



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“Perfil fitoquímico y evaluación del efecto cicatrizante de
Eupatorium aschenbornianum”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

VANIA LIZANDRE CASTAÑÓN VARGAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. JESÚS SANDOVAL RAMÍREZ

CODIRECTOR DE TESIS: DRA. SOCORRO REYES MEZA

ASESOR TÉCNICO: M.C. ALAN CARRASCO CARBALLO

Noviembre, 2020

Partes del tema de tesis se presentaron en los siguientes eventos:

54° Congreso Mexicano de Química. Centro Cultural Universitario de la BUAP, Puebla del 30 de septiembre al 3 de octubre de 2019, modalidad cartel: “Análisis fitoquímico cualitativo del Axihuitl proveniente del estado de Morelos”. **Vania Lizandre Castañón Vargas**, Alan Carrasco Carballo, Socorro Reyes Meza, Jesús Sandoval Ramírez.

1er Workshop de Investigación del Jardín Botánico Universitario y el Laboratorio de Elucidación y Síntesis Orgánica. Jardín Botánico Universitario BUAP, Puebla el 10 de diciembre de 2019, modalidad ponencia: “El axihuitl como cicatrizante”. **Vania Lizandre Castañón Vargas**.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	8
1. Introducción.....	9
2. Antecedentes.....	12
2.1. <i>Eupatorium Aschenbornianum</i>	13
2.2. Metabolitos secundarios de plantas.....	17
2.3. Cicatrización	26
3. Objetivos.....	31
3.1. Objetivo general	31
3.2. Objetivos particulares.....	31
4. Resultados y discusión	32
4.1. Pruebas fitoquímicas preliminares	32
4.2. Extracción Soxhlet	36
4.3. Pruebas fitoquímicas a los extractos	36
4.4. Prueba piloto <i>in vivo</i>	38
5. Conclusiones.....	46
6. Metodología	47
6.1. Preparación de material vegetal.....	47
6.2. Pruebas fitoquímicas preliminares	47
6.3. Extracción Soxhlet	48
6.4. Pruebas fitoquímicas a los extractos	48
6.5. Selección de disolventes para extracción	48
6.6. Prueba de estabilidad	49
6.7. Análisis microscópico.....	49
6.8. Prueba piloto <i>in vivo</i>	49
7. Anexos	50
8. Bibliografía	56

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Diversidad de grupos de organismos en México y en el mundo	9
Ilustración 2. A: Axihuitl, B: Solución etanólica utilizada tradicionalmente en heridas	11
Ilustración 3. A: Plantas medicinales. B: Medicamentos comerciales	12
Ilustración 4. Tableta sumeria con conocimientos medicinales de Nippur	12
Ilustración 5. A: Agave salmiana . B:Grindelia inuloides Willd.....	13
Ilustración 6. Muestra de axihuitl.....	14
Ilustración 7.Gráficos del efecto anti-úlceras de diferentes dosis de enecanescina (1) y carbenoxolona (2)	15
Ilustración 8.Molécula de dioscina (3) y α -hederina (4)	18
Ilustración 9. Molécula de codeína (5) y de morfina (6).....	19
Ilustración 10. Ácido boswélico (7) y terpinen-4-ol (8)	20
Ilustración 11. Molécula de β -sitosterol (9).....	21
Ilustración 12. Molécula de quercetina (10) y de apigenina (11)	22
Ilustración 13. Molécula de malvidina (12)	23
Ilustración 14. ácido glucónico γ -lactona (13).....	24
Ilustración 15.Molécula de ammoresinol (14) y umbeliferona (15)	25
Ilustración 16.Molécula de thieleanina (16).....	25
Ilustración 17. Estructura general de la piel.....	27
Ilustración 18. Células sanguíneas.....	28
Ilustración 19. Etapas de la cicatrización.....	29
Ilustración 20. Esquema general de la cicatrización.....	30
Ilustración 21. Diagrama general de bloque de etapas metodológicas.....	32
Ilustración 22. Resultados de las pruebas fitoquímicas para; A: alcaloides, B: saponinas. y C: esteroides y terpenos.....	34
Ilustración 23. Resultados de las pruebas fitoquímicas para; D: azúcares, E: insaturaciones y F: grupo carbonilo.	34
Ilustración 24. Resultados de pruebas fitoquímicas para: G: cumarinas, H: lactonas e I: sesquiterpenlactonas	35

Ilustración 25. Resultados de pruebas fitoquímicas para: J: hidroxilos fenólicos, K: Flavonoides y L: Antocianinas	36
Ilustración 26. Gráfico del progreso de la cicatrización por etanol (control y tratamiento)	41
Ilustración 27. Gráfico del progreso de la cicatrización con acetato de etilo (control y tratamiento)	42
Ilustración 28. Evolución de la herida de ambos extractos (Gráfico normalizado)	44
Ilustración 29. Evolución de la cicatrización en ambos tratamientos (Gráfico normalizado)	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales usos terapéuticos de los productos naturistas.	10
Tabla 2.CMI de Eupatorium aschenborniamun contra diferentes microorganismos.....	16
Tabla 3. Metabolitos secundarios estudiados en este proyecto	17
Tabla 4. Pruebas fitoquímicas preliminares en Eupatorium aschenbornianum.....	33
Tabla 5 Contenido de producto por extracción Soxhlet	36
Tabla 6. Pruebas de los extractos de éter etílico, acetato de etilo, etanol y agua	37
Tabla 7. Fotografías de la evolución de las heridas en ambos tratamientos y controles.	39
Tabla 8.Datos normalizados de la evolución de la herida en ambos tratamientos.	43

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
CMI	Concentración mínima inhibitoria
STL	Sesquiterpenlactonas
IC	Concentración inhibitoria
PFP	Pruebas fitoquímicas preliminares
PC	Porcentaje de cicatrización

Resumen

Las plantas vasculares representan la segunda categoría con mayor diversidad en México con 25,008 de 272,655 especies conocidas en el mundo hasta el 2012, esta diversidad permite tener plantas con una amplia variedad de aplicaciones, incluyendo plantas medicinales. Se han hecho esfuerzos para reunir el acervo de conocimientos en esta materia, como la creación de un herbario IMSS, sin embargo, de las 3,000 a 4,500 especies albergadas ahí, únicamente se han hecho análisis farmacológicos de un 5% de especies, por lo que las propiedades farmacológicas quedan únicamente en el conocimiento popular de la población sin hacerse estudios científicos apropiados.

Eupatorium aschenbornianum es una especie endémica del estado de Morelos, a la que se le han atribuido propiedades medicinales para tratamiento de quemaduras, reumas, mejora de la circulación, regulación de los niveles de glucosa, artritis y siendo uno de los más populares, el tratamiento de heridas tóxicas. Ha sido reportado en la literatura como agente gastroprotector, antifúngico y no tóxico en modelos biológicos, sin embargo, hasta ahora no se ha reportado como cicatrizante, por lo que este proyecto busca determinar el perfil fitoquímico de *Eupatorium aschenbornianum*, así como evaluar su actividad cicatrizante *in vivo*.

Se realizaron pruebas fitoquímicas preliminares directamente en las hojas secas para determinar los metabolitos secundarios y grupos químicos presentes, estos fueron; alcaloides, saponinas, esteroides, hidroxilos fenólicos, antocianinas, flavonoides, azúcares y estructuras como insaturaciones y grupo carbonilo. Los terpenos, cumarinas, lactonas y sesquiterpenlactonas se encontraron ausentes.

La masa del extracto bajo el empleo del extractor Soxhlet y etanol como disolvente fue de 21%, con el de acetato de etilo 1.2% y con el de éter etílico de 11.3%. Posteriormente a la extracción con distintos disolventes se realizaron pruebas fitoquímicas a cada uno de los extractos: en la extracción acuosa se encontraron presentes alcaloides, saponinas e hidroxilos fenólicos, en la extracción con etanol se encontraron alcaloides, hidroxilos fenólicos, compuestos insaturados; en la de acetato de etilo se hallaron esteroides, azúcares, antocianinas, flavonoides e insaturaciones. Finalmente, en la extracto de éter etílico se ubicaron a esteroides, azúcares, antocianinas y flavonoides. Compuestos carbonílicos no fueron detectados en ningún extracto.

Las pruebas *in vivo* se realizaron empleando a los extractos etanólicos y de acetato de etilo, en cuatro modelos biológicos; dos de estos se trataron con extractos de etanol, los restantes con acetato de etilo (control y tratamiento para cada uno), los controles se realizaron con los vehículos (etanol y acetato de etilo). En distintas fases de la cicatrización se observó una mayor recuperación en los tratamientos a comparación de los controles.

Comparando ambos tratamientos, el extracto de acetato de etilo muestra una mayor efectividad en los días aproximados a la fase inflamatoria y proliferativa, mientras que el mayor efecto del extracto etanólico se presenta en días aproximados a la fase proliferativa y de remodelación, por lo que, en conjunto, los metabolitos contenidos en ambas extracciones actuarían en el proceso completo de cicatrización.

1. Introducción

México es un país biológicamente megadiverso, esto quiere decir que en el territorio habitan miles de grupos taxonómicos que poseen alta variabilidad genética. De hecho, ocupa uno de los primeros lugares en el mundo en esta categoría. A pesar de que su superficie consta del 1.5% de la superficie total del planeta, cuenta con el 10-12% de las especies totales existentes. Las plantas vasculares representan la segunda categoría con mayor diversidad en el país, con 25,008 de 272,655 especies conocidas en el mundo hasta el 2012 (Ilustración 1)[1]

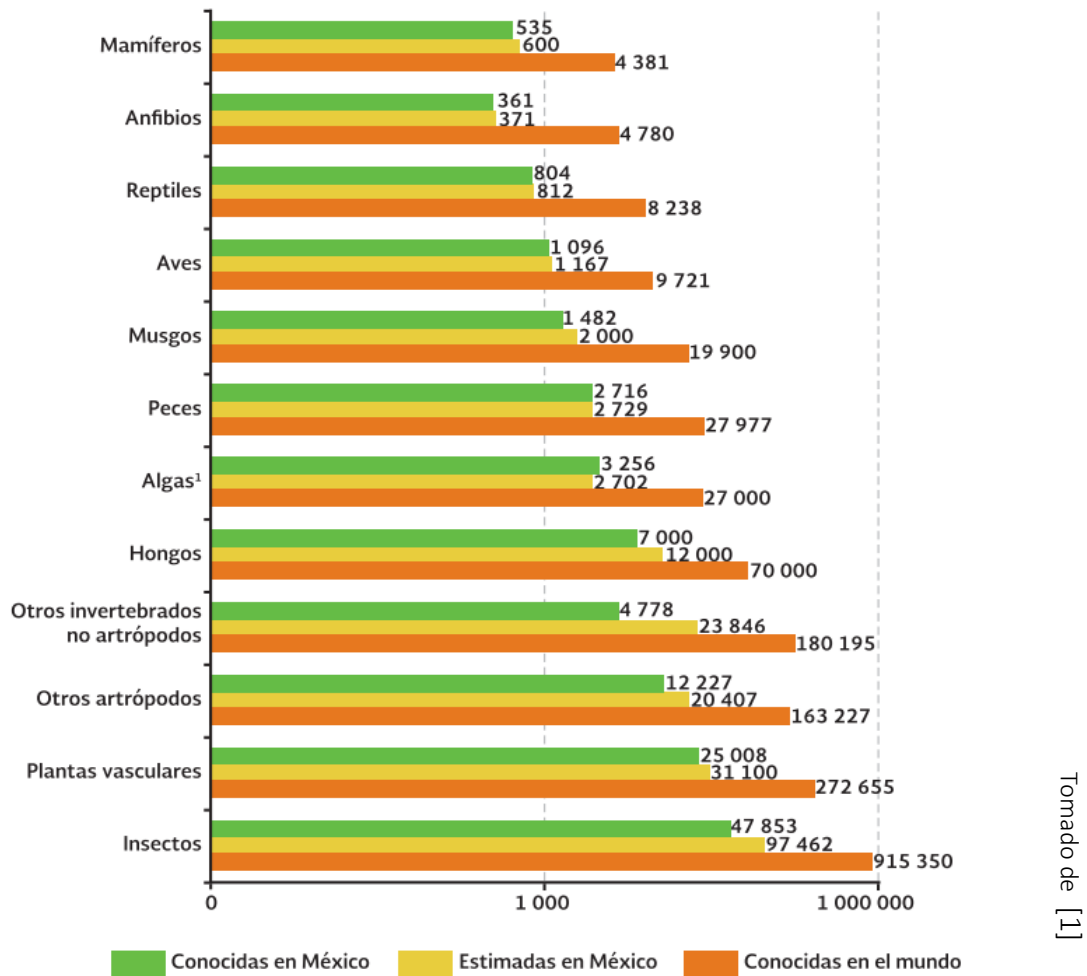


Ilustración 1. Diversidad de grupos de organismos en México y en el mundo

La diversidad vegetal que posee el país permite tener plantas con una amplia variedad de aplicaciones, dentro de la alimentación, la medicina, el vestido, la perfumería, los venenos, y otras. Las plantas medicinales en México ocupan el segundo lugar de plantas inventariadas, después de China. Sin embargo, a pesar de que se han hecho esfuerzos para reunir el acervo de conocimientos en esta materia, como la creación de un herbario IMSS, de las 3,000 a 4,500 especies albergadas ahí, únicamente se han hecho análisis farmacológicos de un 5% de especies [2]. Esto es evidencia de la relativa poca importancia antropológica que se le ha dado a la investigación de plantas con

atribuciones medicinales, que nos permitiría obtener conocimiento que avale o evite el uso de estas especies, así como posibles efectos secundarios y nuevas moléculas factibles para el desarrollo de fármacos. Las plantas medicinales tienen diversos usos tradicionales en nuestro país, únicamente en la Ciudad de México y de 1993-1996 se encontraron los mostrados en la Tabla 1.

<i>Usos</i>	<i>1993 (%)</i>	<i>1994 (%)</i>	<i>1996 (%)</i>
Complemento Alimenticio	9	24	19
Obesidad	16	19	15
Enfermedades del Sistema Nervioso	12	15	12
Tratamiento de las Vías Respiratorias	6	12	11
Gastrointestinales	9	5	11
Circulatorias	–	–	6
Piel y Cuero Cabelludo	–	–	5
Dolor	–	–	4
Diabetes	12	6	3
Hepáticas	5	3	3
Renales	5	2	3
Reumáticas	–	–	2
Otras	26	14	6

Tomado de [74]

Tabla 1. Principales usos terapéuticos de los productos naturistas.

Las heridas representan una afección de salud frecuente en el país, en el periodo 2016-2018 Vela-Anaya et al. evaluaron la incidencia de heridas en 15 entidades federativas; las heridas traumáticas representaron el primer puesto, abarcando el 27.5% de heridas totales [3]. Este estudio hace referencia únicamente a los pacientes que acuden a centros médicos, por lo que los datos de incidencia de las personas que tratan sus heridas en casa o complementan su tratamiento con terapias alternativas basadas en plantas es desconocida. Sin embargo se estima que un 80% de mexicanos hace uso frecuente de la herbolaria [2] para tratar afecciones médicas, por lo que no podemos descartar el autotratamiento de heridas con herbolaria.

Destacando que dependiendo de la región es la planta medicinal que se utiliza, por ejemplo, *Eupatorium aschenbornianum* es una especie endémica del Estado de Morelos, a la que se le han atribuido propiedades medicinales para tratamiento de quemaduras, reumas, mejora de la circulación, regulación de los niveles de glucosa y artritis, siendo uno de los más populares el tratamiento de heridas tópicas, generalmente suministrado en forma de emplastos o soluciones acuosas o en alcohol etílico (Ilustración 2B) [4].



Ilustración 2. A: Axihuitl, B: Solución etanólica utilizada tradicionalmente en heridas

No existe abundante información acerca de esta especie, sin embargo, hay reportes científicos que avalan la efectividad de *E. aschenbornianum* para tratar úlceras gástricas. También se conocen sus propiedades antifúngicas e incluso su ausencia de toxicidad y su incapacidad de causar mortalidad si se administra de manera directa; sin embargo, no está reportado en la literatura su capacidad cicatrizante, empleada por pobladores del Estado de Morelos, por lo que el presente proyecto representa un precedente en la investigación de *Eupatorium aschenbornianum* como planta cicatrizante, proporcionando información acerca de su composición fitoquímica

2. Antecedentes

Una planta medicinal es definida como cualquier especie (Ilustración 3A) que muestre actividad fitoterapéutica debida a metabolitos contenidos en su matriz [5], estos pueden encontrarse en un órgano en específico o en todas sus estructuras y su concentración varía de acuerdo a la edad del organismo, clima, época del año y las condiciones del suelo [6], por lo tanto una fitoterapia correctamente aplicada requiere que la planta pase por estándares que le permitan tener una concentración deseada de metabolitos de interés, de otra forma los resultados pueden no ser efectivos, estos metabolitos de diversas especies vegetales han servido de base para el diseño de medicamentos farmacéuticos, que para considerarse como tal, se requiere la extracción, aislamiento e identificación del principio activo (Ilustración 3B) [7].



Ilustración 3. A: Plantas medicinales. B: Medicamentos comerciales

El origen de la fitoterapia se remonta a épocas prehistóricas cuando se comenzó a discernir entre las plantas que tenían efectos nocivos y las que curaban padecimientos de la población, uno de los registros más antiguos del uso de plantas medicinales es una tableta sumeria de 3000 años a.e.c. (Ilustración 4), que contenía información acerca de fuentes de plantas medicinales [5]. Hoy en día, de acuerdo con la OMS, un 80% de la población mundial utiliza plantas medicinales como complemento o como único tratamiento en afecciones de salud [6].

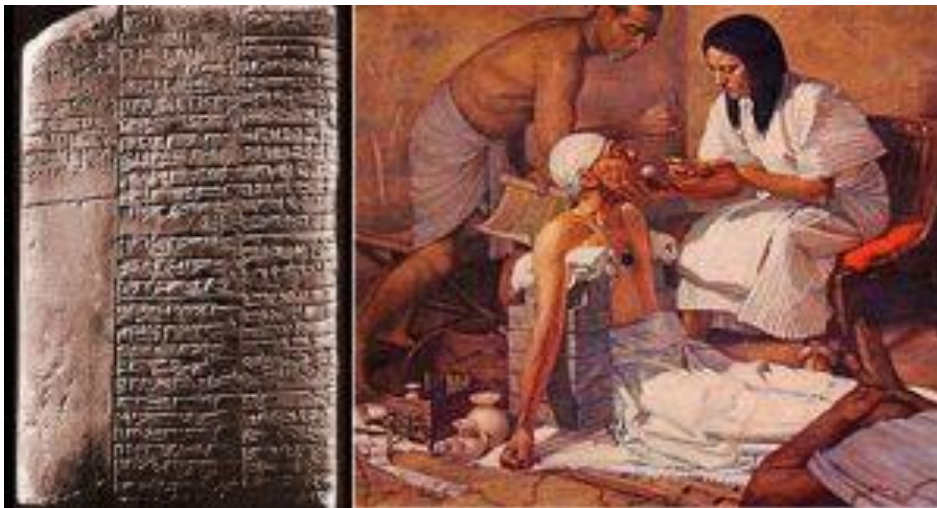


Ilustración 4. Tableta sumeria con conocimientos medicinales de Nippur

Existe una gran variedad de plantas que son utilizadas popularmente para el tratamiento de distintas afecciones: por ejemplo, la manzanilla (*Matricaria recutita* L.) es popularmente utilizada para tratar afecciones como el dolor de estómago, además de tener propiedades relajantes, sedantes, antiespasmódicas, cicatrizantes, antiinflamatorias y digestivas [8]. Otro ejemplo, son las pencas del maguey (*Agave salmiana*) (Ilustración 5A) y el árnica (*Grindelia inuloides* Willd) (Ilustración 5B) que son utilizadas para el tratamiento de heridas y golpes [9][10].



Ilustración 5. A: *Agave salmiana* . B: *Grindelia inuloides* Willd.

Un tópico importante y sobre el cual hay diversos estudios, son las plantas medicinales utilizadas en la cicatrización. Ejemplos de estas son:

- *Jasminum auriculatum*: los extractos etanólicos de sus hojas tienen un efecto positivo en la cicatrización de heridas debido a la mayor producción de colágeno. De acuerdo al análisis fitoquímico de la especie, esta contiene alcaloides, terpenoides, saponinas, taninos y compuestos fenólicos [11].
- *Plumeria obtusa*: Su análisis fitoquímico revela la presencia de taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas, glicósidos, terpenoides y esteroides, mientras que los extractos etanólicos de sus hojas muestran un efecto positivo en la cicatrización de heridas en modelos biológicos [12].
- *Pongamia Pinnata*: Los extractos metanólicos de las hojas de este especie favorecen la contracción de la herida y la fuerza de tensión, además de tener un efecto antioxidante y una actividad antimicrobiana moderada [13].

Las plantas anteriores poseen precedente científico de su eficacia como cicatrizantes, sin embargo, en nuestro país debido a la amplia biodiversidad, existen muchas otras plantas con usos tradicionales que aún no han sido probadas científicamente, un claro ejemplo es *Eupatorium aschenbornianum*, perteneciente a la familia asteraceae.

2.1. *Eupatorium Aschenbornianum*

Esta especie pertenece a la familia asteraceae o compositae, que a su vez se encuentra dentro del orden Asterales, que cuenta con aproximadamente 1620 géneros [14], por lo que se considera una de las familias más grandes en el reino plantae. Una de las características distinguibles de la

familia es el agrupamiento de las flores en inflorescencias, que suelen parecer a gran escala una flor individual, estas son también llamadas “cabezas” y se encuentran rodeadas por hojas modificadas llamadas brácteas [14].

Hasta el 2018, México registra 26 tribus, 417 géneros y 3113 especies de las cuales 3050 son especies nativas y 1988 son endémicas del país, esta familia es considerada la más grande de la flora mexicana, por lo que es posible encontrarla a lo largo de todo el territorio; desde en la vegetación costera hasta en los picos nevados de altas montañas. Diversos autores han propuesto que esta extensión geográfica es debido a una excelente capacidad de dispersión del vilano o debido a la plasticidad genética de la familia, que estaría permitiendo la síntesis de diversos tipos de metabolitos secundarios que le permitirían hacerle frente a diferentes depredadores [15].



Ilustración 6. Muestra de axihuitl

El axihuitl (Ilustración 6) (del náhuatl “atl” -agua y “xihuitl” -hierba) es una planta originaria del estado de Morelos, México, recibe otros nombres comunes como “achiwis”, “yerba del agua” y “hoja del agua”. Es una herbácea de hojas opuestas con borde acerrado, peciolo de 5 a 10 cm de largo, posee tallos semileñosos color café amarillento. Sus periodo de floracion está comprendido entre noviembre a febrero, son blancas y rojizas, organizadas en forma de corimbo.

No hay un registro histórico preciso sobre el comienzo de sus usos etnobotánicos, sin embargo, hay reportes en fuentes bibliográficas del siglo XVI; principalmente es utilizada en la medicina herbolaria tradicional para tratar inflamaciones, colitis, heridas y úlceras gástricas, pero existen pocos reportes científicos que confirmen dichas propiedades [4]. Por ejemplo, ha sido reportado como agente gastroprotector [16], teniendo mejor actividad los extractos de hexano derivados de la planta; dicho ensayo constó de la administración de extractos hexánicos, diclorometánicos y metanólicos en ratas hembras Wistar, así como un gastroprotector de referencia (carbenoxolona, 2).

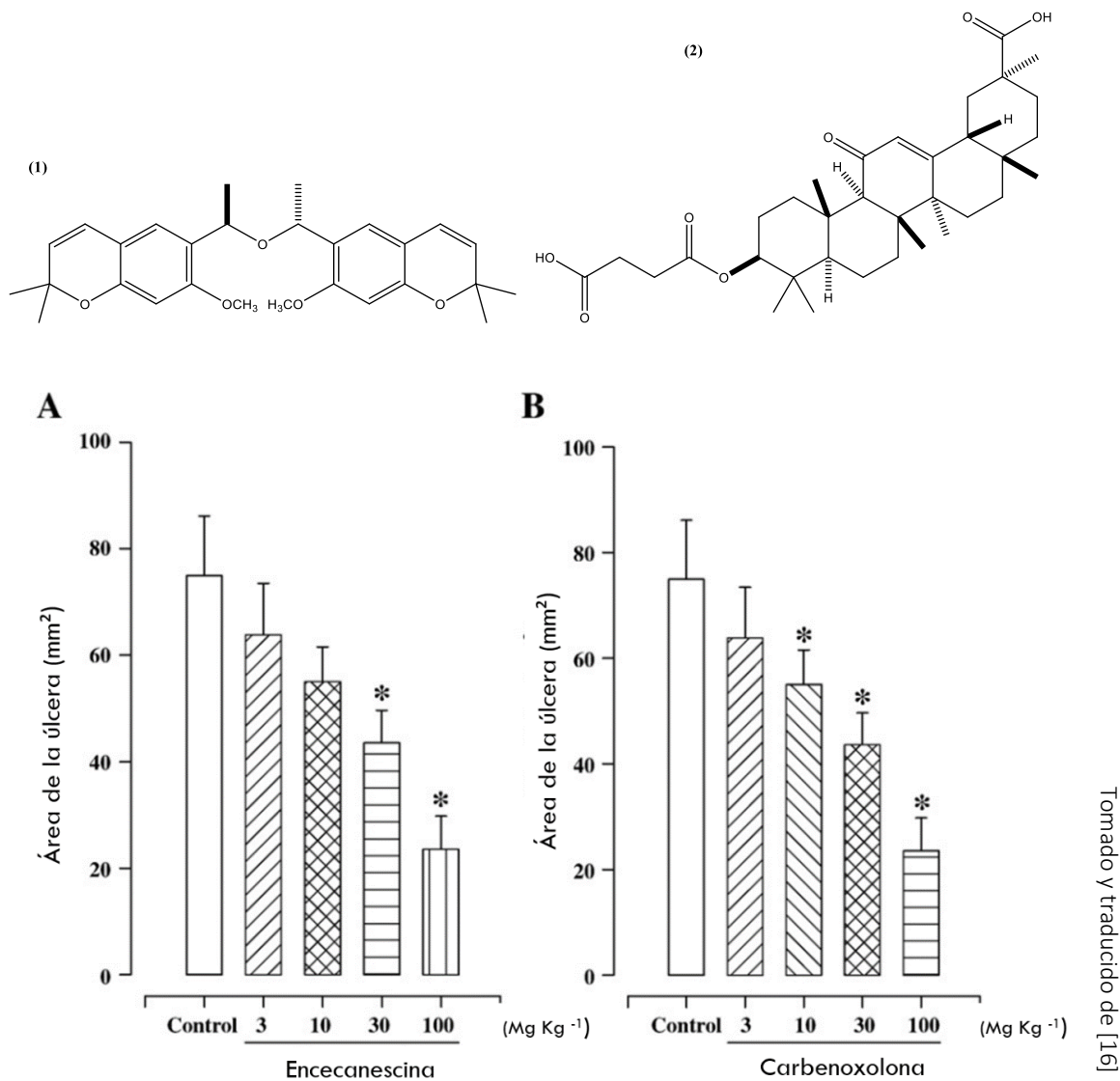


Ilustración 7. Gráficos del efecto anti-úlceras de diferentes dosis de enecanescina (1) y carbenoxolona (2)

En el estudio antes mencionado, con la finalidad de encontrar el ingrediente activo se llevó a cabo la purificación del extracto encontrando como metabolito principal a la enecanescina (1), un integrante del grupo de los cromenos, esta es comparada con un medicamento gastroprotector

(Ilustración 7). Además, se encontró β -sitosterol y estigmasterol, por lo que se deduce la producción de un efecto sinérgico.

Por otro lado, los extractos hexánicos de *E. aschenbornianum* han sido probados como antifúngicos, resultando efectivos contra *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans* [17], en este ensayo se pusieron en contacto directo los extractos de la planta con los hongos, para después medir la concentración mínima inhibitoria (CMI) (ver Tabla 2).

Microorganismo	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>
CMI antifúngica (mg/ml) del extracto hexánico	8.0	4.0	0.03	0.2
CMI anifúngica (mg/ml) del extracto metanólico	8.0	>8.0	1.0	0.5

Tomado y traducido de [17]

Tabla 2. CMI de *Eupatorium aschenbornianum* contra diferentes microorganismos.

El axihuitl también ha sido probado en toxicidad, demostrando no causar mortalidad, en los modelos biológicos empleados en este estudio. Las consecuencias del suministro de axihuitl en los animales fueron ligeros cambios en el metabolismo, denotados por el aumento de fosfatasa alcalina en sangre [18].

Por otra parte, se ha estudiado el efecto que produce la aplicación de plantas emparentadas a *E. aschenbornianum* a nivel genético; *Chromolaena odorata*, una planta perteneciente a la misma tribu que *E. aschenbornianum* (Eupatorieae) induce la expresión de genes como hemo oxigenasa-1 (enzima citoprotectora [19]), donde fue incrementado a nivel transcripcional y traduccional [20].

Las hojas de *Eupatorium adenophorum*, aplicadas a una inducción de hipersensibilidad mostraron la inhibición de la expresión de genes IL-1 β y COX2, que codifican para moléculas pro-inflamatorias, además de inducir una mayor expresión de TNF- α y TGF- β . Resulta contradictoria la estimulación de la expresión de esto dos últimos genes ya que dan lugar a factores pro-inflamatorios, sin embargo, el efecto cicatrizante podría ser explicado ya que la citoquina codificada a partir de TNF- α tiene una importante participación en la reconstrucción de la matriz extracelular después de la fase inflamatoria, además de promover la angiogénesis, mientras que TGF- β dará lugar al factor de crecimiento que está involucrado en la producción de colágeno y la reorganización de la matriz extracelular [21].

Las propiedades que expresan algunas plantas en animales son debidas a metabolitos secundarios, metabolizados con fines de supervivencia, por lo que a continuación se abordará el tema con más detalle.

2.2. Metabolitos secundarios de plantas

De manera general, el término metabolito se refiere a moléculas de bajo peso molecular y se excluyen proteínas, polinucleótidos, polisacáridos y lípidos [22]. Los metabolitos son comúnmente clasificados en metabolitos primarios y secundarios; los metabolitos primarios son aquellos que permiten al organismo llevar a cabo funciones celulares esenciales, tales como nutrición y reproducción [23], por otra parte, los metabolitos secundarios (MS) son compuestos formados por el metabolismo, pero que no se usan para formar nuevas células, además tienen papeles importantes en funciones como atracción de polinizadores, para establecer simbiosis, defensa contra otros organismos, y para proveer componentes estructurales de las paredes lignificadas de los tejidos vasculares, entre otros, debido a esto, los MS se consideran no esenciales, pero contribuyen en la supervivencia de las especies vegetales. Al contrario de los metabolitos primarios, estos se encuentran en menores concentraciones y algunos suelen ser inducidos en situaciones de estrés siendo los más conocidos los que se pueden observar en la Tabla 3 [24].

<i>Tipo</i>	<i>Metabolito</i>
<i>Compuestos conteniendo átomo(s) de nitrógeno</i>	Alcaloides
<i>Derivados de la acetil coenzima A</i>	Saponinas
	Esteroides y terpenos
<i>Fenólicos</i>	Sesquiterpenlactonas
	Cumarinas
	Hidroxilos fenólicos
	Antocianinas
	Lactonas
	Flavonoides

Tabla 3. Metabolitos secundarios estudiados en este proyecto

2.2.1. Saponinas

El término "saponina" viene del latín *sapon* que significa "jabón". Estas moléculas están compuestas por una aglicona policíclica (también llamada sapogenina) y un carbohidrato [25]. Poseen capacidad tensioactiva confiriéndoles una característica espumosa distintiva [26].

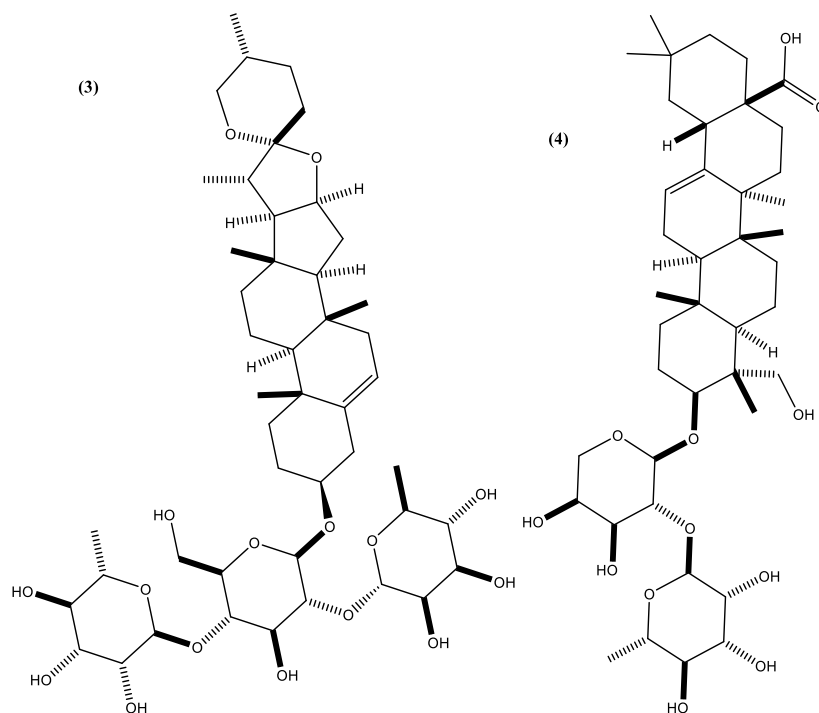


Ilustración 8. Molécula de dioscina (3) y α -hederina (4)

Podemos distinguir a las saponinas en dos tipos: las saponinas neutras son derivadas de esteroides (3, Ilustración 8) y presentan cadenas laterales espiroacetálicas, se encuentran casi exclusivamente presentes en las angiospermas monocotiledóneas. Por otra parte, las saponinas ácidas (4, Ilustración 8) tienen estructuras derivadas de triterpenoides y son el tipo más común de saponinas presentes en las angiospermas dicotiledóneas [26].

Las saponinas son metabolizadas por las plantas con fines de defensa contra microorganismos, sin embargo para el hombre y otras especies, algunas saponinas poseen las siguientes actividades [26] [25]:

- Efecto antiinflamatorio: Esto se atribuye a que las saponinas actúan como un inhibidor de las moléculas mediadoras de la inflamación, tales como histaminas, serotoninas y prostaglandinas. Además, las saponinas inhiben la formación de especies reactivas de oxígeno [26]. Un ejemplo de esto es la platicodina proveniente de la planta *Platycodon grandiflorum*. La platicodina ha sido estudiada como antiinflamatorio y con actividades anti alérgicas [27].
- Actividad antifúngica: Esta propiedad se asocia a la aglicona contenida en las moléculas de saponina además del número y estructura de las unidades de monosacáridos en sus

cadena glucosídica. Distintos tipos de saponinas triterpenoides de las semillas de *Chenopodium quinoa* Wild han sido reportadas como inhibidoras del crecimiento de cepas de *Candida albicans* cuando actúan en conjunto de manera sinérgica [26].

- Actividad antimicrobiana: Las moléculas de saponina de semillas de *Sorghum Bicolor* (L.) Moench inhiben el crecimiento de microorganismos gram-positivos y negativos, siendo menos efectivo en los gram - debido a que no pueden penetrar adecuadamente en sus membranas celulares [28].

2.2.2. Alcaloides

La definición elemental indica que los alcaloides contienen un nitrógeno [29] ocurriendo en forma de aminas secundarias, terciarias, cíclicas o lineales. Son de origen vegetal, microbiano, animal o fúngico [30] y presentan carácter básico; algunos alcaloides son derivados o intermediarios de los aminoácidos y actúan en diversos niveles celulares del organismo, así como en el sistema nervioso central (por lo que muchos de ellos son medicamentos o narcóticos); sin embargo, los alcaloides no pueden ser unidades estructurales de macromoléculas celulares, tales como vitaminas u hormonas [31].

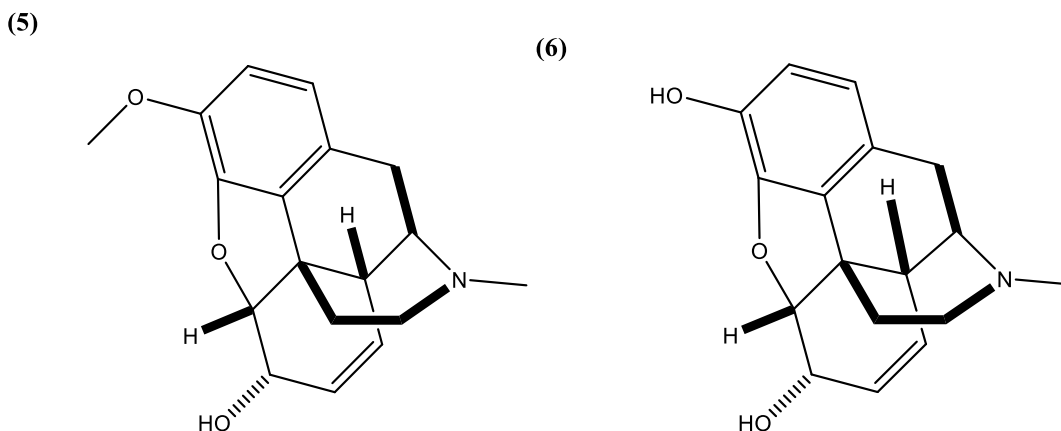


Ilustración 9. Molécula de codeína (5) y de morfina (6)

Debido a su diversidad, los alcaloides tienen una amplia variedad de funciones biológicas, siendo las de mayor interés en este proyecto las siguientes:

- Antimicrobiana: Existe una amplia variedad de alcaloides antimicrobianos, un ejemplo de estos son los encontrados en los extractos acuosos de *Pongamia pinnata*, efectivos contra bacterias como *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. luteus*, *E. coli* y *A. niger* [32].
- Analgésica: Algunos alcaloides como la codeína (5, Ilustración 9) y morfina (6, Ilustración 9) han sido ampliamente estudiados, estos provienen de plantas del género *Papaver* L [33].
- Vasoconstrictor: Un ejemplo de esto es la ergometrina [30], un alcaloide utilizado comúnmente en la prevención de la hemorragia postparto. Específicamente, su mecanismo de acción se basa en la estimulación de los receptores de serotonina α -

adrenérgicos y la inhibición de la producción del factor de relajación derivado del endotelio [34].

Esta diversidad de actividades biológicas debe al átomo de nitrógeno y a grupos funcionales como hidroxilo fenólico y restos de policíclicos que fungen como aceptores o donadores de protones, lo que les permite formar puentes de hidrógeno con diversas proteínas y/o receptores [30].

2.2.3. Terpenoides

El término terpeno viene de la palabra "trementina" que deriva del latín *balsamum terebinthinae*; que hace referencia a la resina del árbol del pino. Un terpeno es una estructura molecular formada por unidades isoprénicas [35]. Los terpenos son el grupo más grande de compuestos naturales con actividad biológica, este grupo incluye a los hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, sesterterpenos, triterpenos, tetraterpenos, politerpenos. En las plantas, algunos terpenos fungen como defensa contra depredadores, así como en contra del estrés abiótico y también para atraer insectos polinizadores.

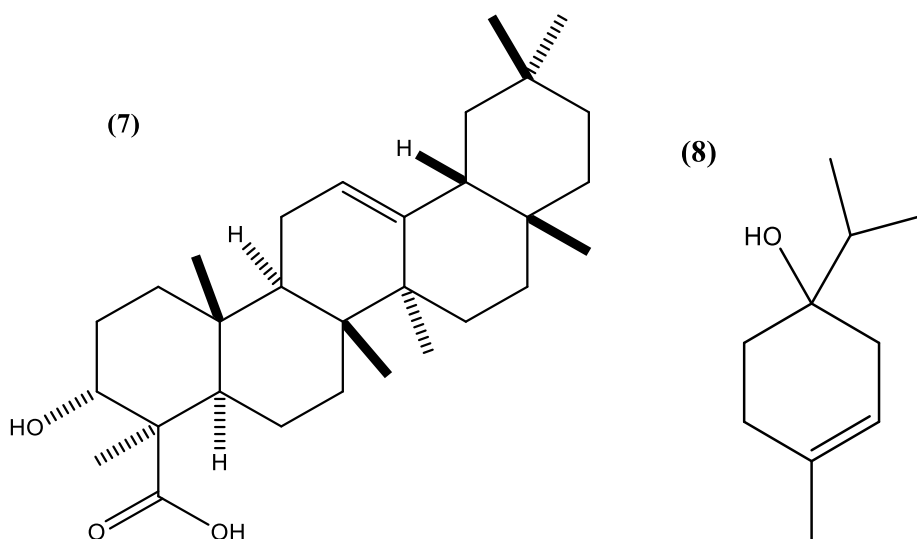


Ilustración 10. Ácido boswélico (7) y terpinen-4-ol (8)

Sus propiedades de interés antropocéntrico son:

- Antiinflamatoria: Un ejemplo de esta es el ácido boswélico (7, Ilustración 10), obtenido de géneros de *Boswellia* y utilizado para amortiguar la inflamación y controlar el dolor en la osteoartritis [36].

Antibacteriana: El aceite esencial de las semillas de *Nigella sativa* mostraron una actividad inhibitoria de IC₅₀ de 12.0 y 62.0 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* respectivamente. Los terpenos identificados en el aceite esencial son p-cimeno, γ-terpineno, timoquinona, β-pineno, carvacrol, terpinen-4-ol (8, Ilustración 10) y longifoleno[37].

2.2.4. Esteroides

Los esteroides son un grupo de moléculas derivadas del colesterol, son de carácter lipofílico y bajo peso molecular [38]. Podemos encontrarlos en plantas, animales y microorganismos [39]. Los esteroides sirven como componentes de las membranas celulares en la bicapa lipídica [40] y son divididos en dos categorías: fitoesteroles y brasinoesteroides [38]: los fitoesteroles, también llamados simplemente esteroides, son un grupo de alcohol esteroideo, mientras que los brasinoesteroides son un grupo pequeño de aproximadamente más de 70 integrantes y tienen un papel fundamental en el desarrollo de la planta, fungiendo como fitohormonas [40].

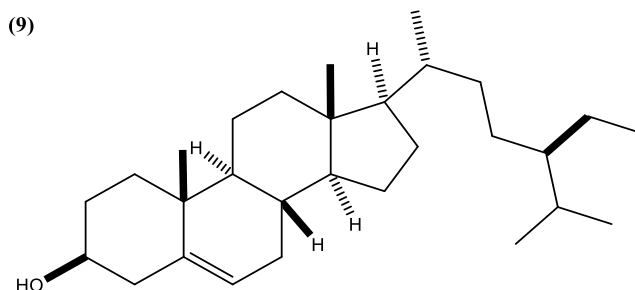


Ilustración 11. Molécula de β -sitosterol (9)

Los esteroides derivados de plantas han sido reportados como agentes antiinflamatorios y analgésicos [40]:

- El extracto de la hoja de *Trigonella foenum graecum* posee un antiinflamatorio probado en la inflamación producida por la formalina en las patas de ratas, el mecanismo de acción se basa en un glucósido esteroideo de esta planta que inhibe las quimiocinas producidas para la atracción de los linfocitos en el proceso inflamatorio [40].
- *Commiphora mukul* tiene propiedades antiinflamatorias en su fracción esterooidal [40].
- Los metabolitos de *Smilax officinalis* han sido comparados con medicinas antiinflamatorias como dexametasona e indimetacina, siendo más efectivos los componentes de saponina de la planta [40].
- *Withania somnifera* tiene propiedades antiinflamatorias en su fracción soluble en metanol [40].
- Los esteroides β -sitosterol (9, ilustración 11) y β -sitosteril- β -D-glucósido de las hojas de *Mentha cordifolia* tienen propiedades analgésicas [40].

2.2.5. Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios de bajo peso molecular [41] compuestos por anillos fenólicos hidroxilados. Los flavonoides son divididos comúnmente en flavonas, flavonoles, flavanonas y otros. Esta clasificación dependerá del nivel de oxidación y las sustituciones en los anillos estructurales [42].

En las plantas, fungen como agentes antioxidantes ayudando en la defensa contra microorganismos, estrés abiótico, como un componente importante en la coloración y son reguladores de los factores de crecimiento [42].

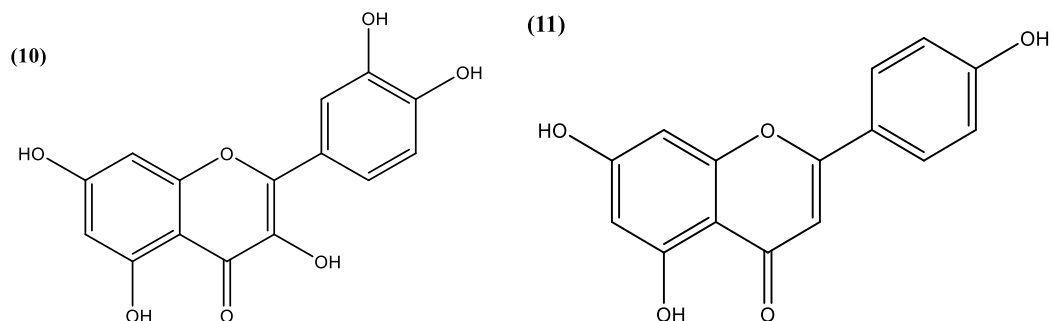


Ilustración 12. Molécula de quercetina (10) y de apigenina (11)

Los flavonoides tienen distintas propiedades importantes para distintas especies fuera del reino vegetal:

- **Antioxidantes:** Principal característica de estos metabolitos, esta actividad es posible debido a que son moléculas propensas a donar protones o átomos de hidrógeno [41]. Juegan un papel importante en la inhibición de enzimas productoras de especies reactivas de oxígeno, así como el arrastre directo de estas moléculas de oxígeno [42]. Un ejemplo de esto es la quercetina (10, Ilustración 12), una molécula que tiene capacidad antiinflamatoria de larga duración, además de ser regulador en la inflamación. Podemos encontrarla en una amplia cantidad de frutas como manzanas, bayas, uvas y tomates [43].
- **Antibacteriales:** Esta actividad se atribuye a su habilidad de inactivar adhesinas microbianas; los flavonoides lipofílicos tienen la capacidad de alterar las membranas microbianas, por ejemplo, las catequinas son alcaloides efectivos contra *Vibrio cholerae* y *Streptococcus mutans* y especies de *Shigella*. La especie *Chamomilla recutita* contiene flavonoides que funcionan efectivamente como bactericidas contra especies como *Cryptococcus neoformans*, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa* [42].
- **Antiinflamatorias:** Esta capacidad podría estar dada por la capacidad antioxidante de los flavonoides y su actividad inhibitoria de enzimas. Está comprobado que los flavonoides son inhibidores potentes de la producción de prostaglandinas. Algunos ejemplos de flavonoides antiinflamatorios son hesperidina, apigenina (11, Ilustración 12), luteolina y quercetina.
- **Antifúngicas:** Se sabe que esta actividad está dada mediante la formación de complejos con proteínas solubles, presentes en la pared fúngica de algunas especies. La baicaleína es un tipo de flavonoide presente en *Scutellaria baicalensis* que es efectiva contra *Candida albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* [41].

2.2.6. Antocianinas

Son moléculas miembros del grupo de los flavonoides, en las plantas tienen un papel importante para la polinización y dispersión de semillas, además de ser las responsables de pigmentos rojos, azules y morados en diversas especies vegetales [44]. Bajo un pH ácido, las antocianinas se presentan como pigmentos rojos, mientras que en pH alcalinos se muestran azules [45].

Las antocianinas pueden poseer carbohidratos (comúnmente glucosa), sin embargo, también pueden estar presentes sin estas moléculas (siendo agliconas), en este caso se nombran como antocianidinas [44].

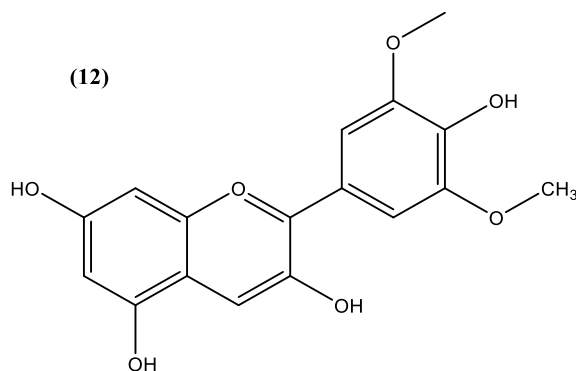


Ilustración 13. Molécula de malvidina (12)

Estas moléculas son mayormente conocidas por su capacidad antioxidante, sin embargo, tienen un amplio espectro de acción:

- **Antioxidantes:** Este efecto es dado por la estructura glicosilada del anillo B, que otorga el poder de hidroxilación y metoxilación. Las antocianidinas poseen una mayor capacidad de absorción de radicales de oxígeno debido a su mayor inestabilidad y, por tanto, mayor reactividad. Un ejemplo son las antocianinas pelargonidina-3-glucosido, cianidina-3-glucósido y delphinidina-3-glucósido provenientes de *Phaseolus vulgaris* L., tanto estas como su correspondiente aglicona han demostrado tener una fuerte actividad antioxidante [45].
- **Antimicrobianos:** Ha sido demostrado que las antocianinas de especies del género *Vaccinium* han sido efectivas contra *Helicobacter pylori*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*. El mecanismo de acción puede ser por inhibición de unión bacteriana a paredes celulares, actuando en sinergia potenciando antibióticos y destruyendo directamente a las bacterias [46] [47].
- **Antiinflamatorio:** Este efecto puede ser dado por la inhibición de la actividad de proteosomas, así como la inhibición de la activación del factor nuclear NF- κ B (controlador de la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria). El efecto antiinflamatorio podría también estar dado por las propiedades antioxidantes de las antocianinas [47]. Un ejemplo es la malvidina (12, Ilustración 13) encontrados en bayas como los arándanos [48].

2.2.7. Lactonas

Son ésteres cíclicos formados por una reacción de ácido carboxílico con un grupo hidroxilo o un átomo halógeno [49]. Dependiendo del tamaño de la molécula y la posición del grupo hidroxilo y ácido carboxílico, las lactonas se distinguirán y nombrarán como α , β , γ , δ [50]. La bioactividad en

mamíferos se da principalmente en forma de sesquiterpenlactonas. Sin embargo, algunas lactonas no sesquiterpénicas presentan actividad biológica en mamíferos como:

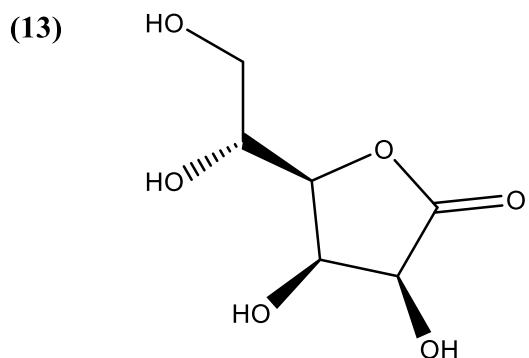


Ilustración 14. ácido glucónico γ -lactona (13)

- Cicatrizante: La aplicación de ácido glucónico γ -lactona (13, Ilustración 14) extraída de *Grewia tiliaefolia* en heridas de modelos biológicos causó una mejor epitelización, contracción de heridas, mayor resistencia a la tracción, más contenido de hidroxiprolina y mayor colágeno con respecto a los controles del ensayo.
- Antibacterial: la lactona sintética γ -etil- γ -lactona tiene actividad significativa contra *S. aureus* y *L. monocytogenes*, resultados similares se obtienen de derivados de β -ciclocitral [51].

2.2.8. Cumarinas

Son una clase de lactonas, constituidas por un anillo aromático fusionado a un anillo α -pirona. Estas moléculas se encuentran como metabolitos en plantas y en menor incidencia en bacterias, hongos y algunas especies de esponjas. Se sintetizan a partir de la fenilalanina por la vía del ácido shikímico [52]. Las cumarinas pueden ser subdivididas en simples, dímeros, furanocumarinas y piranocumarinas, todas sintetizadas por la misma vía [53].

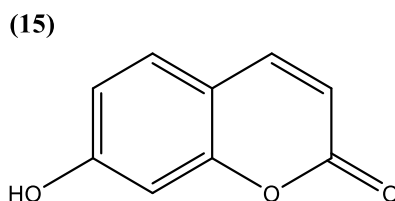
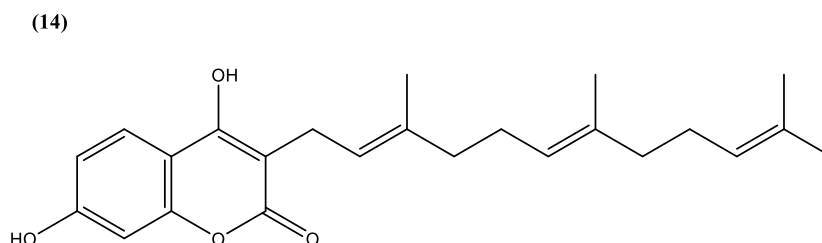


Ilustración 15. Molécula de ammosesinol (14) y umbeliferona (15)

En especies vegetales, su función es de defensa contra herbívoros y microorganismos [52], sin embargo, en mamíferos presenta las siguientes funciones:

- Antibacterial: La estructura de cumarina por si misma no tiene una alta actividad antibacteriana, sin embargo, cuando presenta sustituciones hidrocarbónicas de cadena larga, esta actividad mejora. Un ejemplo de esto es el ammosesinol (14, Ilustración 15) y ostrutina; cumarinas conocidas por su actividad contra bacterias Gram+. Antogenol es otra cumarina con actividad antimicrobiana, encontrada en especies como *Aegle marmelos* y con efectividad contra especies del género *Enterococcus* [54].
- Antifúngica: 6,7-dimetoxilcumarina tiene una efectividad del 100% de inhibición (250µg/mL) contra *Rhizoctonia solani* [53].
- Antiinflamatoria: La umbeliferona (15, Ilustración 15) encontrada en diversas especies del reino vegetal ha sido estudiada como antiinflamatoria [55].
- Anticoagulante: Las cumarinas poseen esta actividad debido a su antagonismo con la vitamina K, esta funge como cofactor en la carboxilación de residuos del glutamato a γ -carboxiglutamatos, mismos que son indispensables para el funcionamiento de algunos factores de coagulación [54]. La imperatorina es encontrada en familias como Rutaceae y Apiaceae y presenta función anticoagulante [53].
- Antioxidante: La fraxina es encontrada en *Weigela florida* var. *glabra* leaves y mostró la capacidad de arrastre de radicales libres en alta concentración (0.5 mM), además de protección celular en estrés oxidativo por H₂O₂ [54].

2.2.9. Sesquiterpenlactonas

Estas estructuras químicas lipofílicas y sin color [56], consisten en un esqueleto de 15 carbonos, teniendo como característica un anillo γ -lactona. En muchos casos poseen un grupo exo-metileno conjugado con el grupo carbonilo [57]. Las plantas producen sesquiterpenlactonas (STL) para defenderse de ataques de herbívoros, como fitoalexinas, hormonas, aleloquímicos y como protección contra los rayos UV [56].

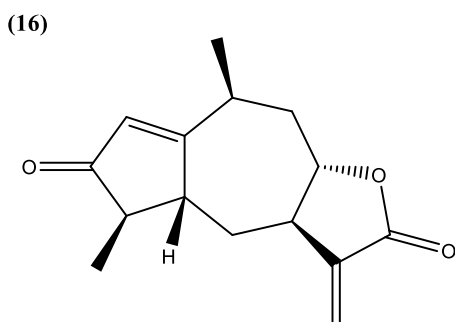


Ilustración 16. Molécula de thieleanina (16).

En los humanos tienen las siguientes funciones:

- Antiinflamatorio: La molécula costunólido es una STL encontrada en las raíces de *Saussurea lappa* con propiedades antiinflamatorias [57]. Las STL millerenólido y thieleanina (16, Ilustración 16) muestran un efecto antioxidante sobre macrófagos de ratón, provocando la disminución de NO y por lo tanto, disminuyendo el estrés oxidativo [58].
- Antimicrobiana: La dehidroleucodina presenta actividad antimicrobiana contra cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*. La dehidroleucodina se encuentra presente en *Artemisia douglasiana* [57].
- Antioxidante: La Helenalina es una STL proveniente de la especie *Arnica montana* con actividad antioxidante [57]

2.3. Cicatrización

Los metabolitos anteriormente mencionados tienen alguna relación con los eventos llevados a cabo en la cicatrización, comúnmente como antioxidantes y antiinflamatorios, por lo que con el objetivo de tener un panorama teórico integral es necesario abordar el mecanismo de cicatrización, comenzando por la piel, el lugar más común donde se lleva cabo.

La piel (Ilustración 17) tiene una importancia relevante en la salud de un individuo, es el órgano más grande del cuerpo humano, considerado responsable de un 15% del peso total en un cuerpo adulto [59]. Tiene como funciones evitar la penetración de los rayos UV provenientes del sol, evitar la evaporación del agua contenida en nuestro organismo y ser una barrera para patógenos [60].

En el ámbito dérmico, se considera una lesión cuando se rompe la continuidad física de la piel [61], el organismo responde cerrando la herida con mecanismos fisiológicos que involucran distintos tipos de células, incluyendo inmunitarias y estructurales.

El mecanismo global de cicatrización es un proceso conservado evolutivamente y compartido entre varias especies, incluye eventos como coagulación sanguínea, inflamación, proliferación y remodelación celular (

Ilustración 20) [60].

Es importante destacar que la cicatrización es influida por factores intrínsecos y extrínsecos. Algunos de los factores intrínsecos que pueden influir en que se lleve un proceso de cicatrización normal son: diabetes, inmunosupresión, estasis venosa. Mientras que los principales factores extrínsecos son la corticoterapia y el uso de productos de tabaco [61].

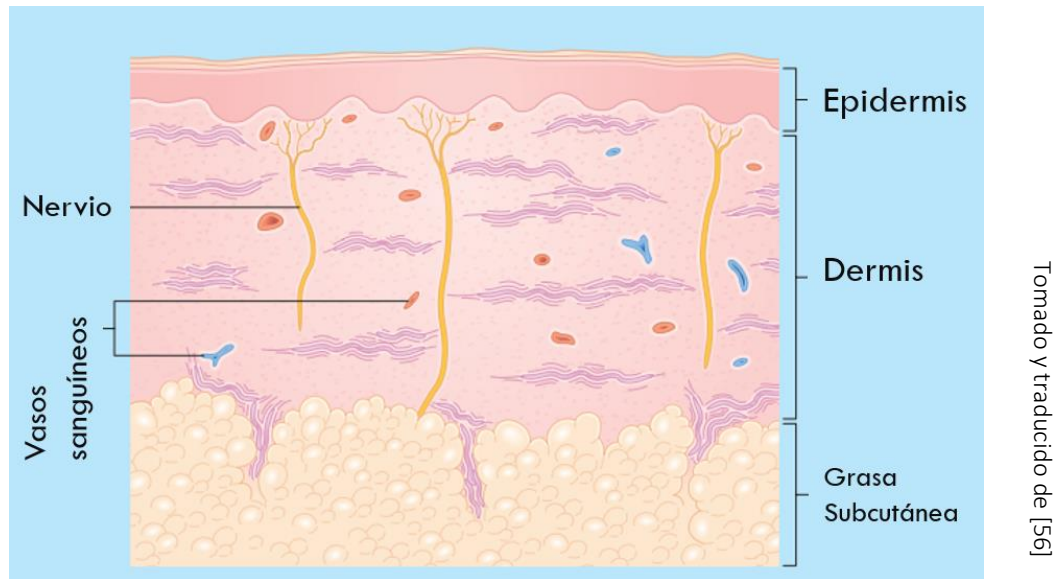


Ilustración 17. Estructura general de la piel

A continuación, se explica de manera general el proceso de cicatrización bajo condiciones normales:

De acuerdo a Oliveira [61] y Broughton [62], los mecanismos celulares y químicos que dan lugar a la cicatrización se dividen en tres fases que no son mutuamente excluyentes (Ilustración 19):

- Reacción inflamatoria
- Proliferación celular
- Remodelación

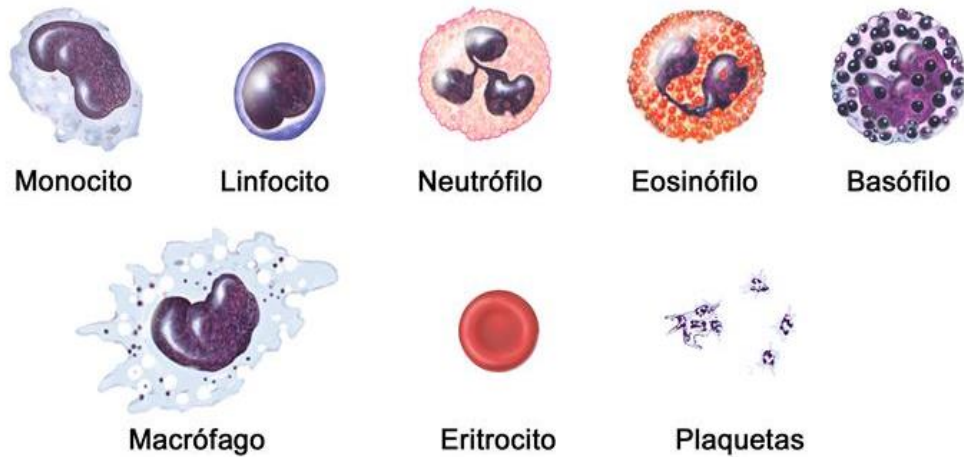
En estas fases, las células secretan sustancias químicas llamadas citoquinas y factores de crecimiento para comunicarse entre sí [63].

2.3.1. Fase inflamatoria

Los vasos sanguíneos que han sido dañados se contraen con la finalidad de evitar la pérdida sanguínea, esto sucede gracias a la secreción de sustancias vasoconstrictoras por parte de las plaquetas, mismas que también crean un coágulo que sellará el vaso sanguíneo dañado. Posteriormente se crea una red de fibrina que ayuda a reestablecer la homeostasis y al mismo tiempo sirve como una barrera que evita el ingreso de los microorganismos. Las plaquetas son responsables de secretar factores de crecimiento que atraen a neutrófilos y monocitos [63].

En la zona de la herida habrá una acumulación de células inmunitarias (Ilustración 18) que secretarán quimiocinas y citoquinas. Los neutrófilos son las primeras células en llegar a la zona herida; expresan citoquinas pro inflamatorias, especies de oxígeno reactivo, proteasas y péptidos catiónicos con la finalidad de atacar patógenos que se hayan introducido a través de la herida, además de esto, los neutrófilos realizan fagocitosis de los agentes patógenos.

La migración de monocitos sucede aproximadamente a las 48 h de la herida. Estas células llegan desde vasos sanguíneos cercanos. Se convierten en macrófagos una vez que entran a los tejidos. Actúan como presentadoras de antígeno y fagocitan microorganismos infecciosos, se encargan también de liberar factores de crecimiento necesarios para la formación de nuevo tejido en el área herida.



© 2007 Terese Winslow
U.S. Govt. has certain rights

Tomado de [53]

Ilustración 18. Células sanguíneas

2.3.2. Fase proliferativa

Esta fase es la responsable de que la herida cierre. Esta etapa comprende tres procesos: angiogénesis, fibroplasia y reepitelización.

La angiogénesis consiste en la multiplicación de células endoteliales, el reordenamiento de la membrana basal y la migración de células para la construcción de estructuras tubulares que darán lugar a vasos sanguíneos, estas reconstrucciones son importantes ya que permiten el transporte de células, oxígeno y nutrientes a la zona afectada.

La fibroplasia se lleva a cabo después de 4 días, consiste en un aumento de fibroblastos (debido a su multiplicación y algunos otros migran de lugares aledaños), estos sintetizan colágeno que ayudará a crear una red de tejido conectivo.

Se denomina reepitelización cuando las células epiteliales proliferan y migran a la zona afectada para reconstruir la membrana basal, generalmente este proceso es llevado a cabo por queratinocitos. La migración cesa cuando existe una inhibición de las células debido a contacto entre ellas.

2.3.3. Fase de remodelación

Esta fase finaliza la inflamación inicial e inicia al cabo de dos a tres semanas después de la lesión [61], puede extenderse hasta dos años después, dependiendo del organismo y de la gravedad de la lesión [63].

Los vasos sanguíneos sintetizados no son necesarios en esta fase, por lo que se degradan, al mismo tiempo que las células inflamatorias comienzan ya sea a migrar o a realizar apoptosis.

La fase de remodelación consiste en la reorganización celular, degradación y resíntesis de la matriz extracelular del tejido granular, haciéndolo menos celular y más fibroso, esto con la finalidad de obtener la mayor fuerza de tracción posible y reconstruir con la mayor normalidad posible el tejido afectado [64].

Los fibroblastos antes mencionados, cambian su fenotipo y expresan actina de músculo suave, a estas células transformadas se les llama miofibroblastos, los cuales tienen la capacidad de contraerse, esta habilidad hace que la herida completa presente contracción.

Cabe destacar la importancia de la información anterior para el proyecto; sentar las bases teóricas de la cicatrización nos permite analizar el mecanismo en el que podría intervenir algún metabolito secundario, además de teorizar su posible acción en el proceso.

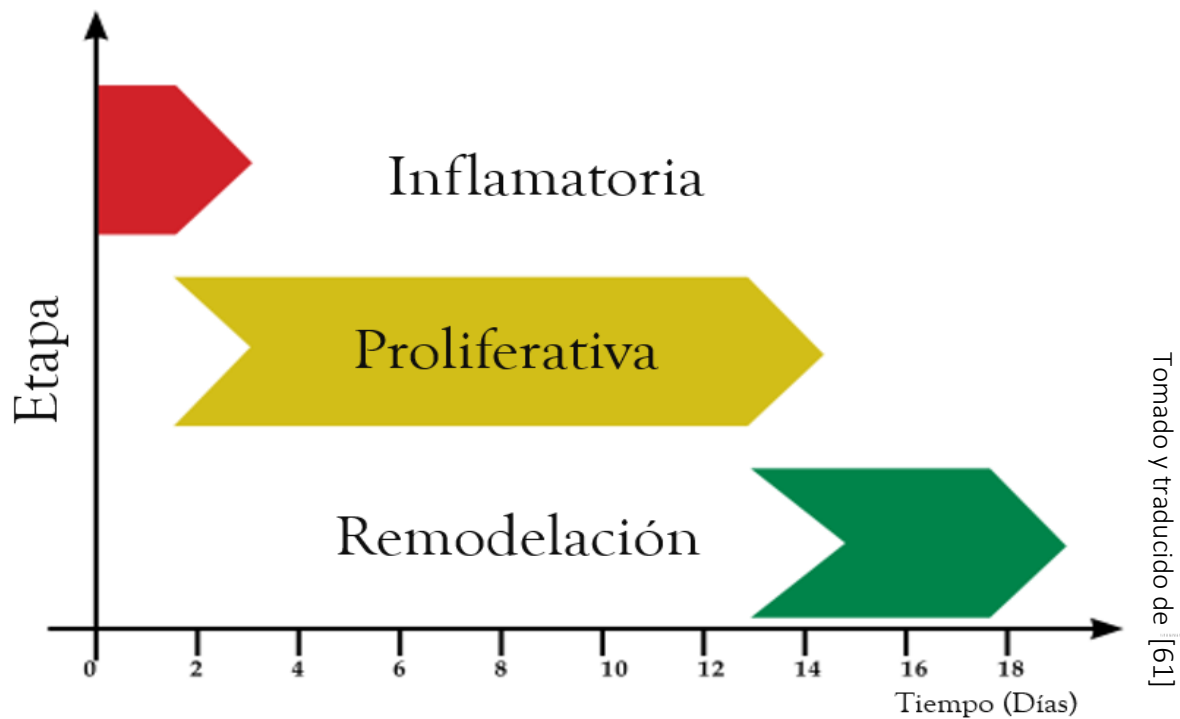
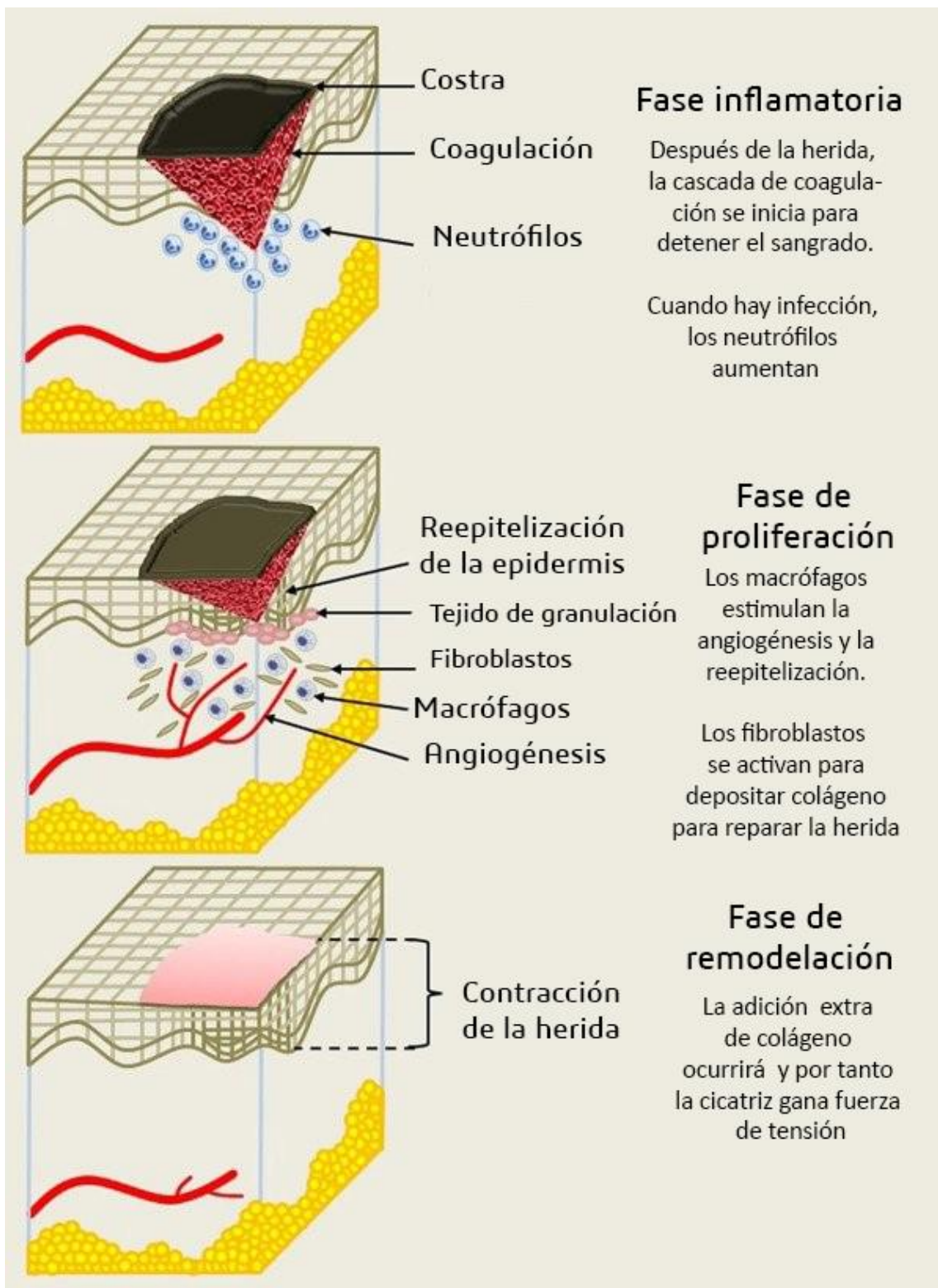


Ilustración 19. Etapas de la cicatrización



Tomado y traducido de [75]

Ilustración 20. Esquema general de la cicatrización.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Determinar el perfil fitoquímico preliminar de *Eupatorium aschenbornianum*, así como evaluar su actividad cicatrizante *in vivo*.

3.2. Objetivos particulares

- Determinar cualitativamente los metabolitos secundarios y grupos químicos presentes en *E. aschenbornianum*.
- Determinar cualitativamente los metabolitos secundarios y grupos químicos presentes en los extractos de agua, etanol, acetato de etilo y éter etílico de *E. aschenbornianum*
- Establecer la prueba *in vivo* piloto de los extractos convenientes de *E. aschenbornianum* y determinar si existe mejoría en el proceso de cicatrización.

4. Resultados y discusión

Tomando en cuenta la escasa información existente acerca de *Eupatorium aschenbornianum* y la importancia de sentar un marco de referencia para estudios posteriores, se exponen a continuación los resultados obtenidos siguiendo el esquema mostrado en la Ilustración 21.

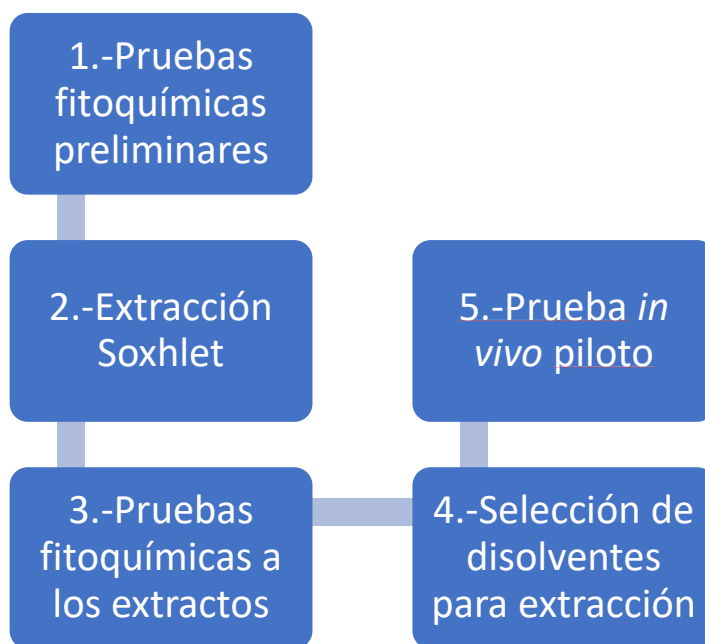


Ilustración 21. Diagrama general de bloque de etapas metodológicas

4.1. Pruebas fitoquímicas preliminares

Las pruebas fitoquímicas preliminares se realizaron directamente en la planta seca para determinar los metabolitos secundarios y grupos químicos presentes en *E. aschenbornianum*; los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4. Es importante tomar en cuenta que la presencia de metabolitos en *E. aschenbornianum* depende de diversos factores como clima, tipo de suelo, presencia de nutrientes y estado del ciclo biológico de la planta.

Prueba	Resultado
Alcaloides	++
Saponinas	+
Esteroides y terpenos	++
Azucares	+

Insaturaciones	++
Carbonilo	+
Cumarinas	-
Lactonas	-
Sesquiterpenlactonas	++
Hidroxilos fenólicos	++
Antocianinas	++
Flavonoides	+++

Tabla 4. Pruebas fitoquímicas preliminares en *Eupatorium aschenbornianum*

La prueba de Dragendorff para alcaloides mostró precipitados rojizos (Ilustración 22 A), lo que denota un resultado positivo y significativo en la muestra. En caso de que estas moléculas cumplan con un papel de apoyo en la cicatrización y debido a las propiedades que poseen dada su estructura, podrían estar actuando como aceptores y donadores de protones; algunos tipos de alcaloides presentan actividades tales como analgésicos (actuando en la etapa inflamatoria y proliferativa) y de vasoconstricción (actuando en la hemostasis, proceso de la fase inflamatoria) [30][33].

La determinación de saponinas se realiza con la prueba acuosa, en la cual se evalúa la presencia de espuma estable; en *E. Aschenbornianum* no están presentes de manera moderada ya que la espuma formada resulta no muy estable (Ilustración 22 B), por lo que no es probable que su papel en el proceso de cicatrización sea protagónico, sin embargo, podría tener un efecto antiinflamatorio debido a sus interacciones con moléculas mediadoras de este proceso [27], además, algunos tipos de saponinas han sido reportadas como antifúngicas [26] y antimicrobianas [28], de ser el caso de las saponinas encontradas en *E. aschenbornianum*, estarían también auxiliando en la asepsia de la cicatrización.

La prueba de Liebermann-Buchard para esteroides y terpenos es una reacción dual que dependiendo de su coloración revelará la presencia de alguno de estos dos metabolitos, si se presenta una coloración de azul a verdosa será positiva para esteroides, mientras una coloración violeta o morada será positiva para triterpenos. En el caso de *E. aschenbornianum*, la prueba fue positiva para esteroides y negativa para terpenos (Ilustración 22 C). Si los esteroides de la planta en cuestión presentan un efecto cicatrizante, de acuerdo con lo consultado en la bibliografía, este podría ser antiinflamatorio o analgésico [40].

La presencia de saponinas y de esteroides, sumado a la ausencia de terpenos sugiere que las saponinas podrían ser esteroideas.



Ilustración 22. Resultados de las pruebas fitoquímicas para; A: alcaloides, B: saponinas, y C: esteroides y terpenos.

Los azúcares se muestran ligeramente presentes al formarse un anillo coloreado en la interfase (Ilustración 23 D) después de agregar el reactivo de Molisch, sin embargo, es probable que estos no ejerzan ningún efecto relevante en el proceso de cicatrización y más bien sean moléculas unidas a agliconas o constituyentes de la estructura y reservas de energía de la planta.

La detección de insaturaciones positivas está denotada por una decoloración en el reactivo o la formación de un precipitado café, en *E. aschenbornianum* se encuentran presentes significativamente ya que este precipitado café se presenta en cuanto el reactivo toca la muestra (Ilustración 23 E). La presencia de este tipo de estructura aporta características de los metabolitos presentes en la planta, las insaturaciones podrían estar presentes en moléculas con la misma incidencia, por ejemplo, los flavonoides y los esteroides.

La prueba para grupo carbonilo se denotó ligeramente positiva debido a la aparición de un precipitado muy tenue después de añadir 2,4-dinitrofenilhidracina (Ilustración 23 F), este grupo puede estar presente en diversos metabolitos, dependiendo de la complejidad de cada uno.

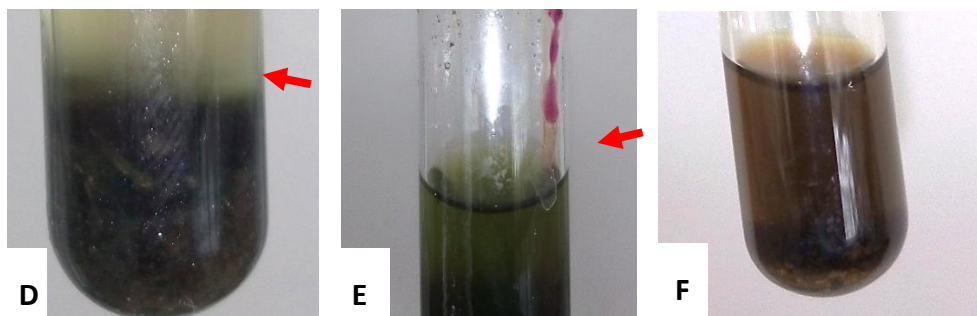


Ilustración 23. Resultados de las pruebas fitoquímicas para; D: azúcares, E: insaturaciones y F: grupo carbonilo.

La determinación de cumarinas se realizó mediante la prueba de NaOH, que denotaría resultados positivos bajo coloraciones que desaparecen al acidular la solución. En los ensayos realizados no hubo ningún cambio de coloración a amarillo; la coloración rojiza presentada no cambió cuando se agregó ácido al tubo de ensayo, por lo que el resultado para esta prueba es negativo (Ilustración 24 G).

La evaluación de la presencia de lactonas se realiza con KOH, donde un resultado positivo sería notable cuando se observen coloraciones amarillas o naranjas que desaparecen al agregar HCl, en este caso, no hubo ningún cambio de coloración a tonos rojizos cuando se agregó HCl, por lo que

el resultado de esta prueba es negativo (Ilustración 24 H). Los resultados negativos de cumarinas y lactonas se confirman mutuamente debido a que funcionan bajo el mismo principio, además de que las moléculas son de naturaleza similar.

La prueba de Baljet para sesquiterpenlactonas es positiva si el color de la solución vira a tonalidades naranjas- rojo oscuro; en la prueba realizada para la planta de interés se pueden observar resultados positivos, sin embargo, al contrastarse con las demás pruebas, resulta incoherente debido a que las lactonas y terpenos se encuentran ausentes, por lo que resulta un falso positivo dado posiblemente por el reactivo utilizado (Ilustración 24 I).

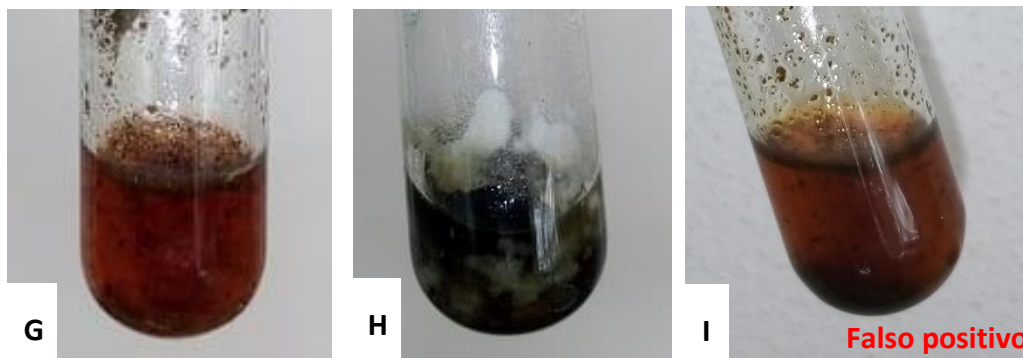


Ilustración 24. Resultados de pruebas fitoquímicas para: G: cumarinas, H: lactonas e I: sesquiterpenlactonas

Los hidroxilos fenólicos en *E. aschenbornianum* se determinaron con la prueba de FeCl_3 , los resultados positivos se hacen notar con coloraciones rojas, azules, violetas o verdes; se obtuvo un precipitado verde (Ilustración 25 J). Los hidroxilos fenólicos se presentan como un metabolito común en una gran variedad de plantas, por lo que su presencia en forma simple o compleja podría estar actuando como antioxidante. La prueba para hidroxilos fenólicos puede también estar confirmando la presencia de flavonoides, debido a que estos poseen estructuras fenólicas [42]. Por otra parte, su presencia podría también estar justificada por su presencia en estructuras lignificadas presentes normalmente en las plantas [65].

Los flavonoides se encuentran en *E. aschenbornianum* de manera notable debido a la clara presencia de una coloración rojo-naranja después de aplicar la prueba de Shinoda (Ilustración 25 K), estos metabolitos son de los más destacables en presencia y se caracterizan por ser antioxidantes, por lo que al estar presentes en la planta, esta podría auxiliar en el proceso de formación excesiva de radicales libres en heridas [41] y por lo tanto ser de apoyo en la fase inflamatoria del proceso de cicatrización.

Las antocianinas se encuentran presentes también, denotadas claramente por un cambio de coloración correspondiente al cambio de pH (Ilustración 25 L). Este resultado se confirma mutuamente con el positivo para flavonoides ya que se trata del mismo tipo de molécula.



Ilustración 25. Resultados de pruebas fitoquímicas para: J: hidroxilos fenólicos, K: Flavonoides y L: Antocianinas

4.2. Extracción Soxhlet

La extracción Soxhlet fue utilizada debido a que permite la separación de moléculas contenidas en la planta de acuerdo con su polaridad, por lo que al aplicarla obtenemos extractos contenidos en metabolitos con distinta polaridad, lo que nos acerca a su futura identificación. Esta técnica presenta muchas ventajas, entre ellas una metodología relativamente simple, la nula necesidad de filtración después de la extracción y su bajo costo [66].

<i>Etanol</i>	<i>Acetato de etilo</i>	<i>Éter etílico</i>
21.13%	1.2%	11.3%

Tabla 5 Contenido de producto por extracción Soxhlet

El contenido de la extracción con etanol como disolvente fue de 21.13%, el de acetato de etilo de 1.2% y el de éter etílico de 11.3% (Tabla 5). El porcentaje de materia obtenida varía de acuerdo con la afinidad de los componentes extraídos con el disolvente, por lo que en *E. aschenbornianum* se encuentran más metabolitos y otras moléculas con polaridad similar al etanol, esto resulta un dato importante ya que las personas que utilizan esta planta para tratar heridas realizan emplastes con soluciones etanólicas o acuosas, por lo que al haber mayor cantidad de moléculas en esta fase, hay más probabilidad de que existan metabolitos que ayuden en el proceso de cicatrización de heridas.

En la Tabla 5 no se muestra el porcentaje de producto para la extracción acuosa, ya que, debido a su alto punto de ebullición, es imposible concentrar el producto eficientemente.

4.3. Pruebas fitoquímicas a los extractos

Posteriormente a la extracción con distintos disolventes se realizaron pruebas fitoquímicas a cada uno de los extractos, siguiendo la metodología usada anteriormente, la Tabla 6 muestra los resultados obtenidos en cada uno de los disolventes y la comparativa con las pruebas fitoquímicas preliminares (PFP). Estas pruebas son útiles para determinar la polaridad de los grupos y metabolitos, por lo que únicamente se llevaron a cabo las pruebas que anteriormente fueron positivas.

	<i>PPF</i>	<i>Agua</i>	<i>Etanol</i>	<i>Acetato de etilo</i>	<i>Éter etílico</i>
<i>Alcaloides</i>	++	++	+	-	-
<i>Saponinas</i>	+	+	-	-	-
<i>Esteroides y terpenos</i>	++	-	-	+	++
<i>Azúcares</i>	+	-	-	++	+
<i>Insaturaciones</i>	++	-	++	+	-
<i>Carbonilo</i>	+	-	-	-	-
<i>Hidroxiolos fenólicos</i>	++	+	++	-	-
<i>Antocianinas</i>	++	-	-	+	+
<i>Flavonoides</i>	+++	-	-	++	++

Tabla 6. Pruebas de los extractos de éter etílico, acetato de etilo, etanol y agua

En el extracto acuoso se obtuvieron alcaloides y en menor medida saponinas e hidroxilos fenólicos; respecto a los alcaloides, estos generalmente son muy poco solubles en disolventes polares, a menos que se encuentren en forma de sales [31]. Por otra parte, las saponinas presentes en esta extracción fueron detectadas con una prueba fundamentada en su capacidad anfipática, lo que permite formar espuma; por lo que las moléculas tendrían la facultad de ser solubles en agua gracias a la glicona contenida en su estructura.

El extracto etanólico presentó menor incidencia de alcaloides que el extracto acuoso, mientras que las insaturaciones e hidroxilos fenólicos fueron mucho más abundantes en este extracto, por lo que los hidroxilos fenólicos y algunos alcaloides contendrían una mayor cantidad de insaturaciones que los demás metabolitos. Los hidroxilos fenólicos podrían encontrarse de manera libre, además de como parte de flavonoides, en el primer caso, la planta contaría con distintos tipos de metabolitos con capacidad antioxidante, pudiendo potenciar esta actividad en la cicatrización. De acuerdo a la literatura, la solubilidad de los hidroxilos fenólicos en agua de 0 a 65 °C es limitada, mientras que es muy soluble en alcohol [67], por lo que corresponde con los resultados obtenidos.

El extracto de acetato de etilo es el extracto que contiene el mayor número de metabolitos y grupos químicos, esto incluye esteroides, azúcares, insaturaciones, antocianinas y flavonoides. Resulta contradictorio que los azúcares se encuentren en disolventes apolares debido a que si se tratase de moléculas de carbohidratos sencillos (para los que está diseñada la prueba), estas serían únicamente solubles en agua [68]. Podría ser posible que sean constituyentes de moléculas más

complejas como glucósidos de flavonoides o saponinas, dado que los esteroides y flavonoides se encuentran también en los mismos extractos. La ausencia de saponinas en los extractos de acetato de etilo y éter etílico cuando se realizó su prueba podría estar justificada debido a que la prueba está basada en la capacidad de formar espuma, y las agliconas de las saponinas podrían ser mucho más solubles en estos disolventes, por lo que la formación de espuma no es tan eficiente. En este caso es recomendable una futura prueba de saponinas distinta a la ya realizada.

Este extracto contiene ligeramente insaturaciones en los metabolitos presentes. Por otra parte, los flavonoides (agliconas o flavonoides glucósidos) pueden ser solubles en alcoholes puros o en mezclas con agua, mientras que algunos otros (como isoflavonas, flavonas metiladas y flavonoles) son solubles en disolventes como cloroformo, diclorometano, éter dietílico o etanoato de etilo [69]. En el caso de *E. aschenbornianum*, los flavonoides se presentaron en este extracto y en el de éter etílico, por lo que estos metabolitos son polares.

El extracto de éter etílico contiene esteroides, azúcares, antocianinas y flavonoides. Los esteroides se encuentran en una menor concentración que en el extracto de etilo, mientras que los azúcares se encuentran en menor medida respecto al mismo. Las antocianinas y flavonoides se encuentran en concentraciones similares a las encontradas en el extracto de acetato de etilo, lo que confirma la baja polaridad de estas moléculas

Los extractos de acetato de etilo y éter etílico concentran a la mayor parte de los metabolitos, además de que cada uno presenta ventajas; el extracto de acetato de etilo es el que presenta mayor cantidad de metabolitos, esto significa una mayor probabilidad de que alguna de estos funcione a favor de la cicatrización, por otro lado, una de las maneras tradicionales de utilizar remedios de *E. aschenbornianum* es en emplastos de etanol, por lo que al analizar el extracto de etanol estamos obteniendo información acerca de los metabolitos contenidos en este tipo de remedios. Por estas razones, los extractos de acetato de etilo fueron elegidos para continuar con la fase experimental.

4.4. Prueba piloto *in vivo*

Esta prueba se realizó en cuatro modelos biológicos; dos de estos se trataron con extractos de etanol, los restantes con acetato de etilo (control y tratamiento para cada uno). Los controles con los vehículos (etanol y acetato de etilo) permiten descartar que estos son los agentes involucrados en la mejora de la cicatrización, además de ser una referencia para observar diferencias respecto al tratamiento. La cicatrización en heridas excisionales en ratas sin ningún tipo de aditamento ha sido reportada anteriormente: llega cerca del 100% dentro de los días 18-22 dependiendo del área de la herida siendo 500 mm² la más grande, al menos en bibliografía consultada [12][11][70].

En la Tabla 7 se muestra mediante las fotografías más representativas, la evolución de la herida en cada uno de los modelos biológicos, la colección completa de fotografías puede consultarse en la sección 7 (Anexos).

















Día	Extracto de etanol		Extracto de acetato de etilo	
	Control	Tratamiento	Control	Tratamiento
Día 3				
Día 9				
Día 15				
Día 21				

Tabla 7. Fotografías de la evolución de las heridas en ambos tratamientos y controles.

4.4.1. Extracto de etanol

En el ensayo control se obtuvo un porcentaje de cicatrización (PC) al día 21 de 95.03%, mientras que el PC para el mismo día en el modelo con tratamiento es de 97.43%; de manera general, podemos observar un adelanto en la cicatrización de la herida (ver Tabla 7) en el modelo biológico al que se le aplicó el tratamiento con extracto etanólico; por ejemplo, en la fotografía de la herida con tratamiento correspondiente al día 3 podemos observar una textura ligeramente menos inflamada que en la fotografía del mismo día en el control, para el día 15 es muy notable la disminución de la herida en el tratamiento y para el día 21 es notable a simple vista la diferencia en el PC entre ambos. En el ensayo, los modelos biológicos presentaron escozor al aplicar ambos tratamientos, esta desaparecía a los pocos minutos y mientras tanto se les impedían los intentos de rascarse o manipularse la herida.

La Ilustración 26 presenta en una gráfica las áreas de la herida del ensayo con extracto de etanol. Es importante destacar que a pesar de que los modelos biológicos realizan contracción de la piel para disminuir el impacto de la herida [71] se puede observar una diferencia clara entre la recuperación de la herida control y la del tratamiento. La herida correspondiente al control tiene un área inicial de 163.51 mm², ligeramente más pequeña que la herida de tratamiento con 176.87 mm², a pesar de esto, la herida con tratamiento muestra una recuperación más acelerada. Por otra parte, en el control del día 3 puede observarse un incremento en el área de la herida a comparación del día 0, esto podría explicarse por el ángulo en la toma fotográfica. En ambos tratamientos es notable una disminución del área de la herida desde el día 6 hasta el 12, esta progresión podría estar favorecida debido a la contracción antes mencionada, sin embargo, es notable la disminución de área de la herida del tratamiento a comparación del control.

Los días donde se encuentra mayor diferencia de recuperación corresponderían aproximadamente al final de la fase inflamatoria y a la fase proliferativa, por lo que al menos en la presente prueba piloto, el tratamiento de extracto etanólico asistió en el proceso cicatrizante en dichas fases y tomando en cuenta el análisis fitoquímico realizado a esta extracción, están presentes alcaloides e hidroxilos fenólicos, además de insaturaciones en estas estructuras.

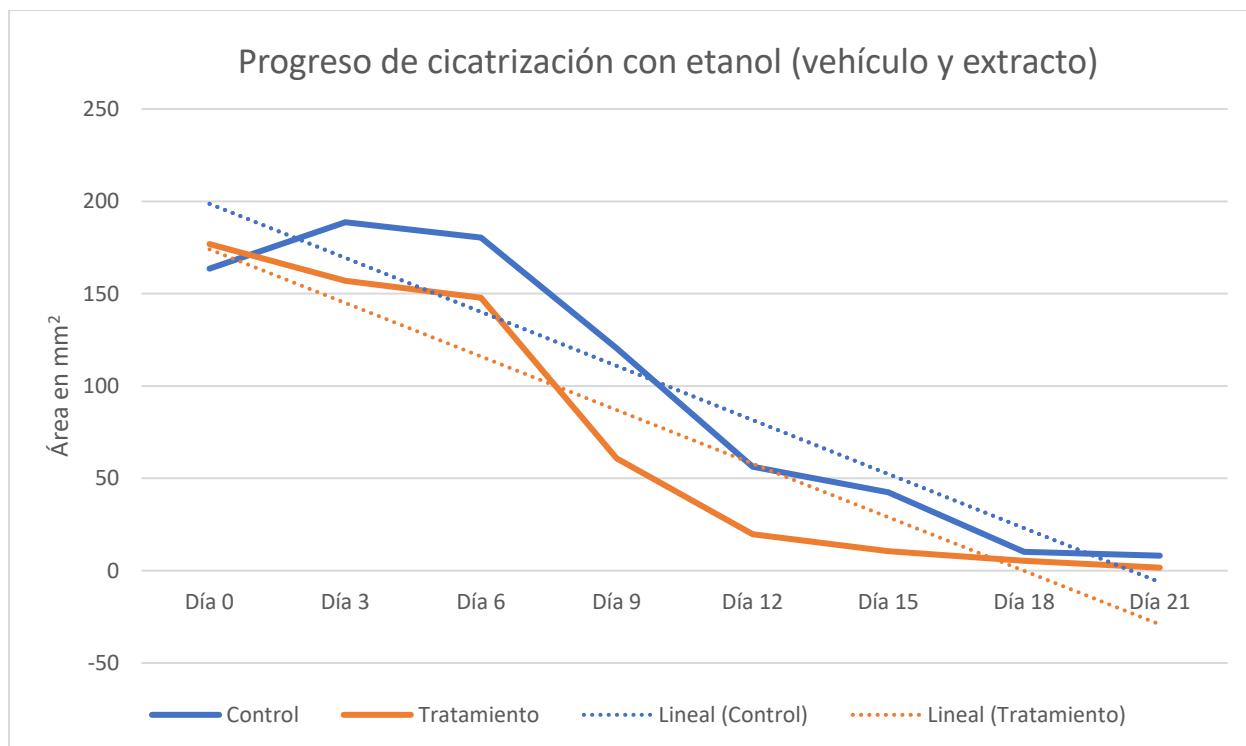


Ilustración 26. Gráfico del progreso de la cicatrización por etanol (control y tratamiento)

4.4.2. Extracto de acetato de etilo

El PC obtenido en el control con únicamente acetato de etilo aplicado es de 99.55% al día 21, mientras que el tratamiento mostró un PC de 97.19% para el mismo día. La mayor diferencia entre ambas aplicaciones puede ser observada en el día 9, donde la herida con el tratamiento es notablemente más pequeña que la herida control, para el día 15 la diferencia entre ambas heridas no es tan destacable y para el día 21 no se puede observar gran diferencia entre ellas en las fotografías (ver Tabla 7), sin embargo, la diferencia del PC final se abordará más adelante. El escozor fue más intenso en este ensayo a comparación del ensayo de etanol, sin embargo, en la aplicación del control y tratamiento de acetato de etilo, el escozor desaparecía más rápido que en el ensayo etanólico, de igual forma, los intentos de manipulación de la herida por parte del modelo biológico fueron impedidos.

La Ilustración 27 muestra de manera gráfica a comparación de la progresión de las heridas control y tratamiento del extracto de acetato de etilo. El área inicial del control es de 167.26 mm², mientras que el área del tratamiento es de 169.09 mm²; en los días 0-6 es notable una disminución acelerada más remarcada en el modelo control, por lo que el tratamiento no estaría siendo efectivo en la fase inflamatoria, por otra parte, es notable una disminución significativa de la herida del tratamiento a comparación del control entre los días 6 al 12 (aproximadamente correspondientes a la fase proliferativa y de remodelación del proceso de cicatrización), esta continúa del día 12 al 18 de manera aventajada al control, pero no más acelerada que los días anteriores, finalmente, el PC al día 21 del control es superior, pudiendo estar justificado por el

desprendimiento de mayor parte de costra en los días 20-21, seguido por la contracción de la piel del roedor.

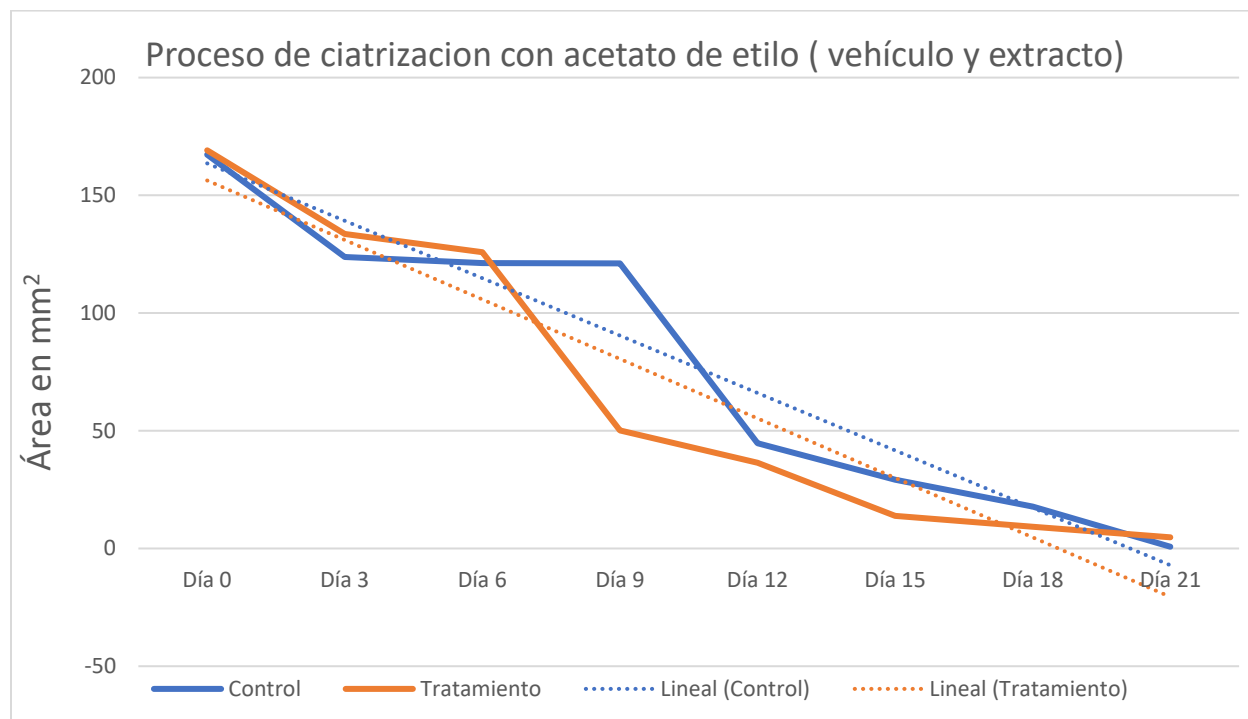


Ilustración 27. Gráfico del progreso de la cicatrización con acetato de etilo (control y tratamiento)

Los metabolitos correspondientes a la extracción de acetato de etilo son esteroides, azúcares antocianinas y flavonoides, estos cuentan con insaturaciones de manera moderada. Como se había mencionado anteriormente, los azúcares pueden estar formando parte de otros metabolitos, en caso de que se encuentren con esteroides, tendríamos presencia de saponinas. Por otra parte, de manera general, los flavonoides destacan por sus propiedades antiinflamatorias [41], sin embargo, también suelen tener otros roles importantes en la cicatrización; existe evidencia de estas moléculas en especies emparentadas a *E. aschenbornianum* con actividad adyuvante del proceso de cicatrización, esto nos puede dar un marco de referencia del tipo de molécula que se busca, además de su mecanismo de acción. La primer especie es *Ageratina pichinchensis* pertenece a la misma tribu que *E. aschenbornianum* (Eupatoriae), en la cual se descubrió el flavonoide nombrado 7-O-(β -D-glucopiranosil)-galactin, que actúa como estimulante del crecimiento de células de piel humana normal *in vitro*, además, se comprobó la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de *A. pichinchensis* en edema y el ausente efecto tóxico en los animales, esta planta también ha sido reportada como estimulante de la neoformación de vasos sanguíneos y la acumulación de fibroblastos en heridas [72].

Otra especie de la misma tribu con propiedades cicatrizantes causadas por sus flavonoides es *Chromolaena odorata*, a pesar de tener distintos metabolitos secundarios, los más bioactivos son las agliconas de flavonoides incluyendo acacetina, eupatilina, luteolina, naringenina, kaempferol,

quercetina, quercetagina y sinensetina; estas moléculas estimulan la proliferación de fibroblastos y queratinocitos en las heridas [20].

Por otra parte, se ha comprobado la actividad antiinflamatoria debida a flavonoides de diversas especies de Eupatorium; *E. subhastatum*, *E. laevigatum*, *E. hecatanthum*, *E. macrocephalum* y *E. candolleum*. De estas, *E. hecatanthum* mostró la mayor inhibición de edema en ratón a una dosis de 2.0 mg, el flavonoide identificado en esta especie es nepetina, mientras que en *E. laevigatum* (la segunda mejor especie en inhibir el edema en ratón con la misma dosis) se halló el flavonoide hispidulina, que no se encontró en ninguna otra especie analizada en el estudio [73].

4.4.2.1. Comparación de ambos extractos

La Ilustración 28 y la Ilustración 29 muestran gráficos normalizados con los datos obtenidos a partir de los ensayos de ambas extracciones, por lo que engloban toda la prueba *in vivo*. Las líneas en color azul corresponden al ensayo con etanol, mientras que las líneas color amarillo representan el ensayo con acetato de etilo, en ambos pares las líneas con mayor saturación de color corresponden al tratamiento, mientras que el control serán las líneas tenues.

Los datos de la Tabla 8 corresponden a la gráfica de la Ilustración 28, esta muestra la evolución de la herida tomando en cuenta un 100% como inicio, lo que hace que las pequeñas variaciones en las distintas heridas iniciales no intervengan y el desarrollo de cada resultado sea relativo a sí mismo, por lo que podemos observar de manera más objetiva la disminución del área herida y así comparar de manera imparcial el desempeño de los tratamientos y controles.

	<i>Control OH</i>	<i>Tx EtOH</i>	<i>Control AcOEt</i>	<i>Tx. AcOEt</i>
<i>Día 0</i>	100	100	100	100
<i>Día 3</i>	115.39	88.70	74.04	79.01
<i>Día 6</i>	110.32	83.54	72.44	74.44
<i>Día 9</i>	73.62	34.38	72.41	29.65
<i>Día 12</i>	34.43	11.18	26.71	21.56
<i>Día 15</i>	25.91	5.96	17.45	8.15
<i>Día 18</i>	6.18	3.04	10.67	5.49
<i>Día 21</i>	4.96	0.91	0.44	2.80

Tabla 8. Datos normalizados de la evolución de la herida en ambos tratamientos.

De manera general, se puede observar una mejora en la cicatrización de ambos tratamientos con extracción de *E. aschenbornianum* a comparación de los controles, esta diferencia se encuentra más remarcada a partir del día. Por otro lado, comparando ambos tratamientos, el tratamiento de extracto de acetato de etilo muestra una mayor efectividad a partir del día 0-9 (correspondiente a la fase inflamatoria y proliferativa) a comparación del tratamiento con etanol, sin embargo, la mayor contribución del extracto de etanol se presenta después del día 9 al 21

(correspondiente a la fase proliferativa y de remodelación). Esto resulta sumamente interesante ya que, en un tratamiento integral que incluya los metabolitos presentes en ambas extracciones, se complementarían y actuarían en todo el proceso de cicatrización.

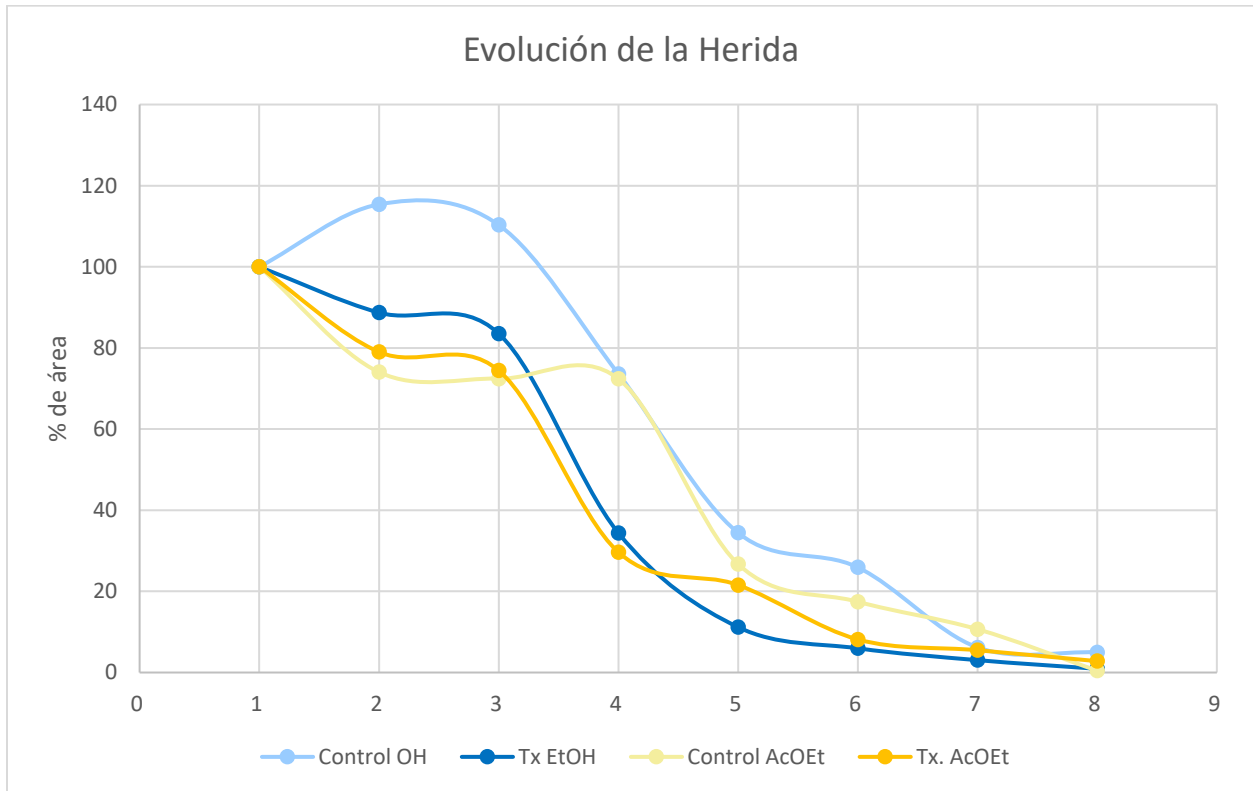


Ilustración 28. Evolución de la herida de ambos extractos (Gráfico normalizado)

La Ilustración 29 muestra la evolución de la cicatrización tomando en cuenta cada tratamiento y sus controles, para el día 3, el control de acetato de etilo fue la aplicación con mayor cicatrización, mientras que el control de etanol mostró "cicatrización negativa" debido al aumento de área en el lapso del día 0-6. En la etapa de proliferación (aproximadamente entre los días 3-15) es en donde se puede observar una mayor diferencia entre la cicatrización de todos los tratamientos y controles, teniendo un mayor porcentaje de cicatrización ambos tratamientos en esta prueba *in vivo* piloto; mientras que el tratamiento de acetato de etilo destaca más como cicatrizante del día 6-9, el tratamiento de etanol destaca del día 12 hasta el final del tratamiento.

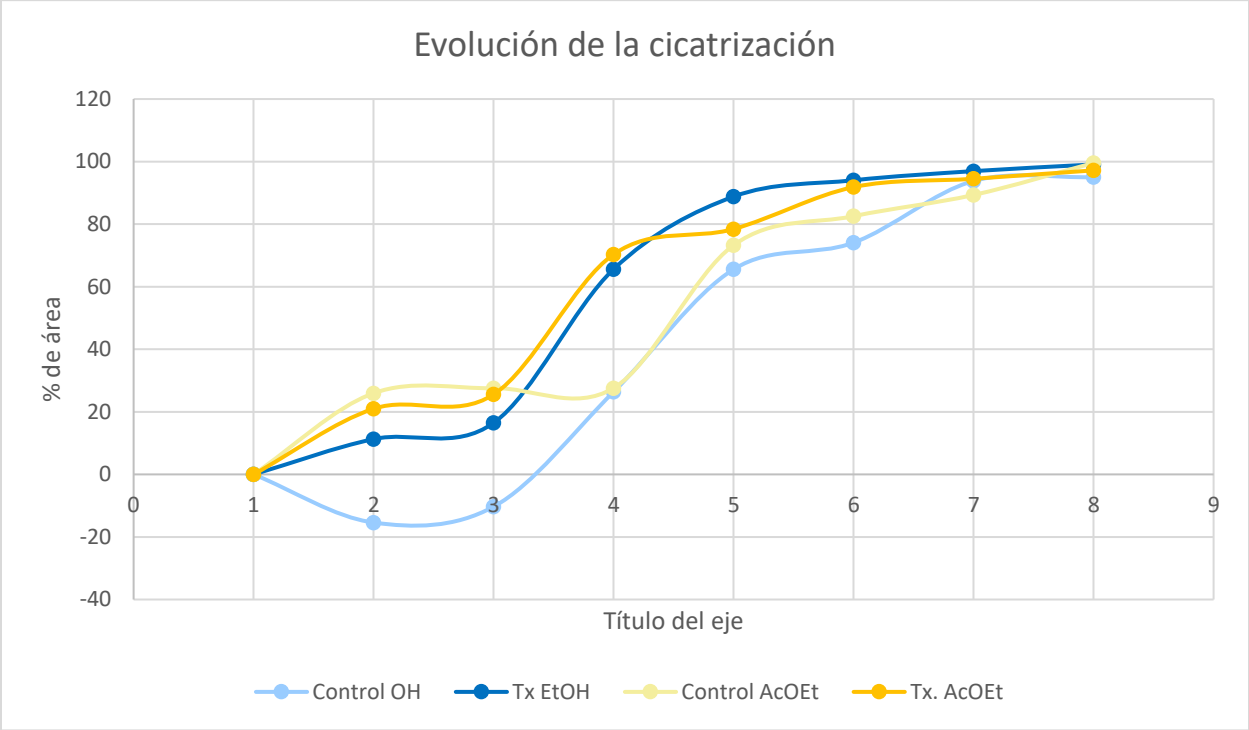


Ilustración 29. Evolución de la cicatrización en ambos tratamientos (Gráfico normalizado)

5. Conclusiones

Los metabolitos secundarios en las hojas de *E. aschenbornianum* son alcaloides, saponinas, esteroides, hidroxilos fenólicos, antocianinas y flavonoides, también se encontraron azúcares y estructuras como insaturaciones y grupo carbonilo. Los terpenos, cumarinas, lactonas y sesquiterpenlactonas se encuentran ausentes.

En la extracción acuosa se encuentran presentes alcaloides, saponinas e hidroxilos fenólicos, en la extracción con etanol se encontraron alcaloides, hidroxilos fenólicos e insaturaciones, en la de acetato de etilo se encuentran esteroides, azúcares, antocianinas, flavonoides e insaturaciones, es posible que se encuentren saponinas debido a la presencia de azúcares y esteroides y que estas no hayan sido detectadas de manera adecuada en la prueba de espuma para saponinas. Finalmente, en la extracción de éter etílico se encuentran de esteroides, azúcares, antocianinas y flavonoides. El grupo carbonilo no fue detectado en ningún extracto.

Los extractos elegidos para la prueba piloto *in vivo* fueron etanol y acetato de etilo. En esta prueba se observa una mejora en la cicatrización con el tratamiento a comparación de los controles, por lo que los metabolitos actuando a favor de la cicatrización en el ensayo piloto son alcaloides, hidroxilos fenólicos, esteroides, azúcares, antocianinas y flavonoides.

Comparando ambos tratamientos, el extracto de acetato de etilo muestra una mayor efectividad en los días aproximados a la fase inflamatoria y proliferativa, mientras que el mayor efecto del extracto de etanol se presenta en días aproximados a la fase proliferativa y de remodelación, por lo que, en conjunto, los metabolitos contenidos en ambas extracciones actuarían en el proceso completo de cicatrización, sin embargo es necesario realizar más ensayos que permitan obtener resultados probabilísticos favorables.

No es posible proponer aún un mecanismo por el cual estén actuando los metabolitos a favor de la cicatrización, sin embargo, con futuros ensayos histológicos y de elucidación estructural de los MS será posible acercarnos al mecanismo de acción.

6. Metodología

6.1. Preparación de material vegetal

La planta *Eupatorium aschenbornianum* con la que se trabajó en este proyecto fue adquirida en seco en Cuernavaca, Morelos, en el mes de enero del año 2019 y en el mercado principal de Cuautla, Morelos en el mes de agosto del año 2019. La especie fue validada por el Jardín Botánico Universitario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

De la materia total destinada para el ensayo en laboratorio, se retiraron los tallos, trabajando únicamente con las hojas. Estas fueron trituradas manualmente en un mortero hasta obtener textura de polvo.

6.2. Pruebas fitoquímicas preliminares

En cada tubo de ensayo se colocó un aproximado de 0.24 g de *E. aschenbornianum* en polvo y se realizaron por triplicado las siguientes pruebas fitoquímicas:

- Prueba de Liebermann-Buchard para esteroides y terpenos.

Se añade una gota de ácido sulfúrico en una mezcla de 1 ml de anhídrido acético con un 1 mL de cloroformo, se disuelve una pequeña cantidad de muestra en cloroformo para añadir el reactivo de Liebermann-Buchard. Se deja reposar una hora.

- Prueba de 2,4-dinitrofenilhidracina para grupos carbonilo.

Para preparar el reactivo se disuelven 50 mg de 2,4-dinitrofenilhidracina en 1 ml de etanol caliente, se agregan aproximadamente 50 mg de la muestra y se calienta en baño María por 15 minutos. Se deja en reposo y se enfría en baño de hielo.

- Prueba de Molisch para azúcares.

Se añade 1 g de α -naftol en 100 mL etanol al 95%, se agrega a la muestra 3 gotas del reactivo de Molisch, después se depositan por la pared dos mL de ácido sulfúrico concentrado.

- Prueba de Dragendorff para alcaloides.

Se preparan dos reactivos: A: 0.85 g de nitrato de bismuto en una mezcla de 10 mililitros de ácido acético glacial y 40 mL de agua. B: 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua. Se mezclan 5 mL de A con 4 mililitros de B y 7 mL de agua. Se coloca la muestra en etanol y se agrega unas gotas del reactivo de Dragendorff

- Prueba de NaOH para cumarinas.

Se disuelve la muestra en una solución de NaOH al 10%

- Prueba de KOH para lactonas.

Se disuelve 1 a 2 mg de la muestra en una solución alcohólica de KOH al 10%

- Prueba de Shinoda para flavonoides.

Aproximadamente 1mg de la muestra se disuelve en etanol, se le agrega limaduras de magnesio y se aplica calor. Por las paredes del tubo se dejan caer gotas de HCl concentrado por las paredes.

- Prueba de Baljet para sesquiterpenlactonas.

Se preparan dos reactivos, A: 1 g de ácido pícrico en 100 mL de etanol y B: 10 gramos de NaOH en 100 mL de agua. Mezclar A y B a partes iguales. Se le coloca a la muestra 3 a 4 gotas del reactivo

- Prueba del KMnO_4 para insaturaciones.

Se disuelven aproximadamente 1 a 2 μg de la muestra en 1 mL de agua acetona o etanol, se añade gota a gota la solución de KMnO_4 al 2%

- Prueba de FeCl_3 para oxidrilos fenólicos.

Aproximadamente 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua, acetato o etanol. Adicionar unas gotas de FeCl_3

- Prueba de pH para antocianinas.

Se disuelve la muestra en agua o etanol y dividirla en 3 partes a la 1ª se adiciona unas gotas de ácido sulfúrico la 2ª no se realiza tratamiento y a la 3ª se le adicionan gotas de hidróxido de potasio

- Prueba acuosa para saponinas

Agitar vigorosamente la muestra con 2 mL de H_2O .

Los resultados obtenidos en las pruebas fitoquímicas se evaluaron de forma cualitativa, tomando en cuenta el símbolo "+" como la presencia de coloración, mientras que "++" se debe interpretar como la presencia significativa de coloración. El símbolo "-" indica ausencia de coloración y por lo tanto una nula presencia del grupo químico o metabolito.

6.3. Extracción Soxhlet

Se colocaron 10 g de planta en polvo en cartuchos para Soxhlet y se realizó la extracción con éter etílico, acetato de etilo, etanol y agua, en el orden anterior, en concordancia con el incremento en la polaridad de cada disolvente. Cada extracción fue posteriormente concentrada y pesada, para determinar el porcentaje de producto obtenido

6.4. Pruebas fitoquímicas a los extractos

Se llevaron a cabo las pruebas fitoquímicas mencionadas anteriormente en los extractos de la planta.

6.5. Selección de disolventes para extracción

Se analizaron los resultados obtenidos en las pruebas fitoquímicas a los extractos para elegir los dos más convenientes para las siguientes etapas del proyecto, con ellos se realizó extracción de Soxhlet, utilizando 3 cartuchos con 50 g de *E. aschenbornianum* en polvo. Las concentraciones de las extracciones fueron pesadas y nuevamente disueltas en 100 ml de su disolvente original. Se obtuvieron en total 3 frascos de cada disolvente.

6.6. Prueba de estabilidad

Durante una semana se dejaron reposar los extractos en frascos ámbar, a temperatura ambiente.

6.7. Análisis microscópico

Se observó bajo el objetivo 100x muestras de todos los extractos, con el objetivo de detectar microorganismos.

6.8. Prueba piloto *in vivo*

El ensayo se realizó con 4 ratas Wistar de alrededor de 360 g de peso. La comida y agua fueron suministradas *ad libitum*.

6.8.1. Herida escisional simple

Los animales fueron anestesiados y la zona dorsal se rasuró y desinfectó con etanol al 70%. Se marcó la circunferencia con un molde previamente desinfectado y la herida se realizó con ayuda de pinzas y tijeras para cirugía.

Los animales se mantuvieron en observación en cajas separadas para evitar lo más posible la interacción con sus heridas. Se les aplicó antibiótico intramuscular y analgésico subcutáneo durante los primeros tres días.

6.8.2. Aplicación de tratamiento

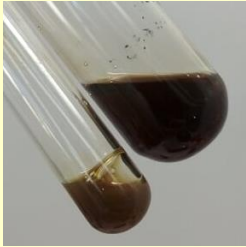
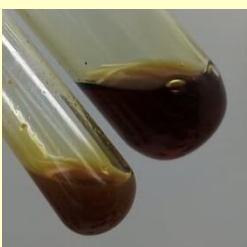


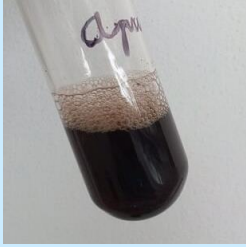

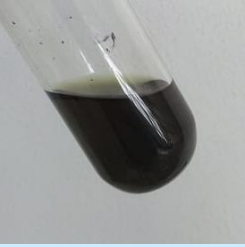
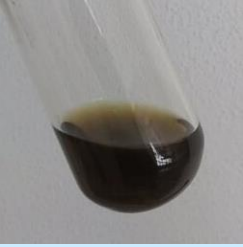


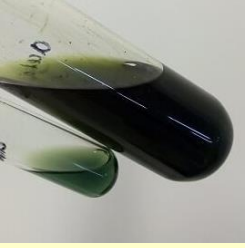

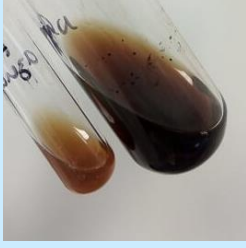



Se aplicó 0.1 ml de vehículo o tratamiento (asegurándose de que toda la herida estuviera cubierta) cada 24 h durante 21 días.


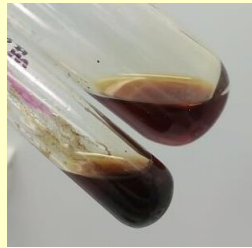





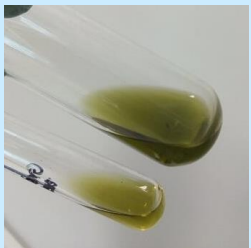



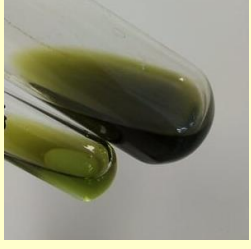



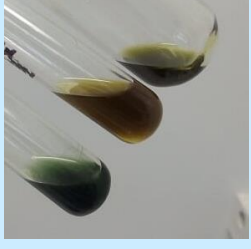
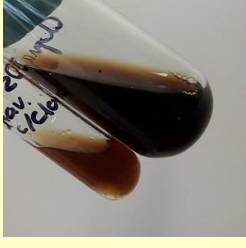

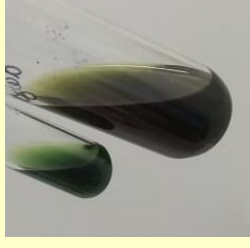
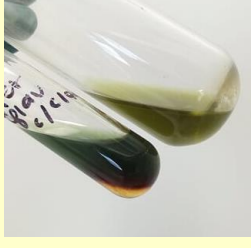
6.8.3. Fotografías y planimetría

Las fotografías fueron tomadas cada 3 días. El equipo utilizado fue una cámara fotográfica Canon Rebel T6 con velocidad 1/60, F3.5, ISO 6400 y AF. El área fue calculada a partir de la medida fotografiada junto a la herida utilizando el programa ImageJ.

7. Anexos

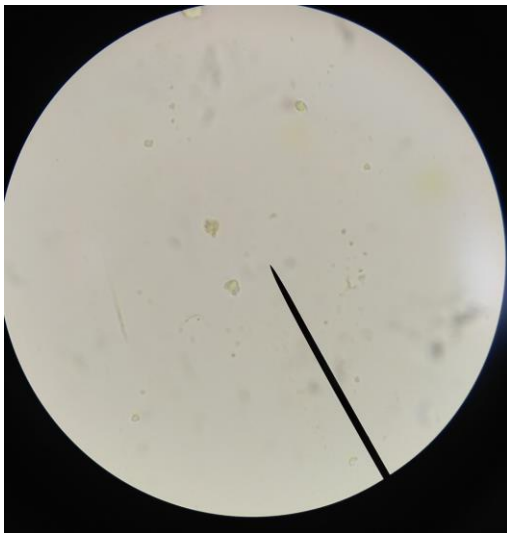
Fotografías de las pruebas fitoquímicas a los extractos. Los tubos gruesos son los controles, excepto en el caso de saponinas:

	Agua	Etanol	Acetato de etilo	Éter etílico
Alcaloides	 ++	 +	 -	 -
Saponinas	 +	 -	 -	 -
Esteroides y terpenos	 -	 -	 +	 ++
Azúcares	 -	 -	 ++	 +

<p>Insaturaciones</p>				
	-	++	+	-
<p>Carbonilo</p>				
	-	-	-	-
<p>Hidroxilos fenólicos</p>				
	+	++	-	-
<p>Antocianinas</p>				
	-	-	+	+
<p>Flavonoides</p>				
	-	-	++	++

Análisis microscópico a los extractos:

Acetato de etilo



Etanol

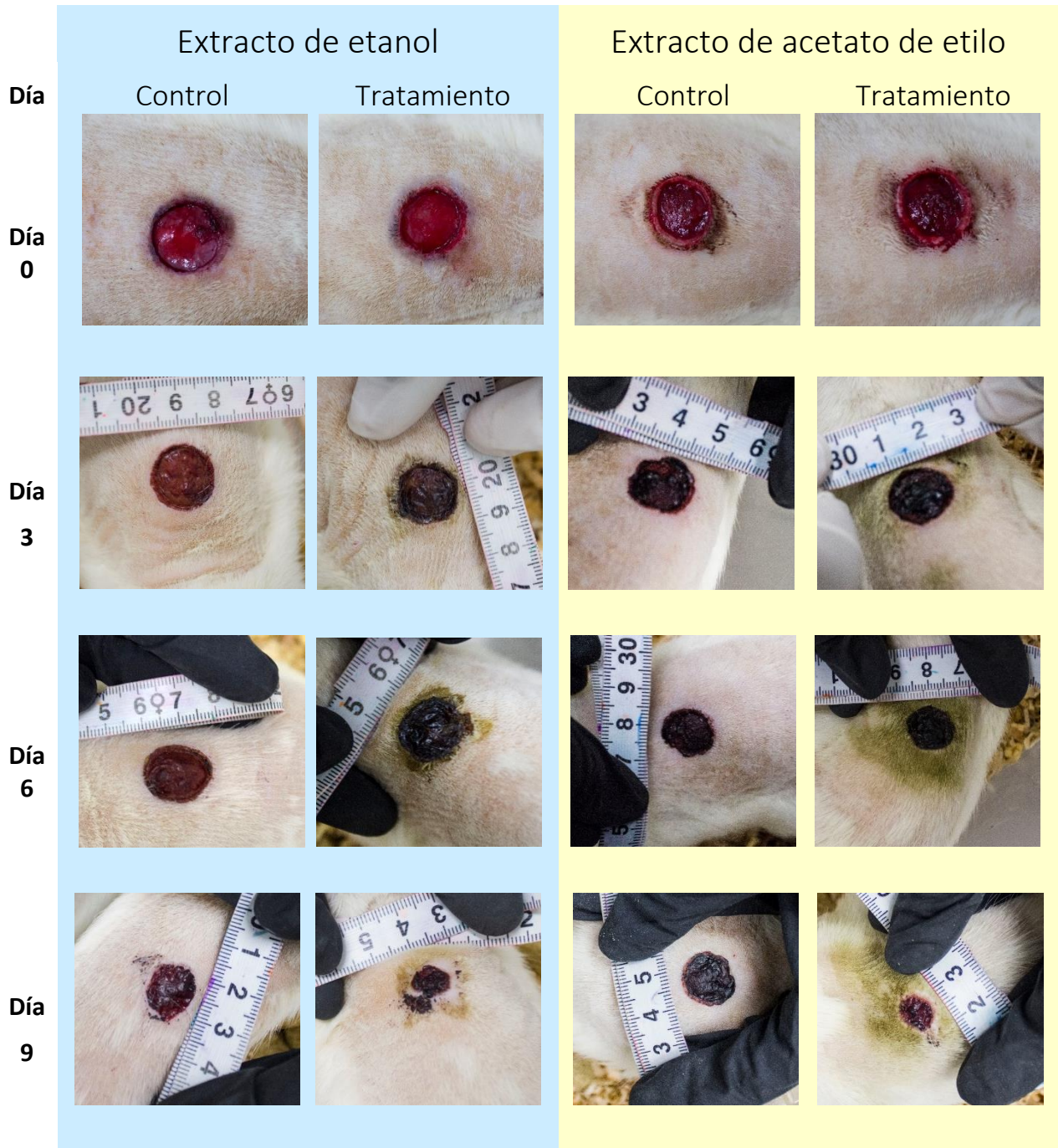


<i>Acetato de etilo</i>	<i>Etanol</i>
Negativo	Negativo

Tabla con los valores del área de las heridas en los modelos biológicos (valores en mm²):

	<i>Control OH</i>	<i>Tx OH</i>	<i>Control AcOEt</i>	<i>Tx. AcOEt</i>
<i>Día 0</i>	163.513	176.878	167.264	169.096
<i>Día 3</i>	188.689	156.903	123.849	133.608
<i>Día 6</i>	180.395	147.768	121.167	125.888
<i>Día 9</i>	120.38	60.818	121.12	50.139
<i>Día 12</i>	56.308	19.792	44.692	36.468
<i>Día 15</i>	42.382	10.553	29.193	13.791
<i>Día 18</i>	10.118	5.393	17.85	9.291
<i>Día 21</i>	8.121	1.613	0.748	4.746

Fotografías prueba piloto *in vivo*



Día
12



Día
15



Día
18



Día
21



8. Bibliografía

- [1] SEMARNAT, Capítulo 4: Biodiversidad, Inf. del Medio Ambient. en México. (2015) 155–190. https://apps1.semarnat.gob.mx:445/dgeia/informe_12/pdf/Cap4_biodiversidad.pdf.
- [2] CONABIO, Plantas medicinales | Biodiversidad Mexicana, (s/f). <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/medicinal/m-tradicional/plantas> (consultado el 1 de agosto de 2020).
- [3] G. Vela-Anaya, E.M. Stegensek-Mejía, C. Leija-Hernández, Características epidemiológicas y costos de la atención de las heridas en unidades médicas de la Secretaría de Salud, *Rev. Enferm. del Inst. Mex. del Seguro Soc.* 26 (2018) 105–114.
- [4] INAH, Axhiutl, (s/f). http://lugares.inah.gob.mx/es/museos-inah/museo/museo-piezas/12915-12915-axihuitl.html?lugar_id=389 (consultado el 14 de abril de 2019).
- [5] E. Masarovičová, K. Katarína, Medicinal plants - Past, nowadays, future, *Acta Hort.* 749 (2007) 19–27. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.749.1>.
- [6] P.K. Ocegueda, S., E. Moreno, Plantas Utilizadas En La Medicina Tradicional Y Su Identificación Científica, *Biodiversitas CONAVIO.* 62 (2005) 12–15. <https://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv62art3.pdf>.
- [7] C.C. Falzon, A. Balabanova, Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine, *Prim. Care - Clin. Off. Pract.* 44 (2017) 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2017.02.001>.
- [8] Y.K. Ríos R, A.C. Otero J, D.L. Muñoz H, M. Echeverry R, S.M. Robledo R, M.A. Yepes C, Actividad citotóxica y leishmanicida in vitro del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla*), *Rev. Colomb. ciencias Quim. Farm.* 37 (2008) 200–211.
- [9] P.Y. Ayon, Estudio etnofarmacológico de las diferentes especies endémicas de agave en la medicina tradicional del estado de hidalgo, Universidad Autónoma del estado de Hidalgo, Tesis. 2007.
- [10] D. Martinez-Moreno, R. Alvarado-Flores, M. Mendoza-Cruz, F. Basurto-Peña, Plantas medicinales de cuatro mercados del estado de Puebla, México, *Bol. la Soc. Botánica México.* 87 (2006) 79–87. <https://doi.org/10.17129/botsci.1735>.
- [11] M. Arun, S. Satish, P. Anima, Evaluation of wound healing, antioxidant and antimicrobial efficacy of *Jasminum auriculatum* Vahl. leaves., *Avicenna J. Phytomedicine.* 6 (2016) 295–304. <https://doi.org/10.22038/ajp.2016.5723>.
- [12] T. Bihani, N. Mhaske, Evaluation of in vivo wound healing activity of *Plumeria obtusa* L. (Champa) spray in rats, *Wound Med.* 28 (2019) 100176. <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2019.100176>.
- [13] D. Dwivedi, M. Dwivedi, S. Malviya, V. Singh, Evaluation of wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of *Pongamia pinnata* in wistar rats, *J. Tradit. Complement. Med.*

- 7 (2017) 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2015.12.002>.
- [14] W.L. Hosch, J. Rafferty, M. Petruzzello, A. Tikkanen, Asteraceae , (2015). <https://www.britannica.com/plant/Asteraceae> (consultado el 31 de julio de 2020).
- [15] J.L. Villaseñor, Diversidad y distribución de la familia Asteraceae en México, Bot. Sci. 96 (2018) 332–358. <https://doi.org/10.17129/botsci.1872>.
- [16] M.E. Sánchez-mendoza, B. Reyes-trejo, P. Sánchez-gómez, J. Rodríguez-silverio, C. Castillo-henkel, H. Cervantes-cuevas, J. Arrieta, Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer chromene from *Eupatorium aschenbornianum* : Role of nitric oxide , prostaglandins and sulfydryls, Fitoterapia. 81 (2010) 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.07.009>.
- [17] M.E. Sánchez-mendoza, B. Reyes-trejo, P. Sánchez-gómez, J. Rodríguez-silverio, C. Castillo-henkel, H. Cervantes-cuevas, J. Arrieta, N. García, A. Gonzalez, M. Fuentes, F.P. Beserra, A.L. Rozza, A.J. Vieira, L. Fernando, S. Gushiken, C.H. Pellizzon, M.Y. Rios, A.B. Aguilar-Guadarrama, V. Navarro, López, Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants, Fitoterapia. 87 (2003) 85–88. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00114-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00114-4).
- [18] López, Composición fitoquímica de *Eupatorium aschenbornianum* Schauer (Axihiuitl) y estudio preliminar sobre la toxicidad-letalidad, Fitoterapia. 6 (2006) 2006.
- [19] L.E. Ávila L., O. Arroyo H, E.M. Coutiño, Hemoxigenasa-1 : su importancia en los mecanismos de oxidación y su relación con enfermedades no infecciosas, UniverSalud. (2013).
- [20] A. Sirinthipaporn, W. Jiraugkoorskul, Wound healing property of siam weed, *Chromolaena odorata*, Pharmacogn. Nat. Prod. (2017).
- [21] A.K. Chakravarty, T. Mazumder, S.N. Chatterjee, Anti-inflammatory potential of ethanolic leaf extract of *eupatorium adenophorum* spreng. Through alteration in production of TNF- α , ROS and expression of certain genes, Evidence-based Complement. Altern. Med. (2010). <https://doi.org/10.1093/ecam/neq033>.
- [22] S. Pagare, M. Bhatia, N. Tripathi, S. Pagare, Y.K. Bansal, Secondary metabolites of plants and their role: Overview, Curr. Trends Biotechnol. Pharm. 9 (2015) 293–304.
- [23] G. Guerriero, R. Berni, J.A. Muñoz-Sanchez, F. Apone, E.M. Abdel-Salam, A.A. Qahtan, A.A. Alatar, C. Cantini, G. Cai, J.F. Hausman, K.S. Siddiqui, S.M.T. Hernández-Sotomayor, M. Faisal, Production of plant secondary metabolites: Examples, tips and suggestions for biotechnologists, Genes (Basel). 9 (2018). <https://doi.org/10.3390/genes9060309>.
- [24] A. Böttger, U. Vothknecht, C. Bolle, A. Wolf, Plant secondary metabolites and their general function in plants, en: Lessons Caffeine, Cannabis Co., 1a ed., Springer International Publishing, 2018: pp. 143–152. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-99546-5>.
- [25] J. Troisi, R. Di Fiore, C. Pulvento, R. D’Andria, A. Vega-Gálvez, M. Miranda, E.A. Martínez, A. Lavini, Saponinas, en: D. Bazile, B. Daniel, C. Nieto (Eds.), Estado del arte la quinua en el

- mundo 2013, FAO, Santiago de Chile, 2014: pp. 319–322. <https://doi.org/10.13140/2.1.1568.5129>.
- [26] S.D. Desai, D.G. Desai, H. Kaur, Saponins and their biological activities, *Pharma Times*. 41 (2009) 13–16.
- [27] E. Nyakudya, J.H. Jeong, N.K. Lee, Y. Jeong, Platycosides from the Roots of *Platycodon grandiflorum* and Their Health Benefits, *Prev.Nutr. Food Sci.* 19 (2014) 59–68.
- [28] K.O. Soetan, M.A. Oyekunle, O.O. Aiyelaagbe, M.A. Fafunso, Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum Bicolor* L. Moench, *African J. Biotechnol.* 5 (2006) 2405–2407. <https://doi.org/10.5897/AJB06.252>.
- [29] G.J.A. Acosta, *Alcaloides y compuestos nitrogenados*, Universidad de antioquia, Medellin, 2008.
- [30] T.P.T. Cushnie, B. Cushnie, A.J. Lamb, Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities, *Int. J. Antimicrob. Agents*. 44 (2014) 377–386. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001>.
- [31] T. Aniszewski, *Definition, typology, and occurrence of alkaloids*, 2a ed., Elsevier B.V., 2015. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-59433-4.00001-8>.
- [32] J.V. Kurhekar, Alkaloids - the healers in medicinal plants, *Int. J. Res. Biosci.* 6 (2017) 1–7.
- [33] I. Stranska, M. Skalicky, J. Novak, E. Matyasova, V. Hejnak, Analysis of selected poppy (*Papaver somniferum* L.) cultivars: Pharmaceutically important alkaloids, *Ind. Crops Prod.* 41 (2013) 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.018>.
- [34] MEDSAFE, *New Zealand Data Sheet*, New Zeal. Data Sheet. (2020) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2016.02.019>.
- [35] E. Breitmaier, *Terpenes: Importance, General Structure, and Biosynthesis*, en: *Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones*, WILEY-VCH, Germany, 2006: pp. 1–3.
- [36] B. Singh, R.A. Sharma, *Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications*, *Biotech.* 5 (2015) 129–151. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0220-2>.
- [37] S. Bourgou, A. Pichette, B. Marzouk, J. Legault, Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia, *South African J. Bot.* 76 (2010) 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.009>.
- [38] A. Sultan, R. Raza, *Steroids: A Diverse Class of Secondary Metabolites*, *Med. Chem. (Los Angeles)*. 5 (2015). <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000279>.
- [39] S.S. Patel, J. Savjani, Systematic review of plant steroids as potential anti- inflammatory agents: Current status and future perspectives, *J. Phytopharm.* 4 (2015) 121–125.
- [40] G.M.K.B. Gunaherath, A.A.L. Gunatilaka, *Plant Steroids: Occurrence, biological significance*

- and their analysis, *Encycl. Anal. Chem.* (2014) 1–26. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9931>.
- [41] M.M. Jucá, F.M.S. Cysne Filho, J.C. de Almeida, D. da S. Mesquita, J.R. de M. Barriga, K.C.F. Dias, T.M. Barbosa, L.C. Vasconcelos, L.K.A.M. Leal, J.E. Ribeiro, S.M.M. Vasconcelos, Flavonoids: biological activities and therapeutic potential, *Nat. Prod. Res.* 6419 (2018) 1–14. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1493588>.
- [42] S. Kummar, A.K. Pandey, Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview, *Sci. World J.* (2013). <https://doi.org/10.1002/med.10033>.
- [43] Y. Li, J. Yao, C. Han, J. Yang, M.T. Chaudhry, S. Wang, H. Liu, Y. Yin, Quercetin, inflammation and immunity, *Nutrients.* 8 (2016) 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu8030167>.
- [44] B. Burton-Freeman, A. Sandhu, I. Edirisinghe, Anthocyanins, *Nutraceuticals Effic. Saf. Toxic.* (2016) 489–500. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00035-8>.
- [45] H.E. Khoo, A. Azlan, S.T. Tang, S.M. Lim, Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits, *Food Nutr. Res.* 61 (2017). <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>.
- [46] M.A. Lila, Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach Mary, *J. Biomed. Biotechnol.* 5 (2004) 306–313. <http://jbb.hindawi.com>.
- [47] C. Wing-kwan, S. C.M. Cheung, R. A.W. Lau, F.F.B. Iris, Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.), en: I.F.F. Benzie, S. Wachtel-Galor (Eds.), *Herb. Med. Biomol. Clin. Asp. Second Ed.*, 2nd ed., Routledge, 2011: pp. 1–464.
- [48] S. Li, B. Wu, W. Fu, L. Reddivari, The anti-inflammatory effects of dietary anthocyanins against ulcerative colitis, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms20102588>.
- [49] W. Brown, Lactone | *Britannica.com*, (s/f). <https://www.britannica.com/science/lactone> (consultado el 24 de febrero de 2020).
- [50] B. Gawdzik, A. Kamizela, A. Szyszkowska, Lactones with a fragrance properties, *Chemik.* 69 (2015) 346–349.
- [51] M. Mazur, A. Skrobiszewski, W. Gładkowski, M. Podkowik, J. Bania, J. Nawrot, T. Klejdysz, C. Wawrzeńczyk, Lactones. Synthesis, antifeedant and antibacterial activity of γ -lactones with a p-methoxyphenyl substituent, *Pest Manag. Sci.* 72 (2016) 489–496. <https://doi.org/10.1002/ps.4012>.
- [52] M.J. Matos, L. Santana, E. Uriarte, O.A. Abreu, E. Molina, E.G. Yordi, Coumarins — An Important Class of Phytochemicals, en: V. Rao, L. Rao (Eds.), *Phytochem. Isol. Characterisation Role Hum. Heal.*, InTech, 2015. <https://doi.org/10.5772/59982>.
- [53] H.M.P. Poumale, R. Hamm, Y. Zang, Y. Shiono, V. Kuete, Coumarins and Related Compounds from the Medicinal Plants of Africa, en: *Med. Plant Res. Africa Pharmacol.*

- Chem., 2013: pp. 261–300. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405927-6.00008-4>.
- [54] K.N. Venugopala, V. Rashmi, B. Odhav, Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity, *Biomed Res. Int.* 2013 (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/963248>.
- [55] S. Barata, Identificación de cumarinas en especies autóctonas del género *pterocaulon* ell., Universidad de Belgrano, 2007. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4151.2563>.
- [56] M. Chadwick, H. Trewin, F. Gawthrop, C. Wagstaff, Sesquiterpenoids lactones: Benefits to plants and people, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 12780–12805. <https://doi.org/10.3390/ijms140612780>.
- [57] V.P. Sülsen, V.S. Martino, Overview, en: V.P. Sülsen, V.S. Martino (Eds.), *Sesquiterpene Lact.*, Springer International Publishing, 2018. <https://doi.org/10.1097/00024382-200403001-00508>.
- [58] O.A. Dupuy L, R. Murillo, J.A.V. Bonilla, Lactonas sesquiterpénicas de las plantas *viguiera sylvatica* y *decachaeta thieleana* (asteraceae) modulan la producción de óxido nítrico y la fagocitosis de macrófagos RAW, *Rev. Biol. Trop.* 56 (2008) 1063–1073.
- [59] J.E. Lai-Cheong, J.A. McGrath, Structure and function of skin, hair and nails, *Medicine (Baltimore)*. 45 (2017) 347–351. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.03.004>.
- [60] M. Takeo, L. Wendy, I. Mayumi, Wound Healing and Skin Regeneration, *CSH Perspectives*. (2015). [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197311\)32:5<1263::AID-CNCR2820320535>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197311)32:5<1263::AID-CNCR2820320535>3.0.CO;2-L).
- [61] A.C. Oliveira, Z. De Araújo, T. Fortuna, A. Peixoto, Wound healing - A literature review, *An. Bras. Dermatol.* (2016). <https://doi.org/10.1099/00222615-43-3-221>.
- [62] G.I. Broughton, J. Jeffrey, C.E. Attinger, The Basic Science of Wound Healing, *Plast. Reconstr. Surg.* 117 (2006) 125-34S. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2>.
- [63] H. Orsted, D. Keast, L. Forest, M. Francoise, Basic principles of wound healing, *Wound Care Canada*. 9 (2004) 4–12.
- [64] N. 'Izzah Ibrahim, S.K. Wong, I.N. Mohamed, N. Mohamed, K.Y. Chin, S. Ima-Nirwana, A.N. Shuid, Wound healing properties of selected natural products, *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 15 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijerph15112360>.
- [65] Z. Mahmood, M. Yameen, M. Jahangeer, M. Riaz, A. Ghaffar, I. Javid, Lignin as natural antioxidant capacity, en: M. Poletto (Ed.), *Lignin- Tends Apl.*, InTech, 2018: p. 13. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.12.014>.
- [66] A. Zygler, M. Słomińska, J. Namieśnik, Soxhlet extraction and new developments such as soxtec, *Compr. Sampl. Sample Prep.* 2 (2012) 65–82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00037-5>.

- [67] PubChem, Phenol | C₆H₅OH - PubChem, National Libr. Med. (s/f). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenol> (consultado el 9 de septiembre de 2020).
- [68] The Medical Biochemistry Page, Biochemical Properties of Carbohydrates , (s/f). <https://themedicalbiochemistrypage.org/biochemistry-of-carbohydrates/> (consultado el 29 de septiembre de 2020).
- [69] P. Pinho, O. Ferreira, Solubility of flavonoids in pure solvents, *Ind. Eng. Chem. Res.* 51 (2012) 6586–6590.
- [70] Z. Cheraghali, R. Mohammadi, G. Jalilzadeh-Amin, Planimetric and biomechanical study of local effect of pulegone on full thickness wound healing in rat, *Malaysian J. Med. Sci.* 24 (2017) 52–61. <https://doi.org/10.21315/mjms2017.24.5.6>.
- [71] A. Grada, J. Mervis, V. Falanga, Research Techniques Made Simple: Animal Models of Wound Healing, *J. Invest. Dermatol.* 138 (2018) 2095–2105. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.08.005>.
- [72] O. Romero-Cerecero, A. Zamilpa, M. González-Cortazar, D. Alonso-Cortés, E. Jiménez-Ferrer, P. Nicasio-Torres, L. Aguilar-Santamaría, J. Tortoriello, Pharmacological and chemical study to identify wound-healing active compounds in *Ageratina pichinchensis*, *Planta Med.* 79 (2013) 622–627. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1328462>.
- [73] M.L. Clavin, F. Redko, C. Acevedo, V. Martino, In vivo anti-inflammatory activity and flavonoid identification of medicinal *Eupatorium* species, *Pharmacogn. J.* (2013) 91–93. <https://doi.org/10.1016/j.phcgj.2013.03.002>.
- [74] M. de L. Garzón, G.A. James, A. Romero, La comercialización de medicamentos naturistas en la Ciudad de México, *Rev. la Soc. química México.* (1999).
- [75] P. Jayaraman, P. Nathan, P. Vasanthan, S. Musa, V. Govindasamy, Stem cells conditioned medium: A new approach to skin wound healing management, *Cell Biol. Int.* 37 (2013) 1122–1128. <https://doi.org/10.1002/cbin.10138>.