopatológico de las heridas tratadas por tres días, mostró que en aquellas donde se aplicó AE en ambas concentraciones y PIN y FEL, presentaron ligeros depósitos de colágena (figura 12), esto es muy importante porque el proceso de reparación de heridas

depende de la biosíntesis, la deposición del colágeno y su maduración (Sawatdee et al., 2016).

Es probable que estos depósitos de colágena, en las heridas tratadas con AE10, AE25, PIN y FEL le dieran la resistencia a la tensión a las cicatrices formadas, ya que la estructura de la piel está diseñada para minimizar el estrés en el tejido, por lo que se deforma con el movimiento o por fuerzas externas; asimismo, se ha descrito como las diferentes densidades de colágeno en la dermis papilar, la dermis reticular y la hipodermis aseguran que la piel pueda extenderse en cualquier dirección cuando se aplica una fuerza; la piel también se contrae en un plano en ángulo recto con una reducción progresiva del volumen en la muestra estirada (Johnson et al., 1993).

Además de la acumulación de colágena el entramado de las fibras presentes en los tratamientos de AE y terpenos, también debe haber influido en la EC, ya que el ensamblaje de la red de colágena se entrelaza cuidadosamente para que sea posible tirar en cualquier dirección; sin embargo, hay una anisotropía favorecida, que se puede aplicar más estiramiento antes de que se alcance una meseta mecánica y un punto final, esta es una característica importante que se debe entender al tratar de cerrar las heridas de la piel, la cual puede adaptarse a estas fuerzas mediante la relajación mecánica de las fibras de colágeno y la remodelación biológica de la estructura fibrosa, lo que da lugar a una "fluencia" mecánica y biológica, respectivamente (Wong et al., 2016).

La colágena depositada por los fibroblastos también influye en la contracción de la herida y en la velocidad de cierre, ya que cuando los tejidos se rompen, después de una lesión, se necesita colágeno para reparar el defecto y restaurar la estructura y función anatómica. Si se deposita demasiado colágeno en el sitio de la herida, se pierde la estructura anatómica normal, se compromete la función y se produce fibrosis. A la inversa, si se deposita una cantidad insuficiente de colágeno, la herida es débil y puede abrirse (Diegelmann and Evans, 2004).

La contracción es parte del proceso normal de curación, pero si es excesiva, se vuelve patológica y se conoce como contractura. Básicamente, todas las heridas dérmicas se curan mediante tres mecanismos elementales: deposición de matriz de tejido conectivo, contracción y epitelización (Nedelec et al., 2000). En el modelo de herida por incisión, encontramos que la mayor velocidad de cierre (Figura 8) y la mayor CH (Figura 9) se dio en los tratamientos con PIN y FEL; nuestras observaciones, a lo largo de la aplicación de estos tratamientos, nos permitieron notar que los terpenos causaban un efecto adhesivo (suave) sobre la piel, lo que pudo generar sobre las heridas un efecto de curación de intención primaria; es decir, aquellas heridas simples que pueden cerrarse por sutura, cintas adhesivas o grapas (Heal et al., 2016).

El principal mecanismo de curación durante la intención primaria es la deposición de la matriz del tejido conectivo, donde el colágeno, los proteoglicanos y las proteínas de unión se depositan para formar una nueva matriz extracelular. En contraste, las heridas que permanecen abiertas se curan principalmente por contracción; la interacción entre las células y la matriz provoca el movimiento del tejido hacia el centro de la herida (Tomasek et al., 2002). Esto se puede ver también en la histología, ya que en las micrografías de tres días de PIN y FEL, se aprecia que muy próxima a las invaginaciones en el tejido cicatricial, hay tejido sano que, incluso, parece deslizarse dentro de la cicatriz.

Lo anterior, sumado a la actividad antibacteriana y antifúngica de la AE de *B. morelensis*, puede ser, en parte, responsable de los resultados que se muestran aquí, ya que, debido a sus características lipofílicas, el AE permea las membranas plasmáticas de bacterias y hongos, generando desequilibrios iónicos en el potencial de membrana, incluso, en la respiración mitocondrial, causando colapso celular (Canales-Martínez et al., 2017). En nuestro grupo de trabajo, se ha demostrado que el AE de *B. morelensis* altera la expresión del gen que codifica la integrina INT1p. Esto es muy importante, ya que se sabe que las integrinas son clave en la adhesión de *C. albicans*; además, el AE inhibió el crecimiento del tubo germinal y causó la

pérdida de la integridad de la membrana celular de esta levadura (Rivera-Yañez et al., 2017).

Por otro lado, creemos que la regulación de la respuesta inflamatoria puede ocurrir por la reparación de la herida, ya que se ha demostrado que este AE tiene actividad antiinflamatoria cuando se usa, en forma tópica, para tratar el edema plantar en ratas (Carrera-Martínez et al., 2014). Aún más, varios de sus componentes han sido identificados como agentes antiinflamatorios que inhiben la producción de ON (Abu-Darwish et al., 2013; Di Giacomo et al., 2017; Dahham et al., 2015; Bonamin et al., 2014; Valente et al., 2013), mientras que otros aumentan la producción de agentes esenciales para la reparación de heridas como el FGF y el PDGF, y favorecen la angiogénesis (Abu-Darwish et al., 2013) y la actividad antioxidante, que puede tener un efecto protector contra el estrés oxidativo generado durante la etapa inflamatoria (Dahha et al., 2015; Burkovská, et al., 2007). Recientemente, se demostró que el α -felandreno también inhibe el rodamiento y la adhesión de los leucocitos y la producción de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-6, así como la desgranulación de los mastocitos inducidos por el compuesto 48/80 (polímero producido por la condensación de N-metil-p-metoxifenetilamina con formaldehído. Promueve la liberación de histamina); lo que sugiere que el α -felandreno juega un papel importante como agente antiinflamatorio a través de la modulación de la migración de los neutrófilos y la estabilización de los mastocitos (Siqueira et al., 2016).

Ya que las pruebas en el modelo murino demostraron actividad cicatrizante, se corrieron una serie de pruebas *in vitro*, con la intención de aproximarnos al mecanismo de acción por el cual el AE de *B. morelensis* contribuye al proceso de cicatrización. Los resultados del ensayo de viabilidad celular (vida/muerte, Figuras 13 y 14) coinciden con los resultados de citotoxicidad en macrófagos (Figura 4), en el sentido de una muy baja citotoxicidad del AE de *B. morelensis* y su dependencia con la concentración; también con la prueba de viabilidad se demostró que los terpenos PIN y FEL tienen una baja citotoxicidad y que esta es dependiente de la concentración. Por otro lado, las pruebas de proliferación demostraron que, ni el AE

ni los terpenos PIN y FEL estimulan la proliferación de fibroblastos en cultivos en monocapa ni en cultivos en AHF (Figuras 15-17). Finalmente, los resultados de migración de fibroblastos, tanto en AHF como en monocapa, sugieren que el AE promueve la migración de fibroblastos (Figuras 18 y 19).

Otros compuestos naturales han sido analizados por su actividad de curación de heridas. Por ejemplo, se sabe que un triterpeno llamado asiaticosido, el cual es un componente importante en los extractos de *Centella asiatica*, ha sido designado como un compuesto prioritario en la actividad curativa de esta planta, debido a su actividad antimicrobiana y su capacidad para reducir los niveles de lipoperoxidación y activar células de la capa de malpighiana de la epidermis (Siqueira et al., 2016). Además, se ha demostrado que el aceite esencial de *Pinus pinaster*, cuyo componente principal es el α -pineno, tiene actividad antioxidante, antiinflamatoria y de reparación de heridas, que muestra una buena resistencia a la tracción en modelos *in vivo*. En pruebas *in vitro*, este aceite esencial mostró una cierta capacidad inhibitoria de las enzimas colagenasa, elastasa y hialuronidasa, mismas que están relacionadas con la remodelación de cicatrices (Tümen et al., 2018).

El conjunto de resultados obtenidos en este trabajo, permiten sugerir que un mecanismo de acción probable del AE de *B. morelensis*, durante el proceso de cicatrización, es la promoción de la migración de fibroblastos al sitio de la herida; haciéndolos activos en la producción de colágena en etapas tempranas, y más tarde, promueve la remodelación de esta colágena, ya que se sabe que durante el proceso de reparación de una herida, las células endoteliales y los fibroblastos migran al sitio y acumulan tejidos de granulación depositando colágena y otras matrices extracelulares. Durante las etapas finales de reparación, los fibroblastos remodelan el colágeno mediante la producción de metaloproteinasas de matriz (MMP) a lo largo de varios meses (Hong et al., 2013).

10.0 CONCLUSIONES

- Se extrajo AE de *B. morelensis* con un rendimiento de 0.19%.
- Se identificaron 18 compuestos en el aceite esencial de *B. morelensis*; los compuestos mayoritarios fueron: *p*-Mentano (38.41%), β -Felandreno (35.25%); α -Pino (8.37%), cariofileno (5.19%), β -Mirceno (3.6%), Sabineno (3.54%) y *p*-Cimeno (2.1%).
- La toxicidad del AE, PIN y FEL presentan una muy baja citotoxicidad y es dependiente de la concentración.
- La mayor eficacia cicatrizante la presentaron los tratamientos con PIN (21.16%) y FEL (19.23%). Seguido por AE10 (20.3%) y AE25 (14.71).
- PIN y FEL presentaron la mayor velocidad de cierre, siendo esto evidente desde el tercer día de tratamiento.
- La mayor contracción de herida la presentaron los tratamientos con α -pino (85.25%) y α -felandreno (83.51%). Seguido por AE10 (67.28%) y AE25 (67.64).
- El AE, PIN y FEL no estimulan la proliferación celular.
- El AE de *B. morelensis* promueve la migración de fibroblastos.
- Los resultados sugieren que el aceite esencial de *B. morelensis* interviene en el proceso de cicatrización, estimulando la migración de fibroblastos al sitio de la herida, con la consecuente producción de colágena durante las etapas tempranas, y en etapas más avanzadas, promoviendo la remodelación de esta colágena.

11.0 REFERENCIAS

- Abad, M. J., Bermejo, P., Carretero, E., Martínez-Acitores, C., Noguera, B., and Villar, A. 1996. Antiinflammatory activity of some medicinal plant extracts from Venezuela. *Journal of ethnopharmacology*, 55(1), 63–68.
- Abdallah, F., Mijouin, L., Pichon, C. 2017. Skin immune landscape: Inside and outside the organism. *Mediators Inflamm.* 2017:5095293.
- Abu-Darwish, M. S., Cabral, C., Ferreira, I. V., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Al-bdour, T. H., Salgueiro L., 2013. Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: Assessment of safety in mammalian

cells and its antifungal and anti-Inflammatory Potential. *BioMed Res. Int.* 2013:538940.

- Alonso-Castro, A.J., Villarreal M.L., Salazar-Olivod, L.A. Gomez-Sanchez M., Dominguez F., Garcia-Carranca A. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J. Ethnopharmacol.* 133, 945–972.
- Álvarez, Á. L., Habtemariam, S., & Parra, F. 2015. Inhibitory effects of lupene-derived pentacyclic triterpenoids from *Bursera simaruba* on HSV-1 and HSV-2 in vitro replication. *Natural product research*, 29(24), 2322–2327.
- Andrade-Cetto, A., 2009. Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *J. Ethnopharmacol.* 122, 163–171.
- Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P., 2006. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4364–4370.
- Argueta, A. Cano, A. Rodarate, M.E., 1994. Atlas de las Plantas Medicinales de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista, México, DF, pp. 1786.
- Aziz, Z.A.A., Ahmad, A, Setapar, S.H.M., Karakucuk, A., Azim, M.M., Lokhat, D., Rafatullah, M., Ganash, M., Kamal, M.A., Ashraf, G.M. 2018. Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential – A review. *Curr Drug Metab.* 19 (13), 1100-1110.
- Bae, G. S., Park, K. C., Choi, S. B., Jo, I. J., Choi, M. O., Hong, S. H., Song, K., Song, H. J., & Park, S. J. 2012. Protective effects of alpha-pinene in mice with cerulein-induced acute pancreatitis. *Life sciences*, 91(17-18), 866–871.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem. Technol.* 46, 446–475.
- Becerra, J.X.; Venable, D.L. 1999. Nuclear ribosomal DNA phylogeny and its implications for evolutionary trends in Mexican *Bursera* (Burseraceae). *Am. J. Bot.* 86, 1047–1057.

- Becerra, X. J., 2005. Timing the origin and expansion of the Mexican tropical dry forest. PNAS. 31, 10919–10923.
- Becerra, J.X.; Noge, K.; Olivier, S.; Venable, D.L. 2012. The monophyly of *Bursera* and its impact for divergence times of Burseraceae. Taxon. 61, 333–343.
- Biabiany, M., Roumy, V., Hennebelle, T., François, N., Sendid, B., Pottier, M., Aliouat, e., Rouaud, I., Lohézic-Le Dévéhat, F., Joseph, H., Bourgeois, P., Sahpaz, S., and Bailleul, F. 2013. Antifungal activity of 10 Guadeloupean plants. Phytotherapy research: PTR, 27(11), 1640–1645.
- Bonamin, F., Moraes, T.M., dos Santos, R.C., Kushima, H., Faria, F.M., Silva, M.A., Junior, I.V., Nogueira, L., Bauab, T.M., Brito, A.R.S., 2014. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: The role of -myrcene in preventing peptic ulcer disease. Chem. Biol. Interact. 212, 11–19.
- Bos, J.D., Kapsenberg, M.L. 1986. The skin immune system its cellular constituents and their interactions. Immunology Today. 7: 235–240.
- Burkovská, A.; Čikoš, Š., Juhás, Š.; Il'Ková, G.; Reháč, P.; Koppel, J., 2007. Effects of a combination of thyme and oregano essential oils on TNBS-induced colitis in mice. Mediators Inflamm. 2007:23296.
- Camporese, A., Balick, M. J., Arvigo, R., Esposito, R. G., Morsellino, N., De Simone, F., & Tubaro, A. 2003. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). Journal of ethnopharmacology, 87(1), 103–107.
- Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Duran, A., Lira, R., 2005. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. J. Ethnopharmacol. 97, 429–439.
- Canales-Martinez, M., Rivera-Yañez, C.R., Salas-Oropeza, J., Lopez, H.R., Jimenez-Estrada, M., Rosas-Lopez, R., Duran, D.A., Flores, C., Hernandez, L.B., Rodriguez-Monroy, M.A. 2017. Antimicrobial activity of *Bursera morelensis* Ramírez essential oil. Afr J Tradit Complement Altern Med. 14 (3), 74-82.

- Cardiff, R. D., Miller, C. H., & Munn, R. J. 2014. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. Cold Spring Harbor protocols, 2016 (6), 655–658.
- Carrera-Martínez, C., A., Rosas-López, R., Rodríguez-Monroy, M.A., Canales-Martínez, M.M., Román-Guerrero, A., Jiménez-Alvarado., R. 2014. Chemical composition and In vivo antiinflammatory activity of *Bursera morelensis* Ramírez essential oil. J. Essent Oil Bear Pl. 17:5, 758-768.
- Carretero, M.E., López, P.J.L., Abad, M.J., Bermejo, P., Tillet, S., Israel, A., Noguera, P.B. 2008. Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves. J. Ethnopharmacol.116, 11-15.
- Chaires-Rosas, C. P., Ambriz, X., Montesinos, J. J., Hernández-Téllez, B., Piñón-Zárate, G., Herrera-Enríquez, M., Hernández-Estévez, É., Ambrosio, J. R., & Castell-Rodríguez, A. 2019. Differential adhesion and fibrinolytic activity of mesenchymal stem cells from human bone marrow, placenta, and Wharton's jelly cultured in a fibrin hydrogel. Journal of tissue engineering, 10, 2041731419840622.
- Chhikara, S., Jean, N., Mandal, D., Kumar, A., Parang K. 2011. Fatty acyl amide derivatives of doxorubicin: synthesis and *in vitro* anticancer activities. Eur. J. Med. Chem. 46 2037-2042.
- Columba-Palomares, M. F., Villareal, D. M., Acevedo Quiroz, M. C., Marquina Bahena, M. C., Álvarez Berber, D. L., & Rodríguez-López, D. V. 2015. Anti-inflammatory and cytotoxic activities of *Bursera copallifera*. Pharmacognosy magazine, 11(Suppl 2), S322–S328.
- Czarnowicki, T., Krueger, J.G., Guttman-Yassky, E. 2017. Novel concepts of prevention and treatment of atopic dermatitis through barrier and immune manipulations with implications for the atopic march. J Allergy Clin Immunol. 139, 1723-34.
- Dahham, S.S., Tabana, Y.M., Iqbal, M.A.; Ahamed, M.B.K.; Ezzat, M.O., Majid, A.S.A., Majid, A.M.S.A. 2015. The anticancer, antioxidant and

antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*. 20, 11808-11829.

- Debeer, S., Le Ludec, J.B., Kaiserlian, D., Laurent, P., Nicolas, J.F., Dubois, B., Kanitakis, J. 2013. Comparative histology and immunohistochemistry of porcine versus human skin. *Eur. J. Dermatol.* 23, 456–466.
- De Groot, A.C., Schmidt, E. 2016. Essential Oils, Part I: Introduction. *Dermatitis*. Mar-Apr; 27(2), 39-42.
- De Sousa, D.P., Lima, T.C., Steverding, D. 2016. Evaluation of antiparasitic activity of *Mentha crispata* essential oil, its major constituent rotundifolone and analogues against *Trypanosoma brucei*. *Planta Medica*. 116, 11-5.
- Di Giacomo, S., Abete, L., Cocchiola, R., Mazzanti, G., Eufemi, M., Di Sotto, A. 2017. Caryophyllane sesquiterpenes inhibit DNA-damage by tobacco smoke in bacterial and mammalian cells. *Food Chem. Toxicol.* 111, 393-404.
- Diegelmann, R.F. and Evans, M.C. 2004. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front. Biosci.* 9: 283 – 289.
- Elias, P.M. 2007. The skin barrier as an innate immune element. *Semin. Immunopathol.* 29, 3–14.
- Enoch, S. and Leaper, D.J. 2007. Basic science of wound healing. *Surgery*. 26, 31–37.
- Espinosa, D., Llorente, J., Morrone, J.J. 2006. Historical biogeographical patterns of the species of *Bursera* (Burseraceae) and their taxonomic implications. *J. Biogeogr.* 33, 1945–1958.
- Franz, C.; Novak, J. In *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. 2010. Baser, K. H. C.; Buchbauer, G., eds.; CRC Press: New York.
- Gigliarelli, G., Becerra J.X., Curini, M., Marcotullio, M.C. 2015. Chemical composition and biological activities of fragrant Mexican Copal (*Bursera* spp.). *Molecules*. 20, 22383–22394
- Gordaliza, M. 2007. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin. Trans. Oncol.* 9,767–776.

- Guan, X., Ge, D., Li S., Huang, K., Liu, J., Li, F. 2019. Chemical composition and antimicrobial activities of *Artemisia argyi* Lévl. et Vant essential oils extracted by simultaneous distillation-extraction, subcritical extraction and hydrodistillation. *Molecules*. 24, 483.
- Guo, S., Zhang, W., Liang, J., You, C., Geng, Z., Wang, C., Du, S., 2016. Contact and repellent activities of the essential oil from *Juniperus formosana* against two stored product insects. *Molecules* 21, 504.
- Gurtner, G., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M. T. 2008. Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314–321.
- Haghdoost, F., Baradaran Mahdavi MM, Zandifar A, Sanei MH, Zolfaghari B., Javanmard, S.H. 2013. *Pistacia atlantica* resin has a dose-dependent effect on angiogenesis and skin burn wound healing in rat. *J Evid Based Complementary Altern Med*. 2013:893425.
- Heal, C.F., Banks, J.L., Lepper, P.D., Kontopantelis, E., van Driel, M.L. 2016. Topical antibiotics for preventing surgical site infection in wounds healing by primary intention. *Cochrane Database Syst Rev*. Nov 7;11:CD011426.
- Hernández-Hernández, A.B., Alarcón-Aguilar F.J., Jiménez-Estrada, M., Hernández-Portilla L.B., Flores-Ortiz C.M., Rodríguez-Monroy M.A., Canales-Martínez M. 2016. Biological properties and chemical composition of *Jatropha neopauciflora* Pax. *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, vol. 14, no. 1, pp. 32-42.
- Hong, S.J., Jia, S.X., Xie, P., Xu, W., Leung, K.P., Mustoe, T.A., Galiano, R.D. 2013. Topically delivered adipose derived stem cells show an activated-fibroblast phenotype and enhance granulation tissue formation in skin wounds. *PLoS One*. 8(1): e55640.
- Hurtado-Rico, N., Rodríguez Jiménez, C. Aguilar Contreras, A. 2006. Estudio cualitativo y cuantitativo de la flora medicinal del municipio de Copándaro de Galeana, Michoacán, México. *Polibotánica*. 22, 21-50.
- INAFED Instituto para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. SEGOB Secretaría de Gobernación. 2010. Versión en línea: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM20oaxaca/>

- Jacobo-Herrera, N.J., Jacobo-Herrera, F.E., Zentella-Dehesa, A., Andrade-Cetto, A., Heinrich M., Pérez-Plasencia, C. 2016. Medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of colorectal cancer. *J. Ethnopharmacol.* 179, 391–402.
- Johnson TM, Lowe L, Brown MD, Sullivan MJ, Nelson BR. 1993. Histology and physiology of tissue expansion. *J Dermatol Surg Oncol.* Dec;19(12):1074-8.
- Jutiviboonsuk, A., Zhang, H., Tan, G. T., Ma, C., Van Hung, N., Manh Cuong, N., Bunyaphatsara, N., Soejarto, D. D., & Fong, H. H. 2005. Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*. *Phytochemistry*, 66(23), 2745–2751.
- Kanitakis J. 2002. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 12, 390-9
- Karodi, R., Jadhav, M., Rub, R., Bafna, A. 2009. Evaluation of the wound healing activity of a crude extract of *Rubia cordifolia* L. (Indianmadder) in mice. *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.* 2, 12-18.
- Kim D.S. et al. 2015. Alpha-Pinene Exhibits Anti-Inflammatory Activity Through the Suppression of MAPKs and the NF-κB Pathway in Mouse Peritoneal Macrophages. *The American Journal of Chinese Medicine.* 43(4):731-42.
- Lenardão, E.J., Savegnago, L., Jacob,R.G., Victoriaa, N., Martineza, D.M. 2016. Antinociceptive effect of essential oils and their constituents: an update review. *J. Braz. Chem. Soc.* 27(3), 435-474.
- Leung, D.Y. and Guttman-Yassky, E. 2014. Deciphering the complexities of atopic dermatitis: shifting paradigms in treatment approaches. *J Allergy Clin Immunol.* 134, 769-79.
- Li, K., Zhou, R., Wang Jia, W., Li, Z., Li, J., Zhang, P., Xiao, T. 2016. *Zanthoxylum bungeanum* essential oil induces apoptosis of HaCaT human keratinocytes. *J. Ethnopharmacol.* 186, 351–361.

- Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. 2007. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nature protocols*, 2(2), 329–333.
- Linares, D., Bye, R., Flores, B., 1999. *Plantas Medicinales de México usos remedios y tradiciones*. Instituto de Biología, UNAM. pp. 155.
- Martin, P. and Leibovich, S. J. 2005. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol.* 15, 599–607.
- Masotti, V., Juteau, F., Bessière, J.M., Viano, J. 2003. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7115–7121.
- Messina, F., Curini M., Di Sano, Ch., Zadra C., Gigliarelli, G., Rascón-Valenzuela, L.A., Robles, Zepeda, R.E., Marcotullio, M.C. 2015. Diterpenoids and triterpenoids from the resin of *Bursera microphylla* and their cytotoxic activity. *J. Nat. Prod.* 78, 1184–1188.
- Miguel, M. G. 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules.* 15(12), 9252–9287.
- Mikesch, L.M., Aramadhaka, L.R., Moskaluk C., Zigrino, P., Mauch, C., Fox, J.W. 2013. Proteomic anatomy of human skin. *J Proteomics.* 12 (84), 190-200.
- Monzote, L., Hill, G. M., Cuellar, A., Scull, R., & Setzer, W. N. 2012. Chemical composition and anti-proliferative properties of *Bursera graveolens* essential oil. *Natural product communications*, 7(11), 1531–1534.
- Nedelec, B., Ghahary, A., Scott, P. G., and Tredget, E.E. 2000. Control of wound contraction. *Basic and clinical features*, *Hand Clin*, 16, 289.
- Nishifuji, K. and Yoon, J.S. 2013. The stratum corneum: the rampart of the mammalian body. *Vet Dermatol.* 1, 60-72.
- Noguera, B., Díaz, E., García, M. V., Feliciano, A. S., López-Perez, J. L., Israel, A. 2004. Anti-inflammatory activity of leaf extract and fractions of *Bursera simaruba* (L.) Sarg (Burseraceae). *Journal of ethnopharmacology*, 92(1), 129–133.

- Orchard, A. and van Vuuren, S. 2017. Commercial essential oils as potential antimicrobials to treat skin diseases. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017:4517971.
- Proksch, E., Brandner, J.M., Jensen, J.M. 2008. The skin: an indispensable barrier. *Exp.Dermatol.* 17, 1063–1072.
- Quah, B. J., & Parish, C. R. 2010. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (44), 2259.
- Queiroga, C. L., Duarte, M. C., Ribeiro, B. B., and de Magalhães, P. M. 2007. Linalool production from the leaves of *Bursera aloexylon* and its antimicrobial activity. *Fitoterapia*, 78(4), 327–328.
- Rates, S.M. 2001. Plants source of drugs. *Toxicon.* 39, 603–613.
- Rai A, Saito K, Yamazaki M. 2017. Integrated omics analysis of specialized metabolism in medicinal plants. *Plant J.* 90, 764–787
- Rivera-Yañez, C.R., Terrazas, L.I., Jimenez-Estrada, M., Campos, J.E., Flores-Ortiz C.M., Hernandez, L.B., Cruz-Sanchez, T., Garrido-Fariña, G.I., Rodriguez-Monroy, M.A., Canales-Martinez M.M. 2017. Anti-candida activity of *Bursera morelensis* Ramirez essential oil and two compounds, α -pinene and γ -terpinene - an In vitro study. *Molecules.* 5, 22 (12).
- Rojas-Sepúlveda, A. M., Mendieta-Serrano, M., Mojica, M. Y., Salas-Vidal, E., Marquina, S., Villarreal, M. L., Puebla, A. M., Delgado, J. I., Alvarez, L. 2012. Cytotoxic podophyllotoxin type-lignans from the steam bark of *Bursera fagaroides* var. *fagaroides*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(8), 9506–9519.
- Rosas-Arreguín, P., Arteaga-Nieto, P., Reynoso-Orozco, R., Villagómez-Castro, J. C., Sabanero-López, M., Puebla-Pérez, A. M., & Calvo-Méndez, C. 2008. *Bursera fagaroides*, effect of an ethanolic extract on ornithine decarboxylase (ODC) activity *in vitro* and on the growth of *Entamoeba histolytica*. *Experimental parasitology*, 119(3), 398–402.

- Rubiolo, P., Sgorbini, B., Liberto, E., Cordero, C., Bicchi, C. 2010. Essential oils and volatiles: simple preparation and analysis. *Flavour Fragr. J.* 25, 282-290.
- Rushmer, R.F., Buettner, K.J., Short, J.M., Odland, G.F. 1966. The skin. *Science* 154, 343–348.
- Salas, J., Tello, V., Zavaleta, A., Villegas, L., Salas, M., Fernandez, I., Vaisberg, A. 1994. Actividad cicatrizante del latex de *Jatropha curcas* (Angiospermae: Euforbiaceae). *Rev. Biol. Trop.* 42, 323–326.
- Sawatdee, S., Choochuay, K., Chanthorn, W., Srichana, T. 2016. Evaluation of the topical spray containing *Centella asiatica* extract and its efficacy on excision wounds in rats, *Acta Pharm.* 66, 233–244.
- Scossa, F., Benina, M., Alseekh, S., Zhang, Y., Fernie, A.R. 2018. The integration of metabolomics and next-generation sequencing data to elucidate the pathways of natural product metabolism in medicinal plants. *Planta Med.* 84, 855–873.
- Serrano-Parrales, R., Vásquez-Cruz, B., Segura-Cobos, D., Anaya-Lang, A.L., Jimenez-Estrada, M., Hernández, D.T., Canales-Martínez, M. 2012. Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant properties of *Bursera morelensis* bark from San Rafael, Coxcatlán, Puebla (México): Implications for cutaneous wound healing. *J. Med. Plants Res.* 6, 5609-5615.
- Sida M. E., Rodríguez M. V, Trinidad B. H., Mosqueda T. A.A. 2019. *Histología general*. Berit FGV. CDMX, Mexico. 80 pag.
- Silva L. L., Garlet Q. I., Benovit S. C., Dolci G., Mallmann C.A., Bürger M.E., Baldisserotto B., Longhi S.J., Heinzmann B.M. 2013. Sedative and anesthetic activities of the essential oils of *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. and their isolated components in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Braz J Med Biol Res.* 46(9), 771-779.
- Siqueira, H.D.S., Neto B.S., Sousa D.P., Gomes B.S., da Silva F.V., Cunha F.V.M., Wanderley C.W.S., Pinheiro G., Cândido A.G.F., Wong D.V.T., Ribeiro R.A., Lima-Júnior R.C.P., Oliveira F.A. 2016. α -Phellandrene, a cyclic

- monoterpene, attenuates inflammatory response through neutrophil migration inhibition and mast cell degranulation. *Life Sciences*. 160, 27–33.
- Skiryecz, A., Kierszniowska, S., Meret, M., Willmitzer, L., Tzotzos, G. 2016. Medicinal bioprospecting of the Amazon rainforest: a modern. *Trends Biotechnol.* 34, 781–790.
 - Stashenko, E. 1996. *Memorias del IV Congreso Nacional de Fitoquímica*, Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química, Bucaramanga, pp. 29-53.
 - Stringaro A., Colone M., Angiolella L. 2018. Antioxidant, antifungal, antibiofilm, and cytotoxic activities of *Mentha* spp. essential oils. *Medicines*. 5(4). pii: E112
 - Sosa, S., Balick, M. J., Arvigo, R., Esposito, R. G., Pizza, C., Altinier, G., and Tubaro, A. 2002. Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. *Journal of ethnopharmacology*, 81(2), 211–215.
 - Summerfield, A., Meurens, F., Ricklin, M.E. 2015. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Mol Immunol.* 66, 14-21.
 - Taddei-Bringas, G.A., Santillana-Macedo, M., Romero-Cancio, J.A., Romero-Téllez, B. 1999. Aceptación y uso de herbolaria en medicina familiar. *Salud pública de México* 41(3).
 - Teller P., White T.K. 2009. The physiology of wound healing: Injury through maturation. *Surg Clin N Am* 89, 599–610.
 - Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., Brown, R. A. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 349.
 - Tu, C.Y., Chen, Y.F., Lii, C.K., Wang, T.S. 2013. Methylglyoxal induces DNA crosslinks in ECV304 cells via a reactive oxygen species-independent protein carbonylation pathway. *Toxicol. In Vitro.* 27, 1211-1219.
 - Tümen, İ., Akkol, E.K., Taştan H., Süntar I., Kurtca M. 2018. Research on the antioxidant, wound healing, and anti-inflammatory activities and the

phytochemical composition of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait). J. Ethnopharmacol. 211, 235-246.

- Usai, M., Atzei, A.D., Marchetti, M. 2016. A comparative study on essential oil intraspecific and seasonal variations: *Melissa romana* Mill. and *Melissa officinalis* L. from Sardinia. Chem Biodivers. 13(8), 1076-87
- Valente, J., Zuzarte, M., Gonçalves, M.J., Lopes, M.C., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., Cruz, M.T. 2013. Antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Oenanthe crocata* L. essential oil. Food Chem. Toxicol. 62, 349-54.
- Vargas, R., J. Bottia. 2008. Estudio de la composición química de los aceites esenciales de 6 especies de vegetales cultivadas en los municipios de Bolívar y El Peñon-Santander, Colombia. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.
- Vázquez, N., Sánchez-Arévalo, F., Maciel-Cerda, A., Garnica-Palafox, I., Ontiveros-Tlachi, R., Chaires-Rosas, C., Piñón-Zarate, G., Herrera-Enríquez, M., Hautefeuille, M., Vera-Graziano, R., & Castell-Rodríguez, A. 2019. Influence of the PLGA/gelatin ratio on the physical, chemical and biological properties of electrospun scaffolds for wound dressings. Biomedical materials (Bristol, England), 14(4), 045006.
- Wilgus, T.A. 2008. Immune Cells in the healing skin wound: Influential players at each stage of repair. Pharmacol. Res. 58, 112–116.
- Wong, R., Geyer, S., Weninger, W., Guimberteau, J.C., Wong, J.K. 2016. The dynamic anatomy and patterning of skin. Exp Dermatol. 25(2), 92-8.
- Wurtele, E.S., Chappell, J., Jones, A.D., Celiz, M.D., Ransom N., Hur, M., Rizshsky, L., Crispin, M., Dixon, P., Liu J., P Widrlechner M., Nikolau, B.J. 2012. Medicinal plants: a public resource for metabolomics and hypothesis development. Metabolites. 4: 1031-59.
- Wurtzel ET and Kutchan TM. 2016. Plant metabolism, the diverse chemistry set of the future. Science. 353, 1232–1236.

- Xue, B., Zhao, J., Fan, Y., Chen, S., Li, W., Chen, J., Li, Z., Wang, H., and Kong, H. 2020. Synthesis of Taxol and Docetaxel by Using 10-Deacetyl-7-xylosyltaxanes. *Chemistry & biodiversity*, 17(2), e1900631.
- Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Pérez, L., López-Villafranco, E., Muñiz, E. E., Aguilar, A., & Reyes-Chilpa, R. 2005. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. *Journal of ethnopharmacology*, 97(2), 293–299.
- Zolla C. 1980. Traditional medicine in Latin America, with particular reference to Mexico. *J. Ethnopharmacol.* 2, 37-41.
- Zhu, F., Shi, Z., Qin, C., Tao, L., Liu, X., Xu, F., Zhang, L., Song, Y., Liu, X., Zhang, J., Han, B., Zhang, P., Chen, Y. 2012. Therapeutic target database update 2012: a resource for facilitating target-oriented drug discovery. *Nucleic Acids Res.* 40(Database issue):D1128-36.
- Zúñiga, B., Guevara-Fefer, P., Herrera, J., Contreras, J. L., Velasco, L., Pérez, F. J., Esquivel, B. 2005. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the volatile fractions from the bark of eight Mexican *Bursera* species. *Planta medica*, 71(9), 825–828.

APÉNDICE I. Estudios referentes a actividades biológicas del género *Bursera*

PLANTA	TIPO	ACTIVIDAD	AUTORES
<i>B. morelensis</i>	Aceite esencial de ramas	Antiinflamatoria	Carrera-Martínez, et al. 2014
<i>B. microphylla</i>	Fracción no polar de un extracto soluble en metanol	Antiproliferativa en células neoplásicas	Messina et al. 2015
<i>B. simaruba</i>	Extracto hexánico y fraccionamiento biodirigido de hojas	Antiinflamatoria, edema plantar en ratón	Carretero, et al. 2008
<i>B. grandifolia; B. lancifolia, B. morelensis; B. aptera, B. velutina; B. aloexylon; B. submoniliformis</i>	Fracción volátil	Antiinflamatoria	Zúñiga et al. 2005
<i>B. tonkinensis</i>	Fraccionamiento del extracto MeOH de raíz	Citotóxica	Jutiviboonsuk, et al. 2005
<i>B. morelensis</i>	Extracto metanólico	antiinflamatoria, analgesico y antioxidante	Serrano-Parrales, et al. 2012
<i>B. simaruba</i>	Fracción polar	Antimicrobiano	Camporese et al. 2003
<i>B. simaruba</i>	Extracto hexánico de hojas	Antiinflamatoria (edema plantar en rata)	Abad, et al. 1996
<i>B. simaruba</i>	Extractos de hexano, cloroformo y metanol	Antiinflamatoria (tópica, edema en oreja de ratón)	Sosa, et al. 2002
<i>B. simaruba</i> (L.) Sarg	Extracto hexánico y algunas fracciones	Antiinflamatoria (edema plantar en rata)	Noguera et al. 2004
<i>B. simaruba</i>	Extracto metanólico de material fresco de hojas, corteza, tallo	Antibacterial	Yasunaka et al. 2005
<i>B. aloexylon</i>	Aceite esencial de hojas	Antimicrobiano	Queiroga et al. 2007
<i>Bursera fagaroides</i>	Extracto etanólico de corteza	inhibición de la enzima ornitina decarboxilasa y del crecimiento de Entamoeba histolytica	Rosas-Arreguín et al. 2008
<i>Bursera spp</i>	resinas (copal blanco, negro, de gota)	Antimicrobiana	Gigliarelli et al. 2015

<i>B. copallifera</i>	Extractos hidroalcohólicos, metanólico, y diclorometano-metanol de tallo, corteza y hojas	Antiinflamatorio (edema de oreja en ratón) y citotóxico en células cancerígenas	Columba-Palomares et al. 2015
<i>B. simaruba</i>	Fraccionamiento solvente-solvente, exclusión y cromatografía de capa fina.	Antiviral <i>in vitro</i> (HSV-1 y HSV-2 <i>in vitro</i>)	Álvarez et al. 2015
<i>B. graveolens</i>	Aceite esencial de partes aéreas	Anti-proliferativas células cancerígenas	Monzote et al. 2012
<i>B. simaruba</i>	Extractos con ciclohexano, etanol y etanol/agua	Antifúngica	Biabiany et al. 2013
<i>B. fagaroides var. fagaroides</i>	Extracto hidroalcohólico	citotóxica en células cancerígenas	Rojas-Sepúlveda et al. 2012

APÉNDICE II. Comparación de índices de Kovats

La muestra de AE se inyectó al cromatógrafo un par de veces, obteniendo pequeñas variaciones en el índice de similitud, pero se obtuvieron los mismos tiempos de retención y consecuentemente los mismos valores del Índice de Kovats y los mismos datos espectrales.

Compuesto	TR MIN	IRK-calculado	IRK-BD	IS a	IS b
α -felandreno	4.9	1108.953882	997	90	90
α -pineno	5.029	1129.714654	931	97	94
Camfeno	5.229	1160.871766	943	96	96
Sabineno	5.421	1189.681122	964	93	90
β -Mirceno	5.51	1202.69104	979	87	87
β -felandreno	5.782	1241.187155	1030	68	68
α -terpineno	5.878	1254.342958	1008	94	94
<i>p</i> -cimeno	5.958	1265.143027	1011	97	97
<i>p</i> -menteno	6.063	1279.100108	987	83	83
γ -terpineno	6.255	1304.007661	1047	97	97
terpinoleno	6.519	1337.03501	1078	97	97
terpinen-4-ol	7.409	1439.276757	1161	94	96
<i>p</i> -menth-1(7)-en-2-one	7.978	1498.39088	1229	93	94
β -cariofileno	9.317	1622.346111	1424	99	99
α -cariofileno	9.557	1642.665262	1456	99	99
germacreno D	9.71	1655.354084	1480	96	96
cariofileno oxide	10.431	1712.577623	1576	98	97
β -eudesmol	10.912	1748.593833	1644	93	96

TR: tiempo de retención; **IRK-calculado:** Índice de retención de Kovats calculado; **IRK-DB:** Índice de retención de Kovats de la base de datos NIST Library Versión 8.0; **IS:** índice de similitud o coincidencia entre la biblioteca y los espectros de masas obtenidos en las repeticiones **a** y **b**.

APÉNDICE III. Control positivo

Se utilizó como control positivo el medicamento cicatrizante comercial Recoverón NC, el cual contiene: ácido acexámico con neomicina al 5%. El ácido acexámico participa en la acción proteica del colágeno, lo que le permite actuar en el proceso de cicatrización, regulando la producción de fibroblastos y la disposición de las fibras colágenas dentro del mismo proceso biológico natural, pero de manera ordenada. La neomicina es un antibiótico de amplio espectro. Los mecanismos sensibles pueden ser inhibidos por concentraciones de 5 a 10 µg/mL o menores. Entre las especies de gramnegativos, muy sensibles a la neomicina están: *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*. Los microorganismos grampositivos inhibidos incluyen: *Staphylococcus aureus*, *E. faecali*, *M. tuberculosis*. La neomicina se absorbe pobremente cuando se aplica por vía tópica, lo que le permite estar mayor tiempo en el sitio de la infección. Su vía de eliminación es renal. Debido a su baja o nula absorción permite la posibilidad de asociación con otro antibiótico por vía sistémica, si el caso así lo requiere. (PLM, 2019)

APÉNDICE IV. Método tensiométrico (modificado de Salas et al., 1994).

Este método se utiliza para evaluar la fuerza tensil de la cicatriz, ésta se expresa como la fuerza en gramos necesaria para reabrir la herida. Para llevar a cabo esta evaluación, los ratones con heridas longitudinales fueron sacrificados después de 10 días de tratamiento, para el sacrificio se utilizó una cámara de CO₂. Para medir la fuerza con la que se abre la cicatriz, se utilizó la técnica de flujo de agua, mediante un dispensador de agua con salida doble, conectado mediante mangueras a un par de recipientes que, al ir llenándose, tiran de un dispositivo de cuerdas y poleas atadas a pinzas Halsted con las que se sujetó la piel de cada ratón a 3 mm de la cicatriz, tal como se muestra en la Figura 22. El agua se dejó fluir hasta que la cicatriz se abrió. El volumen del agua acumulada en cada uno de los recipientes se transforma a gramos (considerando la densidad del agua: 1g/mL), y luego los

gramos se transformaron en fuerza, la eficacia cicatrizante se evaluó aplicando el modelo previamente mencionado.

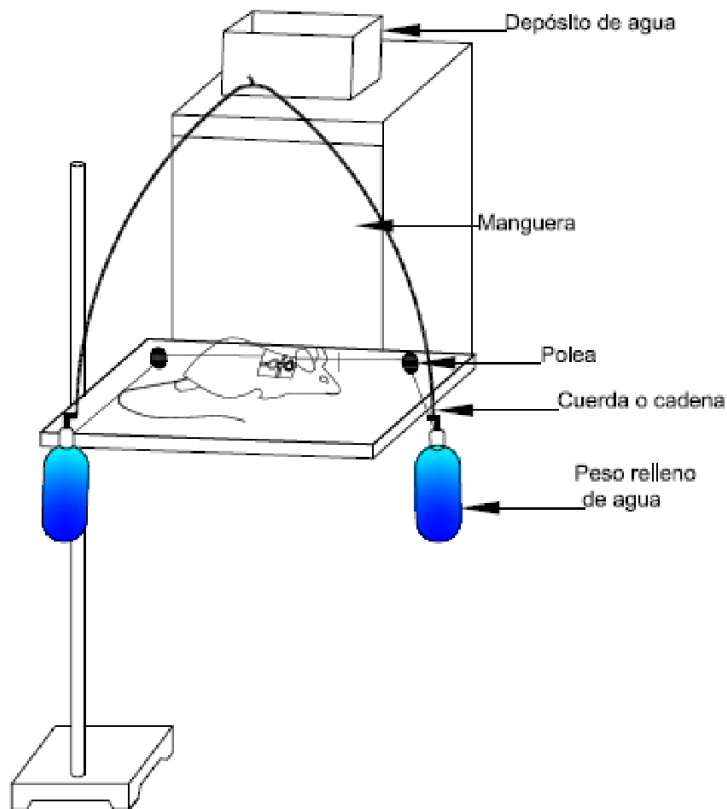


Figura 22. Diagrama de dispositivo para efectuar el método tensiométrico. (Imagen elaborada por Salas-Oropeza)

APÉNDICE V. Isoflurano

Para los procedimientos en los que fue necesario anestésiar a los ratones, se utilizó isoflurano en la presentación Lisorane de laboratorio Baxter. El Isoflurano es un éter halogenado, utilizado para la inducción y mantenimiento de la anestesia general por inhalación. Al igual que otros anestésicos generales, el Isoflurano inhibe la conducción de los potenciales de acción y su transmisión sináptica. El mecanismo de acción exacto a nivel subcelular aún no está totalmente claro. La inducción y especialmente la recuperación son rápidas.

APÉNDICE VI. Técnica histológica.

La técnica histológica tradicional inicia obteniendo las muestras de tejido, para inmediatamente fijarlas con formol al 10% amortiguado con sales de fosfato durante 24 horas, seguido por un proceso de deshidratación mediante la inmersión de los tejidos en alcoholes de concentración creciente, iniciando con alcohol al 70% y concluyendo con alcohol absoluto, durante dos horas en cada uno. Después, con el fin de aclarar las muestras, se pasan por butanol I y II durante dos horas, para finalmente ser incluidas en parafina, constituyendo así los bloques histológicos que posteriormente pueden ser cortados con un micrótopo.

Con el micrótopo se realizan cortes que deberán tener un espesor de 5 micras, inmediato al corte, las tiras de tejido parafinado se extienden en agua tibia en un baño de flotación, una vez extendido se recuperan los cortes sobre un portaobjetos, el cual debe estar debidamente etiquetado. Los portaobjetos con los cortes recuperados se dejan escurrir por unos minutos y posteriormente se introducen en estufa 37° C por un par de horas, esto último para asegurar que el tejido quede pegado al portaobjetos.




APÉNDICE VII. Artículo de investigación derivado de los estudios de doctorado.

Referencia completa:

Salas-Oropeza, J., Jimenez-Estrada, M., Perez-Torres, A., Castell-Rodriguez, A. E., Becerril-Millan, R., Rodriguez-Monroy, M. A., & Canales-Martinez, M. M. (2020). Wound healing activity of the essential oil of *Bursera morelensis*, in mice. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(8), E1795. <https://doi.org/10.3390/molecules25081795>

Article

Wound Healing Activity of the Essential Oil of *Bursera morelensis*, in Mice

Judith Salas-Oropeza ¹, Manuel Jimenez-Estrada ², Armando Perez-Torres ³,
Andres Eliu Castell-Rodriguez ³, Rodolfo Becerril-Millan ¹, Marco Aurelio Rodriguez-Monroy ⁴
and Maria Margarita Canales-Martinez ^{1,*}

¹ Laboratorio de Farmacognosia, UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Av. de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo, Mex 54090, Mexico; judithsalazo@hotmail.com (J.S.-O.); rbecerril85@gmail.com (R.B.-M.)

² Instituto de Química, UNAM, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacan CDMX 04510, Mexico; manuelj@unam.mx

³ Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, CDMX 04510, Mexico; armandop@unam.mx (A.P.-T.); castell@unam.mx (A.E.C.-R.)

⁴ Carrera de Medicina, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, UNAM, Av. de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala Tlalnepantla, Edo, Mex 54090, Mexico; dr.marcorodriguezmonroy@gmail.com

* Correspondence: magacm@yahoo.com.mx; Tel.: +52-55-5-623-11-27; Fax: +52-55-5-623-12-25

Academic Editor: Daniela Rigano

Received: 9 March 2020; Accepted: 8 April 2020; Published: 14 April 2020



Abstract: *Bursera morelensis* is used in Mexican folk medicine to treat wounds on the skin. It is an endemic tree known as “aceitillo”, and the antibacterial and antifungal activity of its essential oil has been verified; it also acts as an anti-inflammatory. All of these reported biological activities make the essential oil of *B. morelensis* a candidate to accelerate the wound-healing process. The objective was to determine the wound-healing properties of *B. morelensis*' essential oil on a murine model. The essential oil was obtained by hydro-distillation, and the chemical analysis was performed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). In the murine model, wound-healing efficacy (WHE) and wound contraction (WC) were evaluated. Cytotoxic activity was evaluated in vitro using peritoneal macrophages from BALB/c mice. The results showed that 18 terpenoid-type compounds were identified in the essential oil. The essential oil had remarkable WHE regardless of the dose and accelerated WC and was not cytotoxic. In vitro tests with fibroblasts showed that cell viability was dose-dependent; by adding 1 mg/mL of essential oil (EO) to the culture medium, cell viability decreased below 80%, while, at doses of 0.1 and 0.01 mg/mL, it remained around 90%; thus, EO did not intervene in fibroblast proliferation, but it did influence fibroblast migration when wound-like was done in monolayer cultures. The results of this study demonstrated that the essential oil was a pro-wound-healing agent because it had good healing effectiveness with scars with good tensile strength and accelerated repair. The probable mechanism of action of the EO of *B. morelensis*, during the healing process, is the promotion of the migration of fibroblasts to the site of the wound, making them active in the production of collagen and promoting the remodeling of this collagen.

Keywords: Burseraceae; essential oil; terpenes; wound healing

1. Introduction

In Mexico, medicinal plants are the most valuable material resource of traditional indigenous medicine [1]. This is due to the great diversity, derived from a complex biogeographic [2], and cultural history. The *Bursera* genus, which comprises approximately 100 species, is used in Mexican folk

medicine. In Mexico, it is possible to find 80 endemic species (out of a total of 84) distributed mainly in the tropical dry forest of the country [3]. These plants are characterized by an exudative resin channel system [4]. The biological effects of these species, including their cytotoxic, antiproliferative, antimicrobial, insecticidal, and anti-inflammatory activity, have been attributed to their essential oils, diterpenes, triterpenes, sterols, and lignans [4–8].

Bursera morelensis is an endemic tree of Mexico, known as “Aceitillo”, that has been reported in the treatment of skin wounds. The people of San Rafael, Coxcatlan (Puebla, Mexico) make a tea with the bark of this species to wash the wound. It has been verified that the essential oil (EO) of this species has antibacterial and antifungal activity [9,10] and also acts as an anti-inflammatory [8].

Wound healing is divided into three sequential phases, and each phase has its own time period, as well as particular tissues and cell lines [11–13]. The first phase is the inflammatory phase, in which a clot forms to stop the hemorrhage; then comes the vasodilation and the activation of the immune defense mechanisms [14,15]. The proliferative phase of epidermal, endothelial, and fibroblast cells is next [16], which generates initial granulation tissue [17], and angiogenesis occurs [12]. In the last phase, the granular tissue is remodeled through the generation of new collagen fibers, and differentiation of fibroblasts occurs in myofibroblasts, which increase the tensile strength and allow the approximation of the edges of the lesion [12,17].

Plants have immense potential for the management and treatment of wounds. A large number of plants are used by tribal and folklore in many countries for the treatment of wounds and burns [18]. The molecular and physiological effects of extracts and components of medicinal plants are often characterized in research studies of mammalian systems; as of 2008, 68% of all pharmaceutical products were derived from plants or inspired by plants [19,20].

The characteristics of the EO have made them highly valued in the industry for use in food, cosmetic, and pharmaceutical applications; these secondary metabolites have been related as potent antioxidants, anti-free radicals, and metal chelators, which also have anti-nociceptive, neuroprotective, anticonvulsant, and anti-inflammatory properties, reported in preclinical studies, which are characterized as possible sources for the development of new drugs [21–24].

Taking into account these biological properties, the EO of *B. morelensis* could be a potential candidate to make the wound healing process more efficient. In the present study, the wound-healing capability of the EO of this essential oil in mice was evaluated.

2. Results

2.1. Chemical Characterization of Essential Oil

The oil yield was 0.19%. The GC-MS analysis identified 18 compounds in the EO of *B. morelensis*. The main compounds were *p*-menthane (38.41%) and β -phellandrene (35.25%). Other important components were: α -pinene (8.37%), caryophyllene (5.19%), caryophyllene oxide (0.26), β -myrcene (3.6%), sabinene (3.54%), and *p*-cymene (2.1%) (Table 1).

Table 1. Chemical composition of *Bursera morelensis*’ essential oil (EO).

Rt (min)	Compound	Abundance (%)	SI (%)
4.9	α -Phellandrene	0.80	90
5.029	α -Pinene	8.37	97
5.229	Camphene	0.13	96
5.421	Sabinene	3.54	93
5.51	β -Myrcene *	3.6	87
5.782	β -Phellandrene *	35.25	68
5.878	α -Terpinene	0.16	94
5.958	<i>p</i> -Cymene	2.1	97
6.063	<i>p</i> -Menthane *	38.41	83
6.255	γ -Terpinene	0.18	97

Table 1. Cont.

Rt (min)	Compound	Abundance (%)	SI (%)
6.519	Terpinolene	0.3	97
7.409	Terpinen-4-ol	0.14	94
7.978	<i>p</i> -Menth-1(7)-en-2-one	0.34	93
9.317	β -Caryophyllene	5.19	99
9.557	α -Caryophyllene	0.28	99
9.71	Germacrene D	0.44	96
10.431	Caryophyllene oxide	0.26	98
10.912	β -Eudesmol	0.14	93

SI: similarity index or match between the library and mass spectra obtained. *: the identification of these compounds is partial because the SI is less than 90%.

2.2. Skin Irritation Study and Cytotoxicity

The 25% essential oil (25EO)-treated wounds showed slight skin redness that was detected 12 h after the first application, and the redness decreased after around 24 h. At 72 h, no skin redness was detected, but a slight peeling of the skin could be observed. Histopathological analysis of the skin of the 25EO-treated wounds showed an increased number of dead cells according to the presence of pyknotic nuclei. In addition, cellular detritus was observed on the epidermis of the skin treated with 25EO. This increased presence of cells in the treated area was probably part of a primary cellular response to this oil being recognized as a foreign agent; likewise, the presence of cellular detritus could indicate the activity of macrophages (Figure 1).

Regarding the cytotoxicity test, peritoneal macrophages from BALB/c mice were used. The results showed that the EO of *B. morelensis* had a mortality percentage of 24% at a concentration of 1.2 mg/mL, which was significantly lower than the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of doxorubicin, which was 0.85 μ g/mL. This means that the cytotoxicity of the EO was almost 1000 times less than that of doxorubicin (Figure 2).

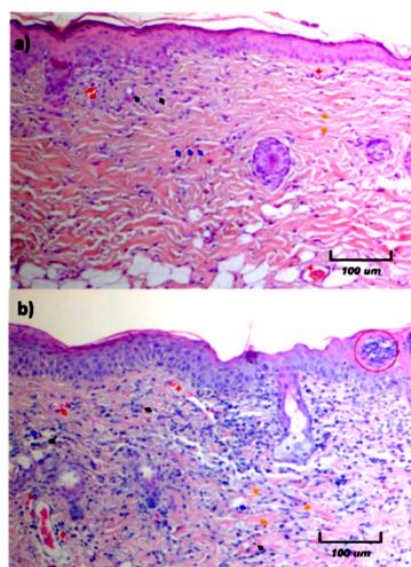


Figure 1. Histology of skin samples obtained from sites with different treatments on day 3. Samples were stained with hematoxylin and eosin (H&E). (a) Control samples of untreated healthy skin. (b) In healthy skin, treated with 25% *B. morelensis*' essential oil (EO), cellular detritus was observed (red circles). All photos were taken at 10 \times magnification. \blacktriangleright Erythrocytes, \blacktriangleright collagen fibers, \blacktriangleright basophil cells (positive hematoxylin), \blacktriangleright fibroblast, + blood vessel.

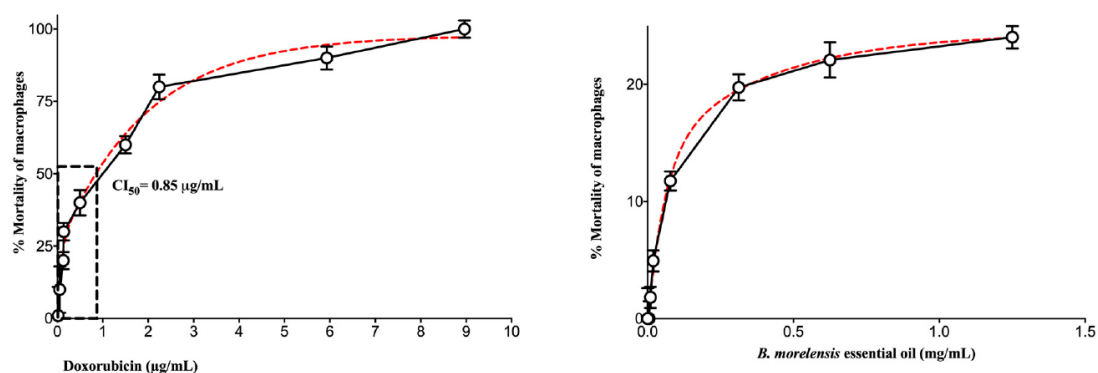


Figure 2. Cytotoxicity of *B. morelensis* oil compared with cytotoxicity of doxorubicin.

2.3. Wound-Healing Efficacy (% WHE)

Wound resistance to the tension was measured according to the tensiometric method. We observed that untreated or healthy skin (HS) showed 28% WHE, the positive control (C^+) showed 38%, the 10EO treatment showed 36%, and the 25EO showed 34% (Figure 3). It could be seen that the 10% essential oil (10EO) was the one with the highest WHE.

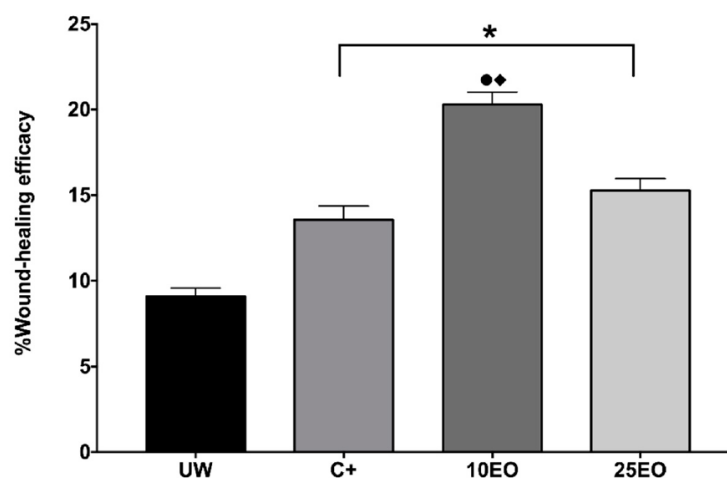


Figure 3. Wound-healing efficacy (% WHE). UW, untreated wound. C^+ , positive control—Recoveron NC. 10EO, 10% essential oil. 25EO, 25% essential oil. *Significant differences with respect to UW. •Significant differences with respect to C^+ . ♦Significant differences with respect to 25EO ($p < 0.01$).

Likewise, it could be observed that in mice treated with EO, in general, wounds were completely closed, while, in the other treatments, wounds did not completely close (Figure 4).

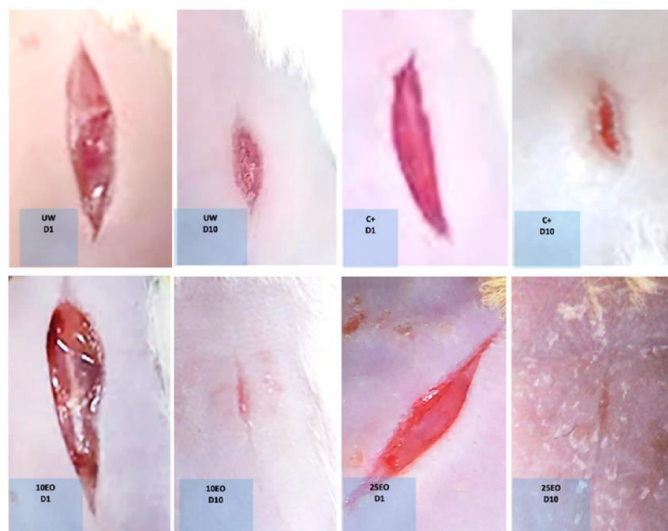


Figure 4. Macroscopic examination of wounds on the first and tenth day of the experiment. UW, untreated wound. C⁺, positive control—Recoveron NC. 10EO, 10% essential oil. 25EO, 25% essential oil.

2.4. Incision Wound Model

In the incision wound model, it was observed that 67.2% of wounds treated with 10EO closed, and 65.3% of wounds treated with 25EO closed, while 45.01% of wounds closed in the skin with no treatment (Figure 5).

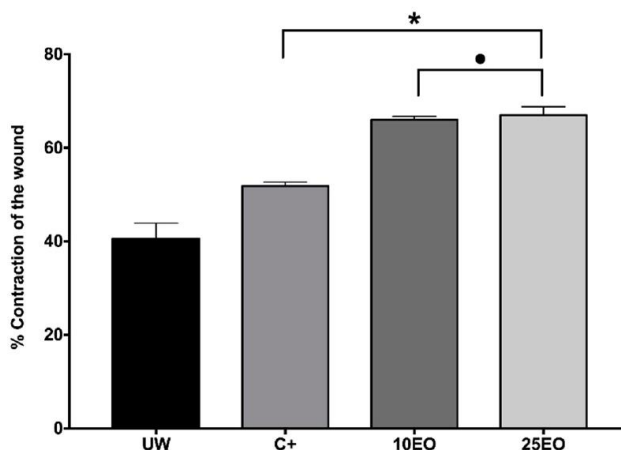


Figure 5. Percentage of wound contraction 10 days post-wound. UW, untreated wound. C⁺, positive control—Recoveron NC. 10EO, 10% essential oil. 25EO, 25% essential oil. * Significant differences between C⁺, 10EO, and 25EO with respect to UW. ● Significant differences with respect to C⁺ ($p < 0.01$).

Likewise, a more homogeneous appearance of the skin was observed with both EO treatments. On day 10, in untreated mice, scabs could be observed, and, in the C⁺, mice were observed to have larger scabs (Figure 6). This coincided with the histology 10 days after treatment; on healthy skin with both stains, the three layers of skin were clearly defined, and we could distinguish hair follicles, glands, blood vessels, fibroblasts, and dark blue-purple cell nuclei; with Masson's stain, collagen fibers were uniformly blue since they formed a uniform network/matrix where some of the fibroblasts (uniform) producing the collagen could be observed.

In the UW group, it was observed that the skin layers were restored, although they did not show accessories, such as hair follicles or glands. It was also possible to observe blood vessels, as the arrangement of collagen was lax compared to the complex arrangement that existed in healthy skin. In addition, a large number of nuclei of both fibroblasts and other cells was observed. In the C⁺ group, the epidermis and dermis were clearly differentiated, and the only skin accessories found were blood vessels. Likewise, many cell nuclei and erythrocytes were observed, and the erythrocytes were more evident with Masson's stain, where some whitish areas were also observed, which indicated fewer collagen fibers. In both EO treatments, a better structure of scar tissue and a greater deposit of collagen were observed; likewise, different from the C⁺ group, fewer cell nuclei were observed, which in some points showed an arrangement similar to that of incipient glands. On the other hand, the plot was formed by the collagen fibers, a major sample, similar to that of HS (Figure 7).



Figure 6. Macroscopic examination of wounds at the first, fifth, and tenth day of the experiment. UW, untreated wound. C⁺, positive control—Recoveron NC. 10EO, 10% essential oil. 25EO, 25% essential oil.

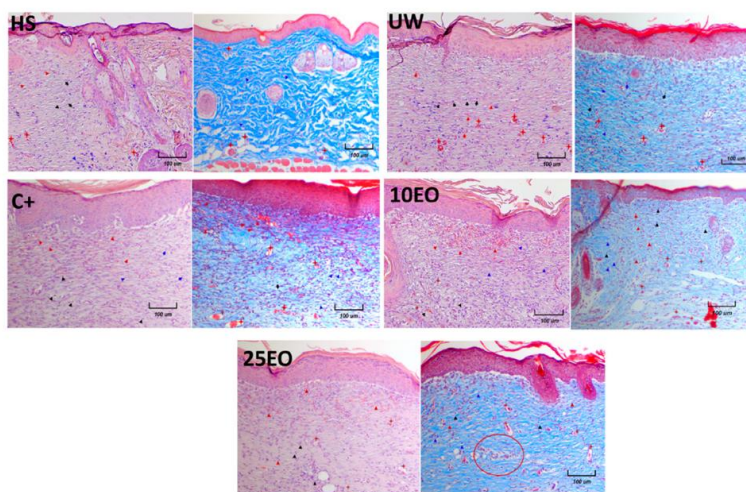


Figure 7. Histology of skin samples from a treated wound on day 10 of treatment. Samples were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and Masson's trichrome. All photos were taken at a 10X magnification. HS, healthy skin. UW, untreated wound. C⁺, positive control—Recoveron NC. 10EO, 10% essential oil. 25EO, 25% essential oil. ▶ Erythrocytes, ► basophil cells (positive hematoxylin), ► fibroblast, + blood vessel.

2.5. In Vitro Tests

Once the healing activity of EO of *B. morelensis* was tested, a series of in vitro tests were done to try to understand the mechanism of action. The cell viability test was performed in the life/death trial in monolayer, after 24 h of having applied the stimuli (EO 1 mg/mL, 0.1 mg/mL, and 0.01 mg/mL), finding that in the lower concentration, there was more cell viability since fibroblasts stimulated with EO 0.01 mg/mL showed a greater amount of green cells and fewer red nuclei (Figure 8).

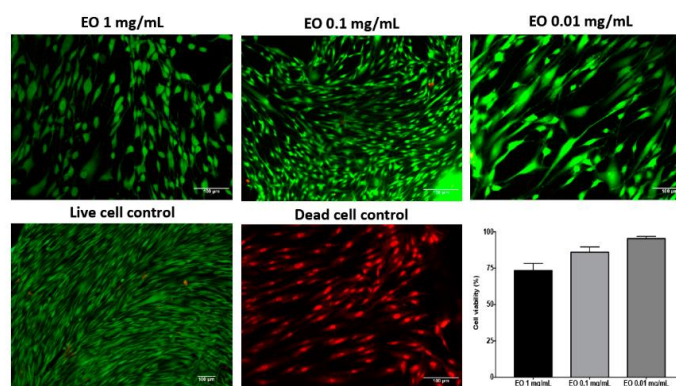


Figure 8. Cell viability test, life/death staining on fibroblast culture in monolayer, at 24 h post-stimulus with essential oil (EO) 1 mg/mL, 0.1 mg/mL, and 0.01 mg/mL.

Cell proliferation was evaluated by the PrestoBlue assay, where the absorbance was directly proportional to cell proliferation. Cells were cultured for 72 h, stimulated every 24 h with EO (1 mg/mL, 0.1 mg/mL, and 0.01 mg/mL). It was evident that with a higher concentration of EO, there was less fibroblast proliferation; the bars corresponding to EO 1 mg/mL were the smallest (Figure 9).

Since proliferation experiments demonstrated that fibroblasts were cultured properly in the presence of EO, cell migration assays were carried out. Figure 10 shows the plates with confluent fibroblast culture, in which a line that simulated a wound in the monolayer was drawn. It was observed

that at 24 h, the migration to the site of the wound was evident in the plaques where fibroblast growth factor (FGF) was applied, which stimulated the migration of these cells, while, in the plates treated with EO, the migration became noticeable until 24 h; likewise, in the plate with EO 0.01 mg/mL, more cells were observed, which also showed a better appearance in terms of shape and size (more similar to cell growth control).

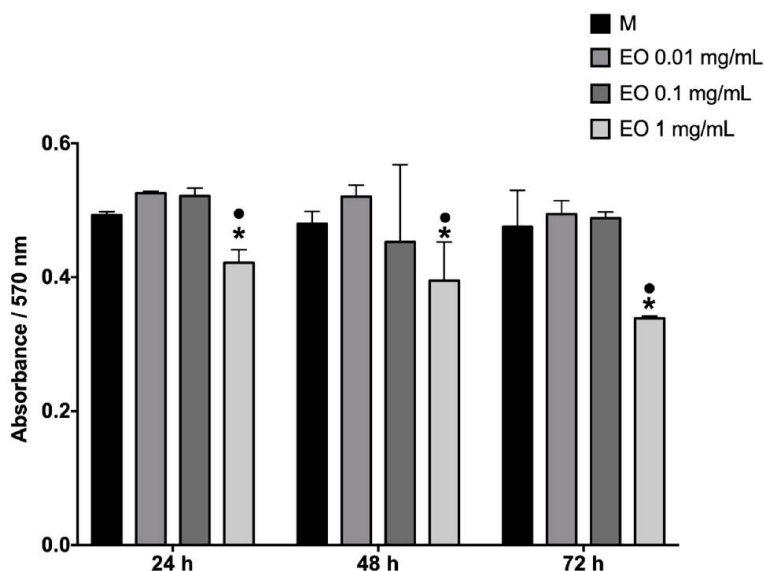


Figure 9. Cell proliferation assay of monolayer cultures. Resazurin absorbance indicated the proliferation of fibroblasts with absorbance control with medium plus Tween. The stimuli applied: M: DMEM media supplemented; EO 0.01 mg/mL; EO 0.1 mg/mL, and EO 1 mg/mL. *Significant differences with respect to M. •Significant differences with respect to EO 0.01 ($p < 0.05$).

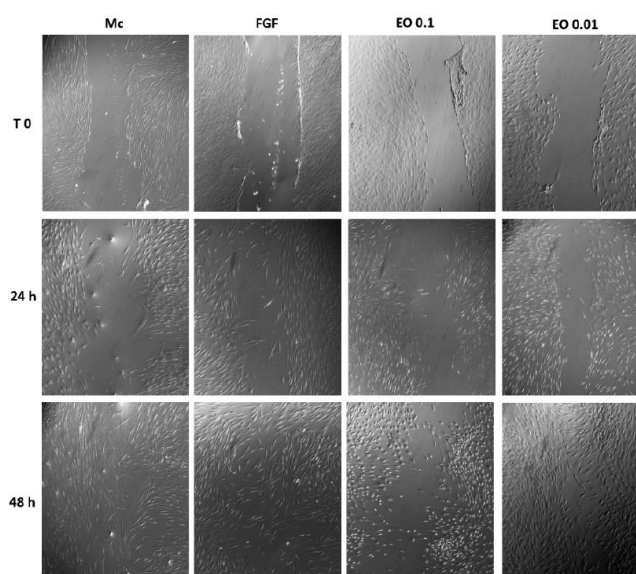


Figure 10. Cell migration test. A wound was simulated in the center of the cell monolayer and then the stimuli were applied: M: supplemented DMEM; FGF: fibroblast growth factor; EO: 0.1 and 0.01 mg/mL. The photographs corresponded to time 0 (immediately after inflicting the wound) at 24 h and 48 h after the application of stimuli.

3. Discussion

Studies of the *Bursera* species are very limited; the wound healing activity of the essential oil of *B. morelensis* was reported here for the first time.

The compounds that constitute the chemical mixture of the EO are responsible for their biological activities. The EO of *B. morelensis* used in this study is composed of 18 terpenes, of which probably *p*-menthane (SI 83%) is the main constituent. An isomer of *p*-menthane (*m*-menthane) has been reported in the EO of *Jatropha neopauciflora* (Pax), confirming its antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Vibrio cholera* [25]. The second compound in abundance is probably β -phellandrene (SI 68%), which has been identified in the EO of pine species, such as *Juniperus formosana* [19], as well as the EO of *Zanthoxylum bungeanum*, an oil that has potential in the treatment of psoriasis [26]. α -Pinene is the main constituent of the *Pistacia atlantica* resin, which has been proven to treat burn wounds, showing an increased concentration of basic fibroblast growth factor (bFGF) and platelet-derived growth factor (PDGF) and also increased angiogenesis [27]. In addition, α and β -pinene are present in the *Salvia officinalis* EO composition and have in vitro anti-inflammatory activity due to inhibited nitric oxide (NO) production in mouse macrophages [28]. In vitro testing found that caryophyllene and caryophyllene oxide inhibit the genotoxicity of a condensate of cigarette smoke [29]. Additionally, caryophyllene from the EO of *Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte has anticancer, antioxidant, and antimicrobial properties [30]. β -myrcene, orally administered to experimental animals, has demonstrated important protective activity in a model of the gastric ulcer [31]. Sabinene has shown strong anti-inflammatory activity mediated by the inhibition of NO production in macrophages [32], compared to α - and β -pinenes. Finally, *p*-cymene is one of the main compounds identified in thyme oil, and its ability to prevent lipidic peroxidation has been demonstrated [33]. These biological properties of the terpenes that constitute the essential oil of *B. morelensis* are the reason for the relevant wound healing activity that was observed in this essential oil.

In the test to determine the cytotoxicity, doxorubicin was used as a positive control. Doxorubicin is one of the most effective anthracycline antibiotics, with a broad antitumor spectrum [34], and it has been recognized that various EO components act as multi-target molecules. With the aim of developing novel antitumor drugs, various EOs have shown high efficacy against human cancer cells and low toxicity to normal human cells. Some EO components, such as terpenes, have been found to be effective against a broad range of cancers, for example, geraniol, D-limonene, and other monoterpenes [35]. Our results indicated that the EO of *B. morelensis* could be used in topical application for wound because, at a concentration of 1.2 mg/mL, only 24% of peritoneal macrophages were inhibited, in comparison with doxorubicin, and the IC₅₀ was = 0.85 μ g/mL, confirming that EO at the concentration tested was not cytotoxic.

The healing process depends on the biosynthesis and deposition of collagen and its maturation [36]. Our results showed that both EO treatments had the better structure of scar tissue and a greater deposit of collagen. The antibacterial and antifungal activity of the EO of *B. morelensis* might be partly responsible for the results shown here because due to its lipophilic characteristics, the EO permeates the plasma membranes of both bacteria and fungi, generating ionic imbalances in membrane potential and even mitochondrial respiration, causing cellular collapse [9]. In our working group, it has been shown that the *B. morelensis*' EO alters the expression of the gene that codifies the integrin INT1p. This is very important since the integrins are known to be key in the adhesion of *Candida albican*; furthermore, EO inhibits the growth of the germ tube and causes the loss of the integrity of the cell membrane of this yeast [10].

On the other hand, we believe that regulation of the inflammatory response may occur by the wound repair since it has been shown that this EO has anti-inflammatory activity when used in topical form to treat plantar edema in rats [8]. Even more, several of its components have been identified as anti-inflammatory agents that inhibit the production of NO [28,32], while others increase the production of essential agents, such as FGF and PDGF, for wound repair and favor angiogenesis [28] and antioxidant activity, which may have a protective effect against the oxidative stress generated

during the inflammatory stage [30,33]. Recently, it has been shown that α -phellandrene also inhibits leukocyte rolling and adhesion and production of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6, as well as the degranulation of compound 48/80-induced mast cells. This suggests that α -phellandrene plays an important role as an anti-inflammatory agent through neutrophil migration modulation and mast cell stabilization [37].

Since the tests in the murine model demonstrated healing activity, a series of in vitro tests was performed, with an intention to approach the mechanism of action of the EO of *B. morelensis*, contributing to the healing process. The results of the cell viability test (life/death, Figure 8) coincided with the results of cytotoxicity in macrophages (Figure 2), in the sense of very low cytotoxicity of EO and its dependence on concentration. On the other hand, proliferation tests showed that EO did not stimulate fibroblast proliferation (Figure 9). Finally, fibroblast migration results suggested that EO promoted fibroblast migration (Figure 10).

Other natural compounds have been analyzed for their wound healing activity. For example, it is known that asiaticoside, a triterpene, is a major component in the extracts of *Centella asiatica* and is an element designated as a priority compound in the healing activity of this plant due to its antimicrobial activity and its ability to reduce lipoperoxidation levels and activate cells of the malpighian layer of the epidermis [37]. Moreover, it has been demonstrated that the essential oil of *Pinus pinaster*, whose main component is α -pinene, has antioxidant, anti-inflammatory, and wound repair activity, showing good tensile strength in the in vivo models; in the in vitro tests, this essential oil has shown a certain inhibitory capacity of the collagenase, elastase, and hyaluronidase enzymes, which are related to the remodeling of scars [38].

The set of results obtained in this work suggested that the probable mechanism of action of the EO of *B. morelensis*, during the healing process, is the promotion of the migration of fibroblasts to the site of the wound, making them active in the production of collagen and promoting the remodeling of this collagen since it is known that during the wound repair process, endothelial cells and fibroblasts migrate to the site and accumulate granulation tissues by depositing collagen and other extracellular matrices. During the final stages of repair, the fibroblasts reshape the collagen by producing matrix metalloproteinases (MMP) over several months [39].

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material

Young *B. morelensis* stems were collected from adult trees in the Cañada region of Teotitlan de Flores Magon, Oaxaca, Mexico, located 1234 m above sea level at latitude 18°08'39.6" and longitude 97°03'37.0", during March 2016. Samples were packed for further processing in the laboratory. Some of the material was deposited at the National Herbarium of Mexico (MEXU) at the Universidad Nacional Autonoma de Mexico and the herbarium IZTA at the Facultad de Estudios Superiores Iztacala (voucher specimens: IZTA 42123).

4.2. EO Extraction

The EO was obtained using the hydro-distillation method with 2000 g of the fresh plant, young stems. The distillation equipment consisted of a round-bottomed 1 L flask with a heating mantle (SEVPrendo, MC301-9, Mexico city, Mexico) attached to a double pass condenser, which was coupled to a cold-water circulator. For this, five extractions were made, each with 400 g of plant, and 500 mL of water was added. The EO was separated spontaneously from the aqueous phase by density differences; the resultant water phase was frozen at -18 °C in order to easily separate the EO residues by decantation in screw cap test tubes. The EO was stored in a glass vial in the dark at -18 °C until tested. The extraction yield of EO from young stems was calculated by the following equation:

$$\% \text{ extraction yield (g/g)} = a/b \times 100 \quad (1)$$

where *a* is the weight of EO obtained during the distillation process, and *b* is the weight of the plant material used for EO extraction.

4.3. Chemical Characterization

The analysis of the essential oil from *B. morelensis* was performed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA,) using a gas chromatograph (model 6850, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled to a mass spectrometer (MS) (model 5975C, Agilent Technologies, USA), equipped with an RTX-50 column (30 m × 0.32 mm i.d. and 0.5 µm film thickness, Restek Corp, Bellefonte, PA, USA). Next, 1 µL of EO was injected by the split. The injector temperature was 280 °C. Peak area percentages were determined using RTE integrator software (Agilent Technologies, USA). The identification of the components was carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Samples were ionized by electron impact at 70 eV, and the temperature achieved by the ionization source was 230 °C. An RTX-50 column (30 m × 0.32 mm i.d., 0.5 µm film thickness, Restek Corp, USA) was used. The separation conditions were an initial temperature of 70 °C for 2 min, then rising with 2 heating ramps, the first by 20 °C/min until reaching 250 °C, and the second by 8 °C/min until reaching 280 °C, which was maintained for 5 min. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The identification of chemical components was performed by the NIST Library Version 8.0 database (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) [10].

4.4. Cytotoxicity

The cytotoxicity was determined using the crystal violet staining assay. It was performed with peritoneal macrophages from BALB/c mice seeded at 1.5×10^4 cells/well treated with different concentrations of EO (from 1 mg/mL to 0.0004 mg/mL) in DMEM-F12/L glutamine (Biowest, Nuaille, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest, France) and 1% penicillin/streptomycin (Biowest, France), followed by incubation at 37 °C and CO₂ 5% for 24 h. Subsequently, the medium was removed, and the remaining cells were stained at room temperature for 12 min with 50 µL/well crystal violet solution (1% crystal violet in 20% methanol/double-distilled water) and, consequently, washed several times with distilled water. The absorbance was measured at 595 nm. The relative viability was calculated as follows:

$$\text{Relative viability} = \frac{\text{EA} - \text{background absorbance}}{\text{UCA} - \text{background absorbance}} \times 100 \quad (2)$$

where EA is experimental absorbance, and UCA is untreated control absorbance. The viability percentages were compared with those obtained using doxorubicin. The assays were performed in triplicate modified from [40].

4.5. Animals

Male CD-1 strain mice 6 to 8 weeks old were obtained from the animal laboratory facility of the FES-Iztacala, UNAM, Edo. Mex., Mexico. The animals, divided into experimental groups consisting of 6 mice each, were separately housed in ventilated cages under a controlled light cycle (12 h light/12 h dark) at standard room temperature (22–24 °C) and were allowed access to a conventional diet and tap water ad libitum. All guidelines for the care and use of animals were followed (NOM-062-ZOO-1999), approved by the Institutional Ethics Committee of the UNAM, Facultad de Estudios Superiores Iztacala (CE/FESI/052019/1295).

4.6. Skin Irritation Study

A preliminary skin irritation test was performed on the CD-1 male mice (*Mus musculus*). The back skin of 9 mice was depilated, and the mice were assigned to 3 groups (*n* = 3 mice in each group). Group 1, untreated healthy skin; Group 2, vehicle cosmetic grade mineral oil (Kamecare,

Mexico); Group 3, 25% EO-treated skin. Twenty-four hours later, 10 μ L of 25% EO and mineral oil was applied epicutaneously every 12 h until 72 h, and the appearance of signs of irritation or erythema was recorded [37]. After this time, mice were sacrificed by CO₂ chamber, and the dissected skin was processed for histological analysis.

4.7. Wound-Healing Efficacy

Mice were assigned to 5 groups ($n = 6$ mice in each group), and their back skin was shaved. Twenty-four hours later, mice were anesthetized by inhalation of isoflurane. Aseptic and antiseptic procedures were used for shaved skin, and a 1 cm incision was made. The groups were classified as follows: Group 1: untreated skin without wound or healthy skin (HS); Group 2: untreated wound (UW); Group 3: wound treated with Recoverón NC[®] (Armstrong Lab, Mexico), as a positive control (C⁺); Group 4: 25% EO-treated wound (25EO); Group 5: 10% EO-treated wound (10EO). The wounds of Groups 4 and 5 were epicutaneously treated with 10 μ L of the respective treatment, whereas the wounds of the control group were covered with Recoveron cream every 12 h. All treatments were applied over 10 days. After this time, the mice were sacrificed using a CO₂ chamber. Immediately after the sacrifice, wound resistance to the tension was measured according to the tensiometric method [41]. The percentage of wound healing efficacy was calculated as:

$$\% \text{ wound healing efficacy} = \text{GSS/GHS} \times 100 \quad (3)$$

where GSS is grams used to open scarred skin, and GHS is grams used to open healthy skin.

4.8. Wound Contraction Model

To evaluate the wound contraction, the same groups of mice from the previous experiment were formed. In this procedure, a biopsy punch 5 mm in diameter, not deeper than the hypodermis, was performed, and the same treatment was applied every 12 h for 10 days. Every 2 days, the wound diameter was measured with a digital caliper (Mitutoyo, Tokyo, Japan), and the percentage of wound contraction was calculated considering the initial wound diameter as 100%.

4.9. Histopathological Observation

On day 10, the animals were sacrificed using a CO₂ chamber. Skin specimens of wounds were obtained and immediately fixed in 10% buffered formaldehyde over 24 h at room temperature. Afterward, the skin samples were paraffin-embedded to obtain 4 μ m-thick tissue sections, which were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and Masson's trichrome.

4.10. Isolation of Fibroblast

Fibroblasts were isolated from human skin, obtained by donation with written informed consent. The skin was taken from healthy voluntary donors, using a cylindrical scalpel for 5 mm biopsies, in septic and antiseptic conditions; the skin thus obtained was immediately deposited in Hank solution with antibiotic; later, in laminar flow hood, the skin samples were cut into smaller fragments, and each of these fragments was grown in Dulbecco Eagle Modified Low Glucose medium (DMEM-LG) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 100 mg/mL gentamicin), all of Gibco BRL (Rockville, MD, USA), and incubated at 37 °C and 5% CO₂. The culture medium was replaced every two days; after two weeks of culture, the explants (skin fragments) were removed. The fibroblasts were cultured to approximately 80% confluence, and the cells were separated with 0.05%/0.02% trypsin/EDTA and reseeded to generate sufficient cells for the following tests.

4.11. Cell Viability and Proliferation

Cell viability was analyzed in the monolayers of cultured fibroblasts through calcein and ethidium homodimer stain (LIVE/DEAD kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the instructions of the manufacturer. For the assays, 5000 cells/cm² were seeded in glass coverslips coated with poly-l-lysine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), cultured for 24 h with supplemented DMEM medium and stimulated with EO 1 mg/mL, EO 0.1 mg/mL, EO 0.01 mg/mL. Death control was obtained by treating cells with ethanol for 30 min before staining. Cells cultured with DMEM medium supplemented without EO were the control. Panoramic images (200 ×) were taken using a Nikon Eclipse 80i microscope (Nikon, Shinagawa, Tokyo, Japan) with the NIS-Elements F4 (Nikon) software (version Ver4.00.06, Tokyo, Japan). The total number of cells (live and dead) was counted with ImageJ software (version 1.52p, open source Java image processing program). The viability ratio was calculated according to the equation as follows:

$$\text{viability ratio} = \frac{\text{live cells}}{\text{live cells} + \text{dead cells}} \quad (4)$$

For the cell proliferation assay, the scaffolds were incubated with PrestoBlue reagent[®] (Thermo Fisher Scientific) for 1 h, and then the supernatants were placed into 96-well plates. The absorbance of the content in each well was measured at a wavelength of 570 nm using a spectrophotometric plate reader (Thermo Multi skan Ascent Type 354). Each experiment was conducted three times [42].

4.12. Cell Migration

For this test, the fibroblasts were cultured in a six-well plate; once the monolayer was confluent, a wound was simulated in the center of the monolayer; for this purpose, a micropipette tip was used to draw a line that crossed the plate. Afterward, the following stimuli were applied: supplemented DMEM medium, 0.01 mg/mL EO, fibroblast growth factor (FGF) 10 ng/mL (positive control), and the negative control was medium without stimulation. In these crops, a wound was simulated. The response of the cells was monitored by observation under a microscope for 48 h [43].

4.13. Statistical Analysis

Results are expressed as the mean ± standard error of the mean. The analysis of the data was done using a one-way analysis of variance with a Tukey–Kramer multiple comparison posthoc test ($p < 0.01$) using GraphPad Prism 7 software (version 7.00, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5. Conclusions

This work was the first report about the wound healing activity of the EO of *B. morelensis*. Our results indicated that this EO promoted the healing process by generating scars with effective tensile strength and accelerated wound closure by contributing to collagen deposition. The results also suggested that the essential oil of *B. morelensis* was involved in the healing process, stimulating the migration of fibroblasts to the wound site, with the consequent production of collagen. Additionally, due to its anti-inflammatory and antimicrobial capacity, it could be recommended for the treatment of minor wounds or where it is important to pay attention to the appearance and functionality of scars, such as eyelids and hands.

Author Contributions: Data curation, J.S.-O.; Formal analysis, J.S.-O. and M.A.R.-M.; Funding acquisition, M.M.C.-M.; Investigation, J.S.-O., M.J.-E., A.P.-T., A.E.C.-R., M.A.R.-M., and M.M.C.-M.; Methodology, J.S.-O. and R.B.-M.; Project administration, M.M.C.-M.; Resources, M.M.C.-M.; Supervision, M.J.-E., A.P.-T., A.E.C.-R., M.A.R.-M., and M.Ma.C.-M.; Visualization, J.S.-O.; Writing original draft, J.S.-O.; Writing—review and editing, M.M.C.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Judith Salas Oropeza is a doctoral student in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received fellowship 239,888 from CONACYT. This research was funded by the UNAM PAPIIT IN212317 project.

Acknowledgments: Authors thank to Luis Barbo Hernández Portilla, Evelyn Pulido Camarillo, Dra. Katia Jarquín Yáñez, Verónica Rodríguez Mata and Beatriz Hernández Téllez for expert technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Zolla, C. Traditional medicine in Latin America, with particular reference to Mexico. *J. Ethnopharmacol.* **1980**, *2*, 37–41. [[CrossRef](#)]
2. Espinosa, D.; Llorente, J.; Morrone, J.J. Historical biogeographical patterns of the species of *Bursera* (Burseraceae) and their taxonomic implications. *J. Biogeogr.* **2006**, *33*, 1945–1958. [[CrossRef](#)]
3. Becerra, X.J. Timing the origin and expansion of the Mexican tropical dry forest. *PNAS* **2005**, *31*, 10919–10923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Messina, F.; Curini, M.; Di Sano, C.; Zadra, C.; Gigliarelli, G.; Rascón-Valenzuela, L.A.; Robles Zepeda, R.E.; Marcotullio, M.C. Diterpenoids and triterpenoids from the resin of *Bursera microphylla* and their cytotoxic activity. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1184–1188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Canales, M.; Hernández, T.; Caballero, J.; Romo de Vivar, A.; Avila, G.; Duran, A.; Lira, R. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *97*, 429–439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Carretero, M.E.; López, P.J.L.; Abad, M.J.; Bermejo, P.; Tillet, S.; Israel, A.; Noguera, P.B. Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *116*, 11–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Serrano-Parrales, R.; Vásquez-Cruz, B.; Segura-Cobos, D.; Anaya-Lang, A.L.; Jimenez-Estrada, M.; Hernández, D.T.; Canales-Martínez, M. Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant properties of *Bursera morelensis* bark from San Rafael, Coxcatlán, Puebla (México): Implications for cutaneous wound healing. *J. Med. Plant Res.* **2012**, *6*, 5609–5615. [[CrossRef](#)]
8. Carrera-Martínez, C.A.; Rosas-López, R.; Rodríguez-Monroy, M.A.; Canales-Martínez, M.M.; Román-Guerrero, A.; Jiménez-Alvarado, R. Chemical composition and In vivo antiinflammatory activity of *Bursera morelensis* Ramírez essential oil. *J. Essent. Oil Bear. Plants* **2014**, *17*, 758–768. [[CrossRef](#)]
9. Canales-Martínez, M.; Rivera-Yáñez, C.R.; Salas-Oropeza, J.; Lopez, H.R.; Jimenez-Estrada, M.; Rosas-Lopez, R.; Duran, D.A.; Flores, C.; Hernandez, L.B. Rodríguez-Monroy, M.A. Antimicrobial activity of *Bursera morelensis* ramírez essential oil. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2017**, *14*, 74–82. [[CrossRef](#)]
10. Rivera-Yáñez, C.R.; Terrazas, L.I.; Jimenez-Estrada, M.; Campos, J.E.; Flores-Ortiz, C.M.; Hernandez, L.B.; Cruz-Sanchez, T.; Garrido-Fariña, G.I.; Rodríguez-Monroy, M.A.; Canales-Martínez, M.M. Anti-candida activity of *Bursera morelensis* Ramirez essential oil and two compounds, α -pinene and β -terpinene—An In vitro study. *Molecules* **2017**, *22*, 2095. [[CrossRef](#)]
11. Sorg, H.; Tilkorn, D.J.; Hager, S.; Hauser, J.; Mirastschijski, U. Skin wound healing: An update on the current knowledge and concepts. *Eur. Surg. Res.* **2017**, *58*, 81–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Gurtner, G.C.; Werner, S.; Barrandon, Y.; Longaker, M.T. Wound repair and regeneration. *Nature* **2008**, *453*, 314–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Wang, P.H.; Huang, B.S.; Horng, H.C.; Yeh, C.C.; Chen, Y.J. Wound healing. *J. Chin. Med. Assoc.* **2018**, *81*, 94–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Martin, P.; Leibovich, S.J. Inflammatory cells during wound repair: The good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol.* **2005**, *15*, 599–607. [[CrossRef](#)]
15. Enoch, S.; Leaper, D.J. Basic science of wound healing. *Surgery* **2007**, *26*, 31–37. [[CrossRef](#)]
16. Wilgus, T.A. Immune cells in the healing skin wound: Influential players at each stage of repair. *Pharmacol. Res.* **2008**, *58*, 112–116. [[CrossRef](#)]
17. Diegelmann, R.F.; Evans, M.C. Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front. Biosci.* **2004**, *9*, 283–289. [[CrossRef](#)]
18. Thakur, R.; Jain, N.; Pathak, R.; Sandhu, S.S. Practices in wound healing studies of plants. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2011**, *2011*, 438056. [[CrossRef](#)]
19. Gordaliza, M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin. Trans. Oncol.* **2007**, *9*, 767–776. [[CrossRef](#)]

20. Wurtele, E.S.; Chappell, J.; Jones, A.D.; Celiz, M.D.; Ransom, N.; Hur, M.; Rizshsky, L.; Crispin, M.; Dixon, P.; Liu, J.; et al. Medicinal plants: A public resource for metabolomics and hypothesis development. *Metabolites* **2012**, *4*, 1031–1059. [CrossRef]
21. Miguel, M.G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules* **2010**, *15*, 9252–9287. [CrossRef]
22. Silva, L.L.; Garlet, Q.I.; Benovit, S.C.; Dolci, G.; Mallmann, C.A.; Bürger, M.E.; Baldisserotto, B.; Longhi, S.J.; Heinzmann, B.M. Sedative and anesthetic activities of the essential oils of *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. and their isolated components in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2013**, *46*, 771–779. [CrossRef] [PubMed]
23. Lenardão, E.J.; Savegnago, L.; Jacob, R.G.; Victoriaa, N.; Martineza, D.M. Antinociceptive effect of essential oils and their constituents: An update review. *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, *27*, 435–474. [CrossRef]
24. Orchard, A.; van Vuuren, S. Commercial essential oils as potential antimicrobials to treat skin diseases. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2017**, 4517971. [CrossRef] [PubMed]
25. Hernández-Hernández, A.B.; Alarcón-Aguilar, F.J.; Jiménez-Estrada, M.; Hernández-Portilla, L.B.; Flores-Ortiz, C.M.; Rodríguez-Monroy, M.A.; Canales-Martinez, M. Biological properties and chemical composition of *Jatropha neopauciflora* Pax. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2016**, *14*, 32–42. [CrossRef] [PubMed]
26. Li, K.; Zhou, R.; Wang Jia, W.; Li, Z.; Li, J.; Zhang, P.; Xiao, T. *Zanthoxylum bungeanum* essential oil induces apoptosis of HaCaT human keratinocytes. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *186*, 351–361. [CrossRef]
27. Haghdoust, F.; Baradaran Mahdavi, M.M.; Zandifar, A.; Sanei, M.H.; Zolfaghari, B.; Javanmard, S.H. *Pistacia atlantica* resin has a dose-dependent effect on angiogenesis and skin burn wound healing in rat. *J. Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2013**, 893425. [CrossRef]
28. Abu-Darwish, M.S.; Cabral, C.; Ferreira, I.V.; Gonçalves, M.J.; Cavaleiro, C.; Cruz, M.T.; Al-bdour, T.H.; Salgueiro, L. Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: Assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential. *BioMed. Res. Int.* **2013**, 538940. [CrossRef]
29. Di Giacomo, S.; Abete, L.; Cocchiola, R.; Mazzanti, G.; Eufemi, M.; Di Sotto, A. Caryophyllane sesquiterpenes inhibit DNA-damage by tobacco smoke in bacterial and mammalian cells. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *111*, 393–404. [CrossRef]
30. Dahham, S.S.; Tabana, Y.M.; Iqbal, M.A.; Ahamed, M.B.K.; Ezzat, M.O.; Majid, A.S.A.; Majid, A.M.S.A. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules* **2015**, *20*, 11808–11829. [CrossRef]
31. Bonamin, F.; Moraes, T.M.; dos Santos, R.C.; Kushima, H.; Faria, F.M.; Silva, M.A.; Junior, I.V.; Nogueira, L.; Bauab, T.M.; Brito, A.R.S. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: The role of β -myrcene in preventing peptic ulcer disease. *Chem. Biol. Interact.* **2014**, *212*, 11–19. [CrossRef] [PubMed]
32. Valente, J.; Zuzarte, M.; Gonçalves, M.J.; Lopes, M.C.; Cavaleiro, C.; Salgueiro, L.; Cruz, M.T. Antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Oenanthe crocata* L. essential oil. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *62*, 349–354. [CrossRef] [PubMed]
33. Burkovská, A.; Čikoš, Š.; Juhás, Š.; Il'Ková, G.; Reháč, P.; Koppel, J. Effects of a combination of thyme and oregano essential oils on TNBS-induced colitis in mice. *Mediat. Inflamm.* **2007**, 23296. [CrossRef]
34. Chhikara, S.; Jean, N.; Mandal, D.; Kumar, A.; Parang, K. Fatty acyl amide derivatives of doxorubicin: Synthesis and in vitro anticancer activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2037–2042. [CrossRef]
35. Stringaro, A.; Colone, M.; Angiolella, L. Antioxidant, antifungal, antibiofilm, and cytotoxic activities of *Mentha* spp. essential oils. *Medicines* **2018**, *5*, 112. [CrossRef]
36. Sawatdee, S.; Choochuay, K.; Chanthorn, W.; Srichana, T. Evaluation of the topical spray containing *Centella asiatica* extract and its efficacy on excision wounds in rats. *Acta Pharm.* **2016**, *66*, 233–244. [CrossRef]
37. Siqueira, H.D.S.; Neto, B.S.; Sousa, D.P.; Gomes, B.S.; da Silva, F.V.; Cunha, F.V.M.; Wanderley, C.W.S.; Pinheiro, G.; Cândido, A.G.F.; Wong, D.V.T.; et al. α -Phellandrene, a cyclic monoterpene, attenuates inflammatory response through neutrophil migration inhibition and mast cell degranulation. *Life Sci.* **2016**, *160*, 27–33. [CrossRef]
38. Tümen, İ.; Akkol, E.K.; Taştan, H.; Süntar, I.; Kurtca, M. Research on the antioxidant, wound healing, and anti-inflammatory activities and the phytochemical composition of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *211*, 235–246. [CrossRef]

39. Hong, S.J.; Jia, S.X.; Xie, P.; Xu, W.; Leung, K.P.; Mustoe, T.A.; Galiano, R.D. Topically delivered adipose derived stem cells show an activated-fibroblast phenotype and enhance granulation tissue formation in skin wounds. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e55640. [[CrossRef](#)]
40. Tu, C.Y.; Chen, Y.F.; Lii, C.K.; Wang, T.S. Methylglyoxal induces DNA crosslinks in ECV304 cells via a reactive oxygen species-independent protein carbonylation pathway. *Toxicol. In Vitro* **2013**, *27*, 1211–1219. [[CrossRef](#)]
41. Salas, J.; Tello, V.; Zavaleta, A.; Villegas, L.; Salas, M.; Fernandez, I.; Vaisberg, A. Actividad cicatrizante del latex de *Jatropha curcas* (Angiospermae: Euforbiaceae). *Rev. Biol. Trop.* **1994**, *42*, 323–326. [[PubMed](#)]
42. Vázquez, N.; Sánchez-Arévalo, E.; Maciel-Cerda, A.; Garnica-Palafox, I.; Ontiveros-Tlachi, R.; Chaires-Rosas, C.; Piñón-Zarate, G.; Herrera-Enríquez, M.; Hautefeuille, M.; Vera-Graziano, R.; et al. Influence of the PLGA/gelatin ratio on the physical, chemical and biological properties of electrospun scaffolds for wound dressings. *Biomed. Mater.* **2019**, *14*, 045006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Liang, C.C.; Park, A.Y.; Guan, J.L. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 329–333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Sample Availability: Samples of the essential oils from other seasons are available from the authors.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

APÉNDICE VIII. Artículo de investigación publicado durante los estudios de doctorado (coautor).

Referencia completa:

Canales-Martinez, M.; Rivera-Yañez, C.R.; Salas-Oropeza, J.; Lopez, H.R.; Jimenez-Estrada, M.; Rosas-Lopez, R.; Duran, D.A.; Flores, C.; Hernandez, L.B. Rodriguez-Monroy, M.A. Antimicrobial activity of *Bursera morelensis* ramírez essential oil. Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med. 2017, 14, 74–82. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i3.8>

Canales-Martínez, M.^{1*}, Rivera-Yañez, C.R.¹, Salas-Oropeza, J.¹, Lopez, H.R.¹, Jimenez-Estrada, M.²,
Rosas-Lopez, R.³, Duran, D.A.¹, Flores, C.⁴, Hernandez, L.B.⁴, Rodriguez-Monroy, M.A.⁵

¹ Laboratorio de Farmacognosia, Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO), Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México. ²Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán. ³Universidad de la Cañada. Carr. Teotitlán San Antonio Nahuatipan Km 1.7. Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, México. ⁴Laboratorio de Fisiología Vegetal, UBIPRO y Laboratorio Nacional en Salud, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala UNAM, Edo. Mex, Tlalnepantla, México. ⁵Laboratorio de Inmunobiología, Carrera de Medicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. De los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México.

Corresponding Author's E-mail: dra.margaritacanales@gmail.com

Abstract

Background: *Bursera morelensis*, known as “Aceitillo”, is an endemic tree of Mexico. Infusions made from the bark of this species have been used for the treatment of skin infections and for their wound healing properties. In this work, we present the results of a phytochemical and antimicrobial investigation of the essential oil of *B. morelensis*.

Materials and Methods: The essential oil was obtained by a steam distillation method and analyzed using GC-MS. The antibacterial and antifungal activities were evaluated.

Results: GC-MS of the essential oil demonstrated the presence of 28 compounds. The principal compound of the essential oil was α -Phellandrene (32.69%). The essential oil had antibacterial activity against Gram positive and negative strains. The most sensitive strains were *S. pneumoniae*, *V. cholerae* (cc) and *E. coli* (MIC 0.125 mg/mL, MBC 0.25 mg/mL). The essential oil was bactericidal for *V. cholerae* (cc). The essential oil inhibited all the filamentous fungi. *F. moniliforme* (IC₅₀ = 2.27 mg/mL) was the most sensitive fungal strain.

Conclusions: This work provides evidence that confirms the antimicrobial activity of the *B. morelensis* essential oil and this is a scientific support about of traditional uses of this species.

Keywords: Essential oil; Medicinal plants; Tehuacan-Cuicatlan Valley; Burseraceae; Bursera.

Introduction

The genus *Bursera* Jacq.exL comprises approximately 100 species distributed from the South of the United States to Peru (Rzedowski and Guevara-Féfer, 1992). Approximately 70 species of *Bursera* are endemic to Mexico (Rzedowski, 1986). Several species produce an aromatic resin known as “copal”, which has been commonly burnt as incense in religious activities throughout the country since ancient times (Peters et al., 2003). Many *Bursera* species are important in Mexican folk medicine. Their use is related to fragrance in addition to its medicinal properties against diarrhea, fever, gingivitis, cough and measles (Hernández-Hernández et al., 2005).

Bursera morelensis Ramírez (Burseraceae), known as “Aceitillo”, is an endemic tree of Mexico and is found in Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Morelos, Oaxaca, Puebla, Queretaro and San Luis Potosi states (Rzedowski and Guevara-Féfer, 1992). An infusion made from the bark of this species has been used for the treatment of skin infections and for its wound healing properties by the inhabitants of San Rafael, Coxcatlan, Puebla, Mexico.

The Burseraceae family has been shown to have anti-inflammatory, antibacterial and cytotoxic activities (Carrera-Martínez et al., 2014; Carretero et al., 2008; Queiroga et al., 2007; Zúñiga et al., 2005; Yasunaka et al., 2005; Jutiviboonsuk et al., 2005; Sosa et al., 2002).

The chemical profile of the genus *Bursera* includes essential oils, triterpenes, steroids, bilignans, podophyllotoxin-like lignans and flavonoids (Zúñiga et al., 2005; Culioli et al., 2003; Syamasundar and Mallavarapu, 1995). Phytochemical studies of *B. morelensis* led to the identification of two lignans with cytotoxic activity (Jolad et al., 1977) and found terpenoids in the volatile fraction from the bark (Zúñiga et al., 2005). However, there are no studies regarding the antibacterial and antifungal properties of this species. In the present study, we present the results of our phytochemical and antimicrobial investigation of the essential oil of *Bursera morelensis*.

Material and methods

Plant material

B. morelensis was obtained from San Rafael, Coxcatlan, Puebla in October 2013. Voucher specimens (IZTA 42123) were deposited at the National Herbarium of Mexico (MEXU) at the Universidad Nacional Autónoma de México and the herbarium IZTA at the Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

San Rafael is a village in the municipality of Coxcatlan, located southeast of the Tehuacan-Cuicatlan Valley at coordinates 18°12' and 18°14' north and 97°07' and 97°09' west and at 957 m above sea level. The climate is dry or arid with summer rains and a mean temperature of 22°C (Fernández, 1999).

The vegetation is a thorn scrub forest with species such as *Bursera morelensis* Ramírez, *B. aptera* Ramírez, *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeb., *Opuntia puberula* Pfeiffer, *Ceiba parvifolia* Rose, and *Acacia cochliacantha* Humb. & Bonpl. ex Willd (Rzedowski, 1978; Fernández, 1999; Casas et al., 2001).

The collection of specimens from the field was carried out with permission from the Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SGPA/DGVS/1266).

Essential oil extraction

The essential oil was obtained using the steam distillation method (2000 g of fresh plant, young stems and pieces of bark). The distillation equipment consisted of a round-bottomed 1.5 L flask with a heating mantle (SEV-Prendo, MC301-9, Mexico) attached to a double pass condenser, which in turn was coupled to a cold-water circulator. A total of 250 g of fresh plant was placed in distilled water in the round-bottomed flask and was left to distil for approximately 30 minutes. This process was repeated, with new plant material and water each time, and the essential oil that was extracted in each distillation was collected. The essential oil was stored in amber glass vials at -18°C until used.

The essential oil was analyzed in a gas chromatograph model 6850 (Agilent Technologies, USA) equipped with a column HP-5 ms (Agilent Technologies, 30 m x 0.25 mm i.d. and 0.25 µm film thickness, China). Next, 1 µL of essential oil was injected by split. The column was programmed as follows: 70°C for 2 minutes and increased to 230°C at 20°C/min. At 230°C, a programmed linear gradient increased the temperature 8°C/min to 280°C. The injector temperature was 280 °C. Helium was used as the gas carrier at a flow rate of 1.0 mL/min. The total analysis time was 21.25 min. Peak area percentages were determined using RTE integrator software (Agilent Technologies, China). The identification of the components was carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) using a gas chromatograph model 6850 (Agilent Technologies, USA) coupled to a mass spectrometer (MS) model 5975C (Agilent Technologies, China). The sample was ionized by electron impact at 70 eV, and the temperature achieved by the ionization source was 230°C. The oil components were identified by comparison of their retention indices and mass spectra with the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 8.0.

Microorganisms

The following strains of bacteria were used: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* (clinical isolate), *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus pneumoniae* (clinical isolate donated by Hospital Angeles (Metropolitano)), *Vibrio cholerae* INDRE 206 (isolated from polluted water), *Vibrio cholerae* (a clinical isolate corresponding with group 01, producing enterotoxin, serotype "Inaba", biotype "El Tor"), *Vibrio cholera* CDC V 12, *Escherichia coli* (clinical isolate), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter aerogenes* (donated by the Laboratory of Microbiology of FES-Cuatitlan UNAM), *Yersinia enterocolitica* (donated by the Clinical Analysis Laboratory of University Hospital Campus Iztacala), *Proteus mirabilis* clinical isolate donated by Hospital Angeles (Metropolitano).

The fungal strains used: *Fusarium sporotrichioides* (ATCC NRLL3299), *Fusarium moniliforme* (CDBB-H-265), *Trichophyton mentagrophytes* (CDBB-H-1112), *Aspergillus niger* (CDBB-H-179), and *Rhizoctonia lilacina* (CDBB-H-306).

Antibacterial activity

Antibacterial activity was measured using the disc-diffusion method (Vanden Berghe and Vlietinck, 1991). The microorganisms were grown overnight at 37°C in 10 mL of Müeller Hinton broth (Bioxon 260-1, Estado de México, México). The cultures were adjusted to a turbidity comparable to McFarland no. 0.5 standard with sterile saline solution. Petri dishes containing Müeller Hinton agar (Bioxon, Edo. de México, México) were impregnated with these microbial suspensions. 5-mm diameter discs (Whatman no. 5) were saturated with 5 µL of essential oil. Discs of chloramphenicol (25 µg) were used as positive controls. The plates were incubated overnight at 37°C, and the

doi:10.21010/ajtcam.v14i3.8

diameters of any resulting inhibition zones (mm) were measured. Each experiment was repeated at least three times. Estimation of the minimal inhibitory concentration (MIC) was carried out using the broth dilution method (Vanden Berghe and Vlietinck, 1991). Dilutions of essential oil from 4000 to 62.5 µg/mL were used. Tubes were inoculated with a microorganism suspension of 10⁵ CFU/mL. MIC values were defined as the lowest essential oil concentration that prevents visible bacterial growth after 24 h of incubation at 36°C. Chloramphenicol was used as a reference. Each experiment was repeated at least three times.

The bactericidal kinetic assay was performed using appropriate concentrations of essential oil (corresponding to ½MIC, MIC and MBC) (Lennette et al., 1987).

Antifungal activity

The antifungal activity assay was carried out in Petri dishes (80 mm x10 mm) containing PDA agar (30 mL) (Bioxon, Edo. de Mexico, Mexico). After each mycelial colony had developed, disks impregnated with 5 µL of essential oil were placed at a distance of 10 mm from the Petri dish's edge, and the dishes were then incubated at 23 °C for 72 h until mycelia growth had enveloped the disks containing the control and had formed crescents of inhibition around disks containing samples with antifungal activity (Ye et al., 1999). Ketoconazol (7 µg/disk) was used as positive control.

For the quantitative assays, 24-wells culture plates were used. Six dilutions of essential oil were added to PDA agar at 45°C, rapidly mixed and poured into three wells of a culture plate; after the agar solidified, a small amount (1 X 1 mm) of mycelia was inoculated in each well. Ketoconazole was used as a positive control. After incubation at 23°C for 48 h, the area of the mycelium colony was measured, and the inhibition of fungal growth and the IC₅₀ was determined using the following formula:

$$I(\%) = \frac{d_c - d_t}{d_c} \times 100$$

d_c: diameter of the colony of the control culture

d_t: diameter of the colony of the treated culture

The IC₅₀ values were calculated using rectangular hyperbola regression of plots, where the abscissa represented the concentration of the essential oil, and the ordinate represented the average percent of inhibition of fungal growth from three replicates.

Results

The essential oil obtained of *B. morelensis* young stems and pieces of bark was translucent and colorless with a density of 0.86 g/mL and a yield of 4.1804 g (0.21%).

Chromatographic analysis by GC-MS of the essential oil demonstrated the presence of 28 compounds. The five principal compounds were α-Fellandrene (32.69%), β-Fellandrene (14.79%), o-Cymene (8.71%), Isocaryophyllene (7.48%) and α-Pinene (5.82%) (Figure 1, Table 1).

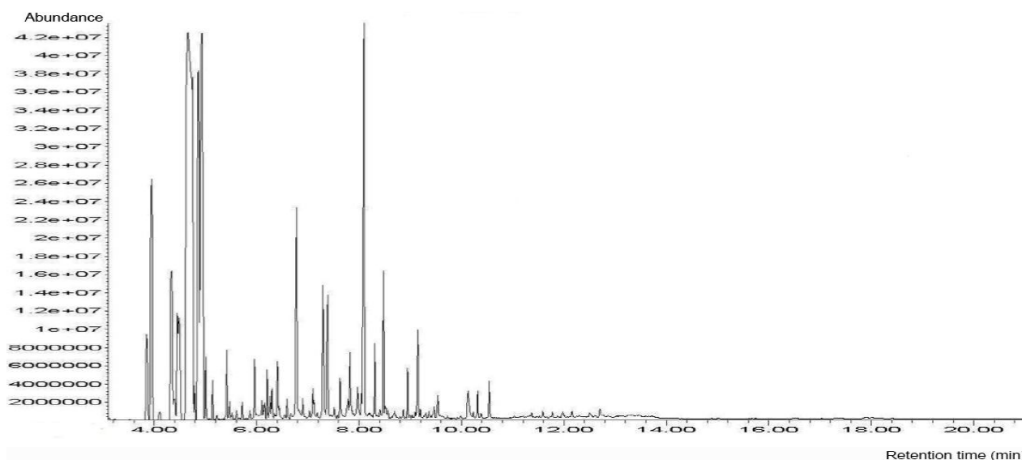


Figure 1: Chromatogram plot of *B. morelensis* essential oil.

Table 1: Chemical composition of *Bursera morelensis* essential oil.

Compound	Retention time (min)	Abundance (%)
β-Thujene	3.856	1.99%
α-Pinene	3.945	5.82%
Sabinene	4.329	2.65%
β-Pinene	4.450	2.56%
β-Myrcene	4.490	2.15%
α-Phellandrene	4.658	32.69%
o-Cymene	4.866	8.71%
β-Phellandrene	4.938	14.79%
β-Ocimene	5.011	0.65%
γ-Terpinene	5.139	0.42%
α-Terpinolene	5.411	0.88%
4,5-Epoxycarene	5.956	0.69%
Terpinen-4-ol	6.205	0.58%
α-Terpineol	6.301	0.47%
Neoisothujol	6.405	0.71%
Bicyclo[3.1.0]hexane-6-methanol, 2-hydroxy-1,4,4-trimethyl-	6.774	3.62%
Camphenol	7.095	0.46%
Pinanediol	7.295	2.96%
5-Isopropenyl-2-methyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-ol	7.383	1.80%
Bornane-2,3-diol	7.784	0.42%
Decahydronaphthalene-1-ol-3-ketone	7.976	0.60%
Isocaryophyllene	8.096	7.48%
α-Caryophyllene	8.305	0.85%
β-Cubebene	8.481	1.99%
Denderalasin	8.946	0.61%
Caryophyllene oxide	9.146	1.17%
β-Eudesmol	9.539	0.35%
Bicyclo[3.1.1.]hept-3-ene,2-formylmethyl-4,6,6-trimethyl	10.541	0.50%
Total		98.22%

The essential oil had antibacterial activity against all strains (Gram positive and negative). ANOVA analysis showed that there were significant differences between the strains (P<0.0001), but not between the bacterial group (Gram positive and negative) (P<0.0001). The most sensitive strains to the essential oil were *S. pneumoniae*, *V. cholerae* (cc) and *E. coli* (MIC 0.125 mg/mL, MBC 0.25 mg/mL) (Table 2).

Table 2: Antibacterial activity of *Bursera morelensis* essential oil.

Bacteria	Positive control Chloramphenicol (mm)	Inhibition zones (mm)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>S. aureus</i> (cc)	11.0 ± 1.00	7.50 ± 0.50	1.0	3.0
<i>S. aureus</i> 29213	10.0 ± 1.00	7.16 ± 0.57	1.0	3.0
<i>S. epidermidis</i>	30.0 ± 0.57	7.50 ± 0.50	2.0	>4.0
<i>B. subtilis</i>	24.0 ± 1.00	11.33 ± 0.28	3.0	4.0
<i>S. pneumonia</i>	30.0 ± 0.00	9.50 ± 0.50	0.125	0.25
<i>E. faecalis</i>	24.0 ± 0.57	7.16 ± 0.28	3.0	>4.0
<i>V. cholerae</i> (INDRE 206)	8.33 ± 0.58	11.33 ± 0.57	2.0	4.0
<i>V. cholerae</i> (cc)	23.3 ± 1.00	20.30 ± 1.52	0.125	0.25
<i>V. cholerae</i> (El Tor)	7.33 ± 0.58	6.16 ± 0.28	3.0	>4.0
<i>E. aerogenes</i>	22.0 ± 0.50	6.00 ± 0.00	3.0	>4.0
<i>Y. enterocolitica</i> (CUSI)	26.50 ± 0.50	7.00 ± 0.00	3.0	>4.0
<i>P. aeruginosa</i>	20.0 ± 0.00	6.83 ± 0.28	3.0	>4.0
<i>P. mirabilis</i>	17.3 ± 0.60	9.33 ± 0.57	3.0	>4.0
<i>E. coli</i> (cc)	21.7 ± 0.58	6.00 ± 0.00	0.125	0.25

Figures 2 and 3 show the effect of the essential oil on the survival curve for Gram negative (*V. cholerae* cc) and Gram positive bacterial (*S. aureus* clinical isolate). *V. cholerae* (cc) was inhibited at three concentrations (1/2 MIC, MIC and MBC); the essential oil was bactericidal from the first hour of interaction with the bacterium. Nevertheless, the essential oil only (MIC and MBC concentration) decreased the bacterial growth and showed a bacteriostatic activity for the Gram-positive strain *S. aureus*.

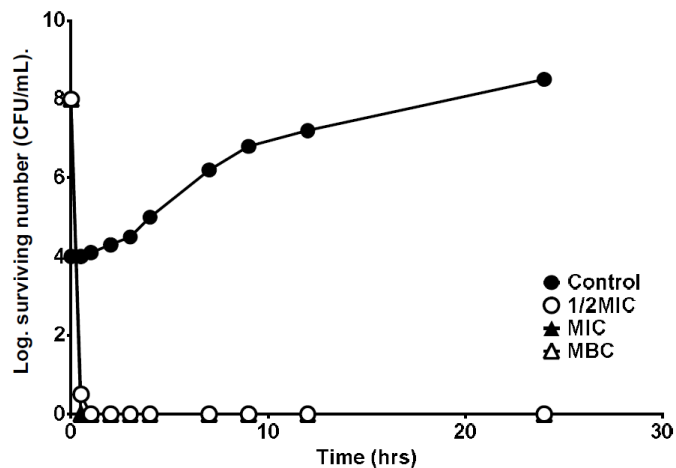


Figure 2: Survival curve of *Vibrio cholerae* (cc) exposed to essential oil of *B. morelensis*. The essential oil was added to each experimental culture at time zero. The concentrations used were as follows: 0.0625 mg/mL (1/2 MIC), 0.125 mg/mL (MIC) and 0.250 mg/mL (MBC). The control tube contained only broth.

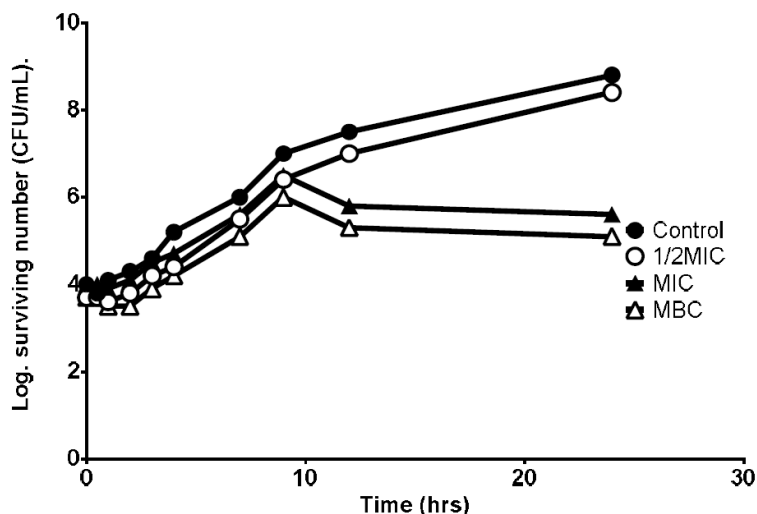


Figure 3: Survival curve of *S. aureus* (cc) exposed to the essential oil of *B. morelensis*. The essential oil was added to each experimental culture at time zero. The concentrations used were as follows: 0.5 mg/mL (1/2 MIC), 1.0 mg/mL (MIC) and 3.0 mg/mL (MBC). The control tube contained only broth.

A qualitative test demonstrated that the essential oil inhibited all the filamentous fungi strains except *F. sporotrichioides*. ANOVA analysis showed that there were significant differences between the sensitivity of the fungal strains to the essential oil ($P < 0.0001$). The more sensitive strain was *F. moniliforme* ($IC_{50} = 2.27$ mg/mL) (Table 3).

Table 3: Antifungal activity of *Bursera morelensis* essential oil.

Filamentous fungi	Essential oil IC_{50} (mg/mL)	Ketoconazol (μ g/mL)
<i>F. moniliforme</i>	2.27	7.55
<i>R. lilacina</i>	3.32	21.56
<i>A. niger</i>	1.60*	15.29
<i>Aspergillus sp.</i>	1.84*	9.75
<i>T. mentagrophytes</i>	1.99*	1.16

*CF₂₅: the essential oil only inhibited the 25% of the mycelial growth.

Discussion and Conclusion

Mexico has a large diversity of *Bursera* species, the majority of which are endemic to Mexico. Studies of the *Bursera* species are very limited; the relationship between the antimicrobial activity and the chemical composition of the essential oil of *B. morelensis* is reported here for the first time.

A total of 28 compounds were detected in the essential oil; α -Phellandrene (32.69%), β -Phellandrene (14.79%), *o*-Cymene, (8.71%), Isocaryophyllene (7.48%) and α -Pinene (5.82%) were the most abundant (Fig. 1, Table 1). Rzedowki and Ortiz (1988), detected 12 and 16 compounds (terpenoids) in the essential oil obtained from bark samples of the 8 trees at two different times (September 1982 and October 1983). The two majority of the compounds (α and β -Phellandrene) were also detected in the essential oil of *B. morelensis* collected in August and September of 2012; nevertheless, we did not detect any organic acids as reported by Carrera-Martínez (2014). These differences may be due to the essential oil extraction time, or the influence of the season. Others species of the Burseraceae family had different essential oil composition (number of terpenes detected and majoritarian compounds). Fifty compounds were detected in *Boswellia sacra*, and *E*- β -Ocimene (32.3%) and limonene (33.5%) were the most abundant (Al-Harrasi and Al-Said., 2008). Thirty-seven compounds were detected in the leaves of *Bursera graveolens*, and 27 compounds were detected in the stems. Limonene (48.2%), caryophyllene oxide (13.6%), and trans-caryophyllene (8.1%) were the most abundant in the leaves. Limonene (42.1%) and menthofuran (14.7%) were the most abundant in the stems (Leyva et al., 2007). In another study of *B. graveolens*, 11 compounds were detected in the essential oil derived from dry branches; viridiflorol (70.82%) and 3'-4'-(Methylenedioxy) (6.09%) were the most abundant in this extract (Manzano et al., 2009). This demonstrates that the type, abundance and principal compounds depend not only on the species but also on

the collection site, the part of the plant, the time of year when samples are obtained, the storage conditions and the essential oil extraction methodology (Harborne, 1988; Magiatis et al., 2002). Some of these compounds have been found in the chemical composition of essential oils from other plants with biological activity, for example, α -Phellandrene and β -Phellandrene were found in essential oils from the root and stem, respectively, of *Ligularia persica* Boiss (Mohadjerani et al., 2016). α -Pinene and β -Phellandrene were found in an essential oil from *Chamaecyparis obtuse* that showed antimicrobial activity and the inhibition of some virulence genes from *Streptococcus mutans* (Kim et al., 2016). *o*-Cymene was one of the components found in the *Echinophora platyloba* D.C methanolic extract that has antimicrobial activity (Hashemi et al., 2013).

The antibacterial activity of the *B. morelensis* essential oil depended on the bacterial strains treated ($P < 0.0001$) (Table 2); nevertheless, there were no significant differences between Gram-positive and Gram-negative bacteria. The strains most sensitive to the essential oil were *S. aureus* (cc) (CMI=1 mg/mL), *S. aureus* 29213 (CMI=1 mg/mL), *S. pneumoniae* (CMI=0.125 mg/mL), *V. cholerae* (cc) (CMI=0.125 mg/mL) and *E. coli* (cc) (CMI=0.125 mg/mL) (Table 2). Essential oils act on the cellular membrane (Cichewicz and Thorpe, 1996). Our results can be better understood by taking into account the number of compounds found in an essential oil, which is why essential oils do not have cellular specific targets (Carson et al., 2002). Due to its lipophilic nature, the essential oils pass through the cytoplasmic membrane and the cell walls and disrupt their structure leading to membrane permeabilization (Bakkali et al., 2008). The permeabilization of the bacterial membrane causes ion outflow and membrane potential changes, the collapse proton pump and ATP depletion (Ultee et al., 2000, 2002; Di Pasqua et al., 2006; Turina et al., 2006). The essential oil coagulates the cytoplasm and damages the lipids and proteins (Ultee et al., 2002; Burt, 2004).

The terpenes detected in the *B. morelensis* essential oil (α and β -Phellandrene, α -Pinene, *o*-Cymene and isocaryophyllene) have antibacterial and antifungal activities (Burt, 2004; Kordali et al., 2005; Abad et al., 2007; Tangarife et al., 2011). The chemical composition of the essential oils determines their antimicrobial activity; the most abundant compounds usually determine an oil's biological and biophysical properties, but it is possible that the activity of the principal compounds is regulated by the minor compounds (Santana-Rios et al., 2001; Hoet et al., 2006). In addition, it is probable that many compounds in the essential oil can define its fragrance, density, color and the penetration of the cell wall (Cal, 2006).

The *B. morelensis* essential oil also has antifungal activity; five of the strains tested were inhibited. *F. moniliforme* was the most sensitive strain to the essential oil (66.67% of growth inhibition). The antifungal activity of the essential oil is due to the alteration of the cell membrane; terpenes specifically inhibit the respiration and ion transport processes (Burt, 2004; Kosalec et al., 2005; Kordali et al., 2005; Abad et al., 2007; Tangarife et al., 2011). Another essential oil fungal inhibition mechanism is the disruption ergosterol synthesis (Ricci et al., 2005; Parveen et al., 2004)

Interestingly, during the antifungal assay the mycelium grew vertically and not on the agar and produced no spores, particularly in *Aspergillus* strains. This may be evidence that the essential oil is an anti-sporulating agent. Spore formation is inhibited by some essential oils, although the growth of aerial hyphae is unaffected. Biochemical studies showed that the inhibition of spore formation may be closely related to the inhibition of filamentous fungal cell respiration (Inouye et al., 1998). Further study is necessary to confirm this observation.

Taken together, the above results demonstrate that the essential oil of *B. morelensis* has several compounds that may be responsible for antimicrobial activity, thus confirming its use in Mexican traditional medicine.

Acknowledgments

This work was supported by the PAPCA 2014-FESI-UNAM under Grant 9 and PAPIIT, UNAM under Grant IN211614.

References

1. Abad, M.J., Ansuategui, M., y Bermejo, P. (2007). Active antifungal substances from natural sources. Arkivoc. VII: 116-145.
2. Al-Harrasi, A., Al-Said S. (2008). Phytochemical Analysis of the Essential Oil from Botanically Certified Oleogum Resin of *Boswellia sacra* (Omani Luban). Molecules. 13: 2181-2189.
3. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. Food Chem Toxicol. 46: 446–475.
4. Burt, S. A. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International J Food Microbiol. 94: 223-253.
5. Cal, K. (2006). Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. Planta Med. 72: 311–316.

doi:10.21010/ajtcam.v14i3.8

6. Carrera-Martínez, C.A., Rosas-López, R., Rodríguez-Monroy, M.A., Canales-Martínez, M., Román-Guerrero, A., Jiménez-Alvarado, R. (2014). Chemical composition and *in vivo* anti-inflammatory activity of *Bursera moreletensis* Ramírez Essential Oil. *J Essent Oil Bear Pl.* 17: 158-168.
7. Carretero, M.E., López-Pérez, J.L., Abad, M.J., Bermejo, P., Tillet, S., Israel, A., Noguera-P., B. (2008). Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves. *J Ethnopharmacol.* 116: 11-15.
8. Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Ch.* 46: 1914-1920.
9. Casas, A., Valiente-Banuet, A., Viveros, J.L., Caballero, J., Cortés, L., Dávila, P., Lira, R., Rodríguez, I. (2001). Plant resources of the Tehuacan-Cuicatlan Valley, Mexico. *Econ Bot.* 55: 129-166.
10. Cichewicz, R.H., Thorpe, P.A. (1996). The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) & their uses in Mayan Medicine. *J Ethnopharmacol.* 52: 61-70.
11. Culioli, G., Mathe, C., Archier, P., Vieillescazes, C. (2003). A lupane triterpene from frankincense (*Boswellia* sp., Burseraceae). *Phytochemistry.* 62: 537-541.
13. Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., Mauriello, G. (2006). Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *J Agr Food Chem.* 54: 2745-2749.
14. Fernández, B.M.N. (1999). Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje, en la zona semiárida de Coxcatlán, Puebla. UNAM. México D.F.
15. Harbone, J. B. (1988). Introduction to ecological biochemistry. Editorial Academia Press. USA. 354 pp.
16. Hashemi, M. Mohammad Hashemi, Ehsani, a., Jazani N.H., Aliakbarlu, J., Mahmoudi R. (2013). Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of essential oil and methanol extract of *Echinophora platyloba* D.C against some of food-borne pathogenic bacteria. *Vet Res Forum.* 4: 123 - 127.
17. Hernández-Hernández, J.D., Román-Marín, L.U., Cerda-García-Rojas, C.M., Joseph-Nathan, P. (2005). Verticillane derivatives from *Bursera suntui* and *Bursera kerberi*. *J Nat Prod.* 68: 1598-1602.
18. Hoet, S., Stévigny, C., Hérent, M. F., Quetin-Leclercq, J. (2006). Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Med.* 72: 480-482.
19. Inouye, S., Watanabe, Y., Nishiyama, Y., Takeo, K., Akao M., Yamaguchi, H. (1998). Antisporulating and respiration-inhibitory effects of essential oils on filamentous fungi. *Mycoses.* 41: 403-410.
20. Jolad, S.D., Wiedhopf, R.M., Cole, J.R. (1977). Cytotoxic agents from *Bursera moreletensis* (Burseraceae): deoxydopodophyllotoxin and a lignan, 5'-desmethoxydeoxydopodophyllotoxin. *J Pharm Sci.* 66: 892-893.
21. Jutiviboonsuk, A., Zhang, H., Tan, T.G., Ma, C., Van Hung, N., Manh Coung, N.M., Bunyapraphatsara, N., Soejarto, D.D., Fong, H.H.S. (2005). Bioactives constituents from roots of *Bursera tonkinensis*. *Phytochemistry.* 66: 2745-2751.
22. Kim, E.H., Kang, S.Y., Park, B.I., Kim Y.H., Lee, Y.R., Hoe, J.H., Choi, N.Y., Ra J.Y., An S.Y., You Y.O. (2016). *Chamaecyparis obtusa* suppresses virulence genes in *Streptococcus mutans*. *Evid Based Complement Alternat Med.* ID 2396404
23. Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Fakir, A. Ala, A., Yildirim, A. (2005). Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *J Agr Food Chem.* 53: 9452- 9458.
24. Kosalec, I., Pepeljnjak, S., Kustrak, D. (2005). Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). *Acta Pharm.* 55: 377-385.
25. Lennette, H.E., Balows, A., Hausler, J.W., Shadomy, H.J. (1987). Manual de Microbiología Clínica. Medica Panamericana. Buenos Aires.
26. Leyva M. A., Martínez J. R., Stashenko E. E. (2007). Composición química del aceite esencial de hojas y tallos de *Bursera graveolens* (Burseraceae) de Colombia. *Scientia et Technica.* XII: 201-202.
27. Magiatis P., Skaltsounis A. L., Chinou I, Haroutounian S. A. (2002). Chemical composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oils of three greek *Achillea* species. *Z Naturforsch.* 57: 287-290.
28. Manzano S. P., Miranda, M., Gutiérrez, Y., García, G., Orellana, T., Orellana, A. (2009). Antinflammatory effect and chemical composition of *Bursera graveolens* Triana & Planch. branch oil (palo santo) from Ecuador. *Rev Cubana Plant Med.* 14: 45-53.
29. Mohadjerani, M., Hosseinzadeh, R., Hosseini, M. (2016). Chemical composition and antibacterial properties of essential oil and fatty acids of different parts of *Ligularia persica* Boiss. *Avicenna J Phytomed.* 3: 357-65.
30. Parveen, M., Hasan, M. K., Takahashi, J., Murata, Y., Kitagawa, E., Kodama, O., Iwahashi, H. (2004). Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. *J Antimicrob Chemot.* 54: 46-55.

31. Peters, C.M., Purata, S.E., Chibnik, M., Brosi, B.J., López, A.M., Ambrosio, M. (2003). The life and times of *Bursera glabrifolia* (H.B.K.) Engl. In Mexico: a parable for Ethnobotany. *Econ Bot.* 57: 431-441.
32. Queiroga, CL., Duarte, M.C., Ribeiro, B.B., de Magalhaes, P.M. (2007). Linalool production from the leaves of *Bursera aloexylon* and its antimicrobial activity. *Fitoterapia.* 78: 327-328.
33. Ricci, D., Fraternali, D., Giamperi, L., Bucchini, A., Epifanio, F., Burini, G. Y Curini, M. (2005). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium Marum* (Lamiaceae). *Phytochemistry.* 98: 195-200.
34. Rzedowski, J. (1978). *Vegetación de México*. Ed. Limusa. México.
35. Rzedowski, J. (1986). *Vegetación de México*. Editorial Limusa. México.
36. Rzedowski J., Ortiz E. (1988). Estudios Quimiotaxonómicos de *Bursera* (Burseraceae). II. Una especie nueva de origen híbrido de la Barranca de Tolango, estado de Hidalgo, *Acta Bot Mex.* 001: 11-19.
37. Rzedowski, J., Guevara-Féfer, F. (1992). Familia Burseraceae. Fasc. 3, Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Instituto de Ecología A.C., Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, México.
38. Santana-Rios, G., Orner, G. A., Amantana, A., Provost, C., Wu, S.Y., Dashwood, R. H. (2001). Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the *Salmonella assay*. *Mutat Res-Gen Tox En.* 495: 61-74.
39. Sosa, S., Balick, M.J., Arvigo, R., Esposito, R.G., Pizza, C., Altinier, G., Tubaro, A. (2002). Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. *J Ethnopharmacol* 81: 211-215.
40. Syamasundar, K.V., Mallavarapu, G.R. (1995). Two triterpenoid lactones from the resin of *Bursera delpechiana*. *Phytochemistry.* 40: 337-339.
41. Tangarife C.V., Correa R.J., Zapata L.B., Durán C., Stanshenko E. y Mesa A.C. (2011). Anti-*Candida albicans* activity, cytotoxicity an interaction with antifungal drugs of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plants. *Infectio.* 15: 160-167.
43. Turina, A. V., Nolan, M. V., Zygodlo, J. A., Perillo, M. A. (2006). Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophys Chem.* 122: 101-113.
44. Ultee, A., Bennik, M. H., Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microb.* 68: 1561-1568.
45. Ultee, A., Kets, E. P., Alberda, M., Hoekstra, F. A., Smid, E. J. (2000). Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch Microbiol.* 174: 233-238.
46. Vanden Berghe D, Vlietinck AJ. 1991. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Dey P, Harborne JB, Hostettman K, eds. *Methods in Plant Biochemistry Assays for Bioactivity.* 6. San Diego, AcademicPress, pp. 47-69.
47. Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Pérez, L., López-Villafranco, E., Estrada, M.E., Aguilar, A., Reyes-Chilpa, R. (2005). Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. *J Ethnopharmacol.* 97: 293-299.
48. Ye, X.Y., Wang, H.X., Ng, T.B. (1999). First chromatographic isolation of an antifungal thaumantoin-like protein from French bean legumes and demonstration of its antifungal activity. *Biochem Bioph Res Co.* 263: 130-134
49. Zúñiga, B., Guevara-Fefer, P., Herrera, J., Contreras, J.L., Velasco, L., Pérez, F.J., Esquivel, B. (2005). Chemical composition and anti-inflammatory activity of the volatile fractions from the Bark of eight Mexican *Bursera* species. *Panta Med.* 71: 825-828.