



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**Facultad de Ciencias Químicas**



**Caracterización del extracto de *Haematoxylum brasiletto*  
encapsulado en hidroxapatita para evaluar su efecto  
cicatrizante**

Tesis presentada para obtener el título de Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Presenta:

**Mayra Karina Pablo Alvarado**

Asesores

**M.C. Genaro Carmona Gutiérrez**

Departamento de Química General - FCQ

**Dr. Efraín Rubio Rosas**

CUV y TT - BUAP

**Dr. Alfonso Daniel Díaz Fonseca**

Departamento de Farmacia - FCQ

Agosto 2018

# ÍNDICE GENERAL

## I. Resumen

## II. Introducción

### 2.1 Piel

#### 2.1.1 Funciones

#### 2.1.2 Estructura

##### 2.1.2.1 Capa externa (epidermis)

##### 2.1.2.2 Capa media (dermis)

##### 2.1.2.3 Capa profunda (subcutis)

### 2.2 Heridas y cicatrización

#### 2.2.1 Herida

#### 2.2.2 Cicatrización

##### 2.2.2.1 Tipos de cicatrización

##### 2.2.2.2 Fases de la cicatrización

##### 2.2.2.3 Cicatrización patológica

### 2.3 *Haematoxylum brasiletto*

#### 2.3.1 Etimología

#### 2.3.2 Botánica

#### 2.3.3 Sustancias inorgánicas

#### 2.3.4 Actividad antimicrobiana

#### 2.3.5 Usos

#### 2.3.6 Metabolitos secundarios

##### 2.3.6.1 Taninos

###### 2.3.6.1.1 Clasificación

###### 2.3.6.1.2 Propiedades biológicas y farmacológicas

##### 2.3.6.2 Flavonoides

###### 2.3.6.2.1 Clasificación

###### 2.3.6.2.2 Interés farmacognóstico

### 2.4 Apatita

#### 2.4.1 Hidroxiapatita

##### 2.4.1.1 Composición y estructura química

##### 2.4.1.2 Usos

##### 2.4.1.3 Métodos de síntesis

### 2.5 Nanotecnología

#### 2.5.1 Aplicaciones de las nanopartículas

#### 2.5.2 Método sol-gel

##### 2.5.2.1 Ventajas del método sol-gel.

##### 2.5.2.2 Desventajas del método sol-gel.

## III. Planteamiento del problema

## IV. Justificación

## V. Hipótesis

## **VI. Objetivos**

### **VII. Parte experimental**

#### 7.1 Obtención de los extractos

- 7.1.1 Extracto alcohólico de corteza
- 7.1.2 Extracto alcohólico de duramen
- 7.1.3 Extracto acuoso de duramen

#### 7.2 Pruebas fitoquímicas

- 7.2.1 Taninos.
- 7.2.2 Flavonoides.
- 7.2.3 Quinonas.
- 7.2.4 Alcaloides.
- 7.2.5 Saponinas
- 7.2.6 Lactonas.
- 7.2.7 Sesquiterpenlactonas.
- 7.2.8 Cumarinas.
- 7.2.9 Esteroles y metilesteroles.
- 7.2.10 Terpenos.

#### 7.3 Síntesis de hidroxiapatita

#### 7.4 Síntesis de la nanomatriz ha<sub>550</sub>/hb<sub>85%</sub>

#### 7.5 Caracterización

- 7.5.1 Espectroscopia de Ultravioleta visible (UV-visible)
- 7.5.2 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)
- 7.5.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)
- 7.5.4 Espectroscopia de energía dispersiva (EDS)
- 7.5.5 Difracción de rayos X (DRX)

#### 7.6 Evaluación antimicrobiana

#### 7.7 Evaluación biológica

- 7.7.1 Aplicación de los tratamientos

## **VIII. Resultados**

#### 8.1 Pruebas fitoquímicas

#### 8.2 Caracterización por espectroscopia UV-visible.

#### 8.3 Caracterización por espectroscopia infrarroja (FT-IR)

#### 8.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

- 8.4.1 Hidroxiapatita
- 8.4.2 Nanoreservorio

#### 8.5 Caracterización por energía dispersiva (EDS)

- 8.5.1 Hidroxiapatita
- 8.5.2 Nanoreservorio

#### 8.6 Caracterización por difracción de rayos X (DRX)

#### 8.7 Evaluación microbiológica

#### 8.8 Evaluación biológica

- 8.8.1 Evaluación cualitativa del efecto cicatrizante

**IX. Discusión de resultados**

9.1 Pruebas fitoquímicas

9.2 Espectroscopia de UV-visible

9.3 Espectroscopia infrarroja (FT-IR)

9.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

9.5 Energía dispersiva (EDS)

9.6 Difracción de rayos X (DRX)

9.7 Actividad antimicrobiana

9.8 Evaluación biológica

**X. Conclusiones**

**XI. Referencias**

## I. RESUMEN

El presente trabajo se centra en la elaboración de un nanoreservorio a partir de hidroxiapatita y el extracto de *Haematoxylum brasiletto* (Palo del Brasil) para evaluar su efecto cicatrizante en modelo animal.

Se obtuvo el extracto acuoso y alcohólico del duramen (parte central, más seca y compacta del tronco); y el extracto alcohólico de la corteza de *Haematoxylum brasiletto*; se les realizaron pruebas fitoquímicas y fueron caracterizados por técnicas espectroscópicas: UV-visible y FT-IR. Se determinó que los extractos presentan taninos y flavonoides como metabolitos secundarios, los cuales favorecen el proceso de cicatrización. Además, se ha reportado que los extractos tienen actividad antimicrobiana, por lo que se llevó a cabo una evaluación contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Por otra parte la hidroxiapatita (HA) es un mineral que se usa en aplicaciones médicas porque se parece a la apatita ósea, exhibe una buena biocompatibilidad que no muestra toxicidad en comparación con otras nanoarquitecturas.

La evaluación de la actividad cicatrizante se efectuó con cuatro ratas macho de la cepa Long Evans, realizando tres heridas circulares tipo "ponch quirúrgico" que se extendieron a través del panículo carnoso en la región interescapular, con un diámetro de 1 cm y una profundidad de 2.0 mm; la primera herida actuó como control para valorar el proceso de cicatrización en cada animal, en las heridas restantes, las ratas 1 y 2 recibieron hidroxiapatita y extracto etanólico, mientras que las ratas 3 y 4 fueron administradas con el nanoreservorio y extracto acuoso. Todos los tratamientos fueron aplicados vía tópica sobre la herida generada.

La efectividad de los tratamientos se evaluó por medio del porcentaje de retracción de la herida, el extracto acuoso presentó un porcentaje igual al 77% y 100% a los días 12 y 15 respectivamente; mientras que el nanoreservorio 74 y 100 %, concluyendo que ambos tratamientos son efectivos para la cicatrización, en comparación con hidroxiapatita y extracto etanólico del duramen de *Haematoxylum brasiletto*.

## II. INTRODUCCIÓN

### 2.1 PIEL

La piel cubre toda la superficie corporal lo que la hace el órgano más importante tanto en superficie como en peso. Representa aproximadamente una séptima parte de nuestro peso corporal: dependiendo de la altura y masa corporal, puede pesar entre 3.5 Kg. a 10 Kg. Tiene una superficie de 1.5 m<sup>2</sup> a 2 m<sup>2</sup>. Dependiendo de la zona del cuerpo, su espesor varía entre 0.5 mm en los párpados hasta 4 mm en el talón. Sin embargo, en gran parte del cuerpo mide 1 mm a 2 mm.

#### 2.1.1 FUNCIONES

La piel tiene muchas funciones diferentes. Es una cubierta exterior que actúa como barrera, protegiendo al cuerpo factores perjudiciales como la humedad, los rayos solares, así como microorganismos y sustancias tóxicas. También juega un papel importante en la regulación de la temperatura corporal. Ayuda a prevenir la deshidratación. Y le permite al cuerpo sentir sensaciones tales como calor, frío, presión, picazón y dolor.

La piel también funciona como un gran almacén para el cuerpo: la capa más profunda de la piel puede almacenar agua, grasa y productos metabólicos. Y produce hormonas que son importantes para todo el cuerpo [1-2].

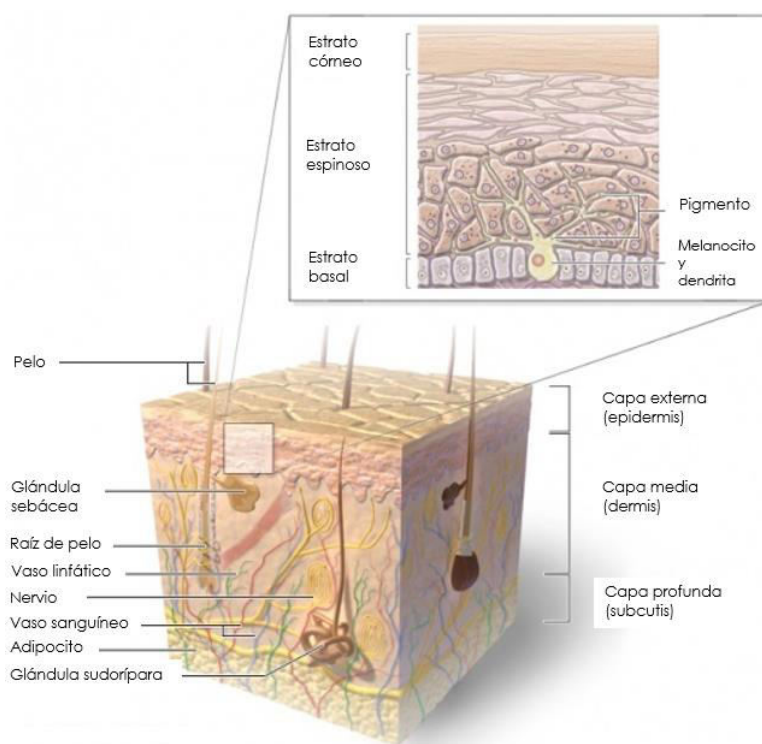


Figura 1. Estructura de la piel

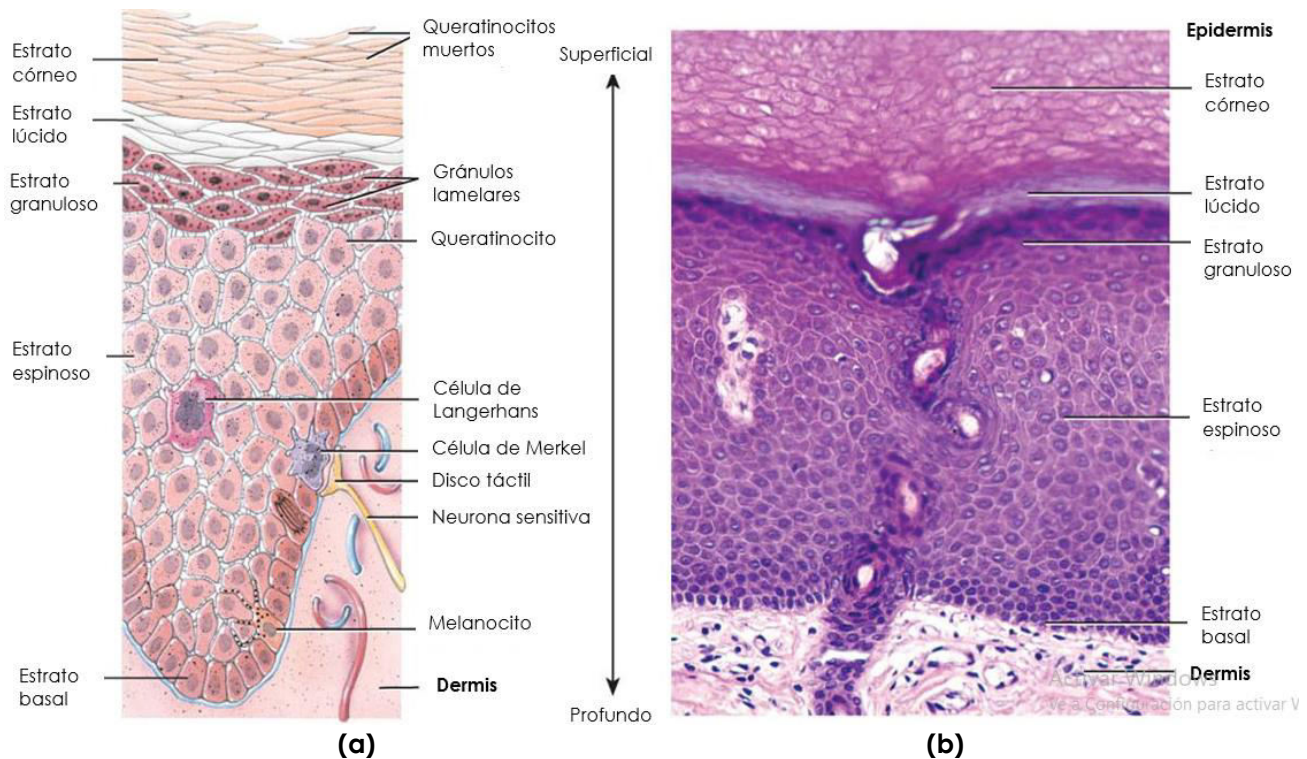
## 2.1.2 ESTRUCTURA

La piel consta de tres capas diferentes (Figura 1): la capa externa (epidermis), la capa intermedia (dermis) y la capa profunda (subcutis).

### 2.1.2.1 Capa externa (epidermis)

Es la porción más fina y se compone principalmente de células muertas, denominadas queratinocitos, las cuales están firmemente unidas y distribuidas en capas o estratos en distintos estadios de desarrollo (Figura 2), su función principal es producir queratina [1]. La queratina es una proteína que protege a la piel y los tejidos subyacentes del calor, microorganismos y agentes químicos. [3]

Dependiendo de dónde se encuentre en el cuerpo, la epidermis varía en grosor. En casi todo el cuerpo tiene cuatro capas o estratos: basal, espinoso, granuloso y un estrato corneo fino, esta es la llamada piel delgada. Donde la fricción es mayor, como en las palmas de las manos y plantas de los pies, la epidermis tiene 5 estratos: basal, espinoso, granuloso, estrato lúcido y una capa cornea gruesa. Esta es la llamada piel gruesa. [4]



**Figura 2.** Capas o estratos de la epidermis. (a) Cuatro tipos principales de células epidérmicas; (b) Microfotografía de una porción de la piel

- 1. Estrato basal o germinativo.** Es la capa más profunda de la epidermis, compuesta por una sola hilera de queratinocitos que contienen tonofilamentos dispersos. Algunas células de esta capa son células madre

que entran en división celular para producir nuevos queratinocitos en forma continua.

2. **Estrato espinoso.** Por encima del estrato basal está el estrato espinoso, donde se encuentran de 8 a 10 capas de queratinocitos, dispuestos en estrecha proximidad. Esta disposición aporta fuerza y flexibilidad a la piel.
3. **Estrato granuloso.** El cual consta de 3 a 5 capas de queratinocitos aplanados que sufren apoptosis. Una característica distintiva de las células de esta capa es la presencia de una proteína llamada queratohialina, que convierte los tonos filamentos en queratina; y gránulos lamelares, que liberan una secreción rica en lípidos que repele el agua.
4. **Estrato lúcido.** (*Lucidus*, claro). Presente solo en la piel gruesa. Contiene de 3 a 5 capas de queratinocitos muertos, transparentes y aplanados, con grandes cantidades de queratina y membranas plasmáticas engrosadas.
5. **Estrato córneo.** (*Corneus*, en forma de cuerno) constituido por 25-30 capas de queratinocitos muertos aplanados. Estas células se descaman continuamente y son reemplazadas por las células de los estratos más profundos. Sus múltiples capas de células muertas ayudan a proteger a las capas más profundas de las lesiones y de la invasión microbiana [2-5].

La epidermis también contiene otros tipos de células con funciones especiales:

- ❖ **Melanocitos** (*mélanos*, negro). Los cuales producen y almacenan melanina. La melanina es un pigmento de color amarillo-rojizo o pardo-negruzco que le otorga color a la piel y absorbe los rayos ultravioleta nocivos. Ocupan alrededor del 8% de las células epidérmicas.
- ❖ **Linfocitos y células de Langerhans** las cuales derivan de la médula ósea y migran a la epidermis. Participan en la respuesta inmunitaria desencadenada contra los microorganismos que invaden la piel y son muy sensibles a la luz UV.
- ❖ **Células de Merkel**, son células nerviosas especiales en la piel que permiten sentir la presión, son las menos numerosas y se encuentran localizadas en la capa más profunda de la epidermis [1-4].

### 2.1.2.2 Capa media (dermis)

Está constituida principalmente por tejido conectivo. Está formada por una densa red de fibras de colágeno elásticas y resistentes. Estos hacen que la piel sea fuerte y robusta, mientras que al mismo tiempo es elástica [1]. Por su estructura tisular, la dermis puede dividirse en región papilar y región reticular.

- ❖ **Región papilar.** consiste en tejido conectivo que contiene fibras elásticas finas. Su superficie se incrementa mucho por pequeñas estructuras llamadas papilas dérmicas, las cuales presentan receptores táctiles llamados corpúsculos del tacto o corpúsculos de Meissner. Representa alrededor de la quinta parte del grosor total de la capa.
- ❖ **Región reticular** (*reticulum*, red pequeña). se compone de tejido conectivo denso irregular, que contiene fibroblastos, haces de colágeno y algunas fibras elásticas dispersas. La combinación de fibras colágenas y elásticas en la región reticular otorga a la piel resistencia, extensibilidad (capacidad de estirarse) y elasticidad (propiedad de volver a la forma original después del estiramiento) [2,3].

### 2.1.2.3 Capa profunda (subcutis)

También conocido como la capa subcutánea o hipodermis) está compuesto principalmente de grasa y tejido conectivo. La grasa actúa como un amortiguador, protegiendo los huesos y las articulaciones de golpes. Sirve también como aislante. Además, muchas hormonas se producen en las células grasas del subcutis [1].

## 2.2 HERIDAS Y CICATRIZACIÓN

### 2.2.1 HERIDA

El término “herida” hace referencia a la interrupción de estructuras anatómicas y funciones fisiológicas, a consecuencia de una lesión que involucra la pérdida de continuidad de un tejido o la separación de la piel, fascia, músculo, hueso, tendones, vasos sanguíneos o parénquima de órganos [6-8].

Estas se pueden clasificar en base a la velocidad y eficacia de la reparación en: heridas agudas y crónicas.

- Herida aguda: aquella que es causada generalmente por un traumatismo o por una intervención quirúrgica. Sigue un proceso de cicatrización ordenado, con restablecimiento anatómico y funcional. Se caracteriza por ser de corta duración, no tener patología subyacente que modifique o altere su cicatrización [9].
- Herida crónica: ocurre cuando el organismo no consigue cerrar la herida. Por lo general la curación excede las 12 semanas y no logra restaurar la integridad anatómica y funcional [7]. Algunos de los motivos por los que una herida se vuelve crónica son la presencia de microorganismos en la herida que provocan infecciones persistentes o recurrentes, el exceso de exudado y la condición de salud de la persona (edad avanzada, diabetes, problemas en la circulación, cáncer, etc.). Ejemplos de heridas crónicas son las úlceras de pie diabético y las lesiones por presión [9].

Y dependiendo de la profundidad de la herida se pueden identificar dos tipos: heridas epidérmicas y heridas profundas.

- Heridas epidérmicas, cuando el daño es solo superficial y la reparación se lleva a cabo en un periodo corto de tiempo, casi siempre sin la formación de tejido cicatrizal.
- Heridas profundas. cuando la lesión se extiende hasta la dermis y el tejido subcutáneo. El proceso de curación es más complejo. Además, como se forma tejido cicatrizal, el tejido curado pierde algunas de sus funciones normales [10].

## 2.2.2 CICATRIZACIÓN

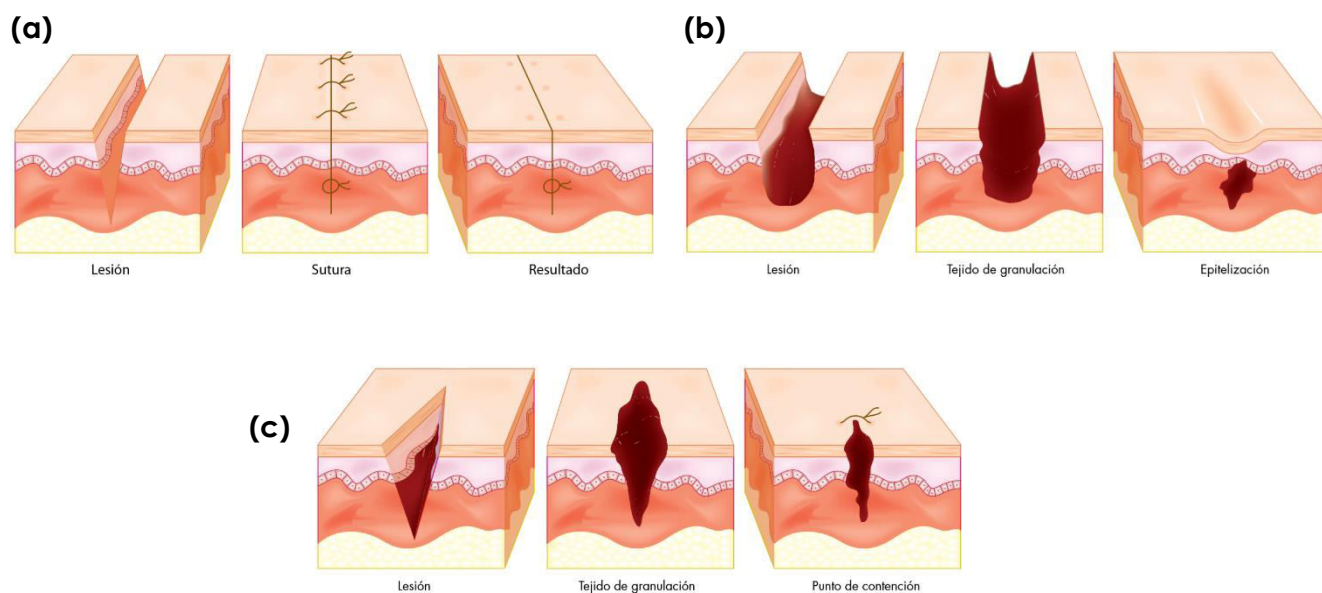
Una vez producida la herida, comienza el proceso de cicatrización que es un proceso dinámico de reparación mediado por proteínas solubles (citocinas y factores de crecimiento) y células encargadas de la proliferación celular para el restablecimiento del tejido lesionado [7,11].

### 2.2.2.1 TIPOS DE CICATRIZACIÓN

Existen tres tipos de cicatrización: de primera, segunda y tercera intención. La cicatrización de primera intención (Figura 3a), ocurre durante las primeras 12 horas a 24 horas después de haber sido cerrada la herida al aproximar los bordes de ésta con suturas, cintas, o algún dispositivo mecánico, sin pérdida de tejidos, lo que conduce a una rápida curación.

La cicatrización de segunda intención (Figura 3b), se caracteriza por la pérdida de tejido y bordes separados, lo que deriva en una herida abierta, no se alcanza a regenerar la arquitectura normal de la piel. El tiempo de resolución dependerá de la extensión de la herida.

La cicatrización por tercera intención (Figura 3c) se presenta cuando existen las condiciones de segunda intención con la diferencia que un cirujano manipula el proceso para ocluir la zona mediante el uso de puntos de contención o injertos, con la finalidad de redireccionar el proceso de cicatrización a una cicatrización primaria [12,13].



**Figura 3.** Tipos de cicatrización. (a) Cicatrización de primera intención; (b) cicatrización de segunda intención y (c) cicatrización por tercera intención

### **2.2.2.2 FASES DE LA CICATRIZACIÓN**

La cicatrización se divide en tres fases: inflamatoria, proliferativa y de remodelación (Figura 4). Esta serie de procesos ocurre de manera simultánea, sin límites estrictos, ya que el cierre de la herida dependerá de la zona afectada y el tipo de herida.

#### **1. Fase inflamatoria**

Es inmediata a la lesión, dura alrededor de tres días a 10 días, consiste en la agregación de productos sanguíneos y citoquinas que favorecen la hemostasia y el aislamiento de los irritantes tisulares, lo que permite la reparación celular y modifica la respuesta microcirculatoria, por lo que su función es hemostática, así como la limpieza de la herida. Se divide, a su vez, en tres etapas: hemostática, vascular y celular:

- a.** Hemostática. Es inmediata al daño del tejido y consiste en una vasoconstricción que dura de 5 minutos a 10 minutos, se desencadena la agregación de las plaquetas y la cascada de la coagulación.
- b.** Vascular. Inicia minutos después de la lesión con contracción y trombosis de los vasos para controlar la hemorragia, lo que aumenta la permeabilidad vascular con extravasación de líquido y proteínas plasmáticas al espacio extravascular.
- c.** Celular. Inicia de 1 hora a 2 horas después de la lesión, los polimorfonucleares migran hacia los tejidos dañados donde fagocitan bacterias y tejido desvitalizado, al tiempo que amplifican la respuesta inflamatoria mediante la secreción de sustancias quimiotácticas que atraen monocitos, que al arribar a la herida, se activan y se convierten en macrófagos, los cuales continúan destruyendo bacterias y, en conjunto con los linfocitos, células plasmáticas y mastocitos, secretan citoquinas y factores de crecimiento indispensables para modular el proceso de cicatrización[12,14,15].

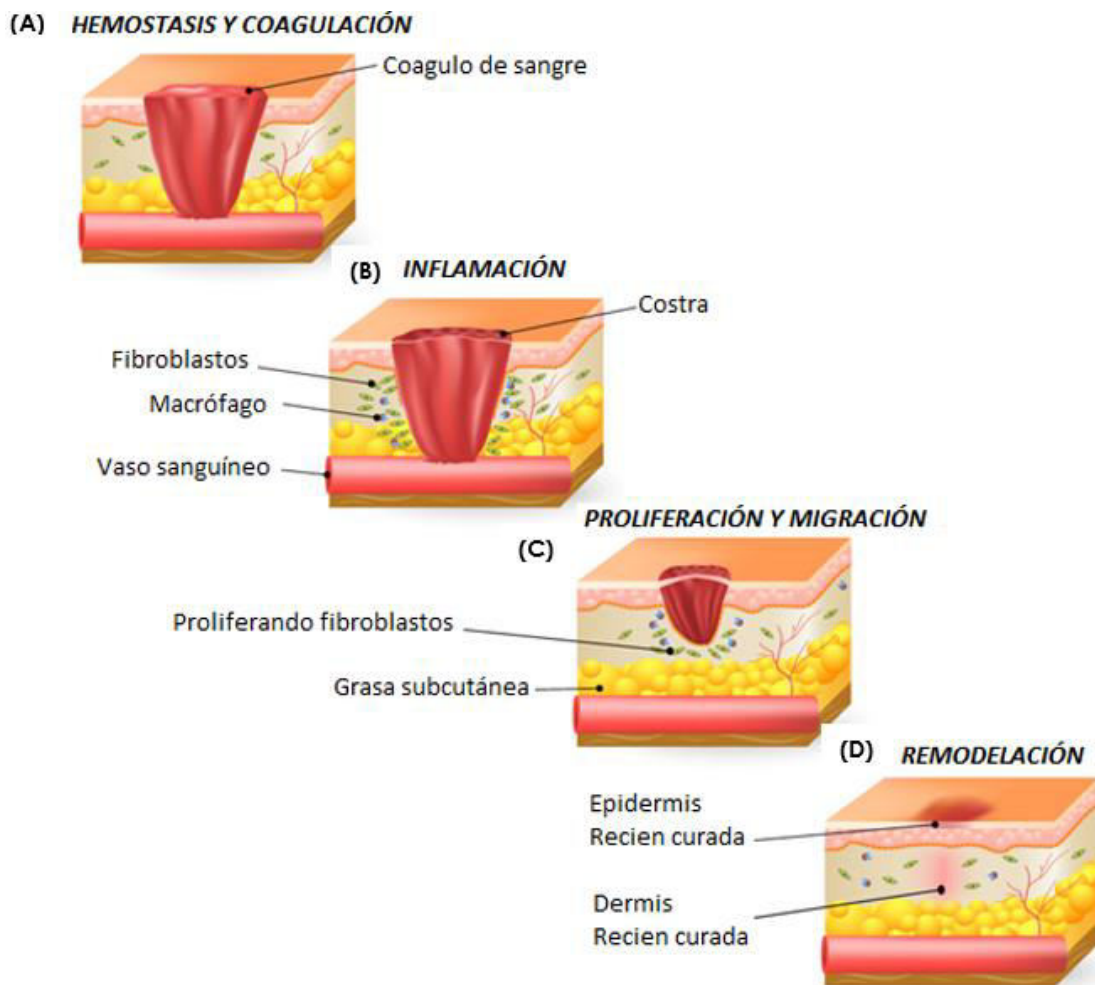
#### **2. Fase proliferativa**

La segunda fase se inicia una vez lograda la hemostasia y establecida la respuesta inmune inicial. Se extiende desde el tercer día y se puede prolongar hasta por dos semanas. Se caracteriza por la migración de fibroblastos y la producción de una nueva matriz extracelular a partir de fibrina y fibronectina. Durante esta fase se forman nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) que junto

con los fibroblastos y macrófagos reemplazan la matriz de fibrina con tejido de granulación. En esta fase los fibroblastos sintetizan colágeno, aportando así un componente fundamental para la resistencia del tejido neoformado [6,14,15].

### 3. Fase de remodelación

La remodelación es un proceso dinámico de maduración de la cicatriz que puede durar meses o años. Durante la remodelación, la fuerza tensional aumenta a pesar de la disminución de la cantidad de colágeno; este fenómeno es debido a la modificación estructural del colágeno depositado, al aumento en el diámetro de las fibras y, a medida que avanza la remodelación, las uniones se hacen más complejas creando moléculas con más fuerza y estabilidad [12].



**Figura 4.** Fases de la Cicatrización. A) Respuesta inmediata; B) Fase inflamatoria; C) Fase proliferativa D) Fase de remodelación.

El proceso de formación de tejido cicatrizal se denomina fibrosis. El tejido de cicatrización difiere de la piel normal en que las fibras colágenas están organizadas más densamente, su elasticidad es menor, tiene menos vasos sanguíneos, y ante una alteración grave, casi nunca se restablecen los folículos pilosos, ni las glándulas sebáceas o sudoríparas, los miocitos y los nervios, y además quedan reemplazados por tejido fibroso [2,3,16].

Cuando este proceso, se ve interrumpido por alguna causa, se produce una falla en la cicatrización, lo cual puede generar algún tipo de cicatrización patológica.

### **2.2.2.3 CICATRIZACIÓN PATOLÓGICA**

Las cicatrices patológicas pueden ser consecuencia de un retraso (heridas crónicas) o de un exceso (cicatriz hipertrófica, queloide) en el proceso.

#### **A. Retraso de la cicatrización**

Existen diversos factores que retardan la cicatrización, como son: la técnica de sutura, la edad avanzada, malnutrición, el consumo de nicotina o alcoholismo crónico, enfermedades sistémicas (diabetes mellitus, vasculopatía periférica, etcétera), la administración de ciertos fármacos, la radioterapia, las hemorragias o las infecciones de las heridas (más de 100 000 bacterias por gramo de tejido)[17].

#### **B. Cicatrización excesiva:**

En algunas ocasiones se forma tanto tejido cicatrizal que ello da lugar a una cicatriz sobre elevada. Si esta cicatriz se mantiene dentro de los límites de la herida original, se trata de una cicatriz hipertrófica. Si extiende más allá de los límites hacia el tejido normal circundante, se constituye un queloide, generalmente estos se producen en heridas quirúrgicas, traumatismos, quemaduras o simples reacciones inflamatorias (foliculitis del acné)[12,14, 18,19].

## 2.3 *Haematoxylum brasiletto*

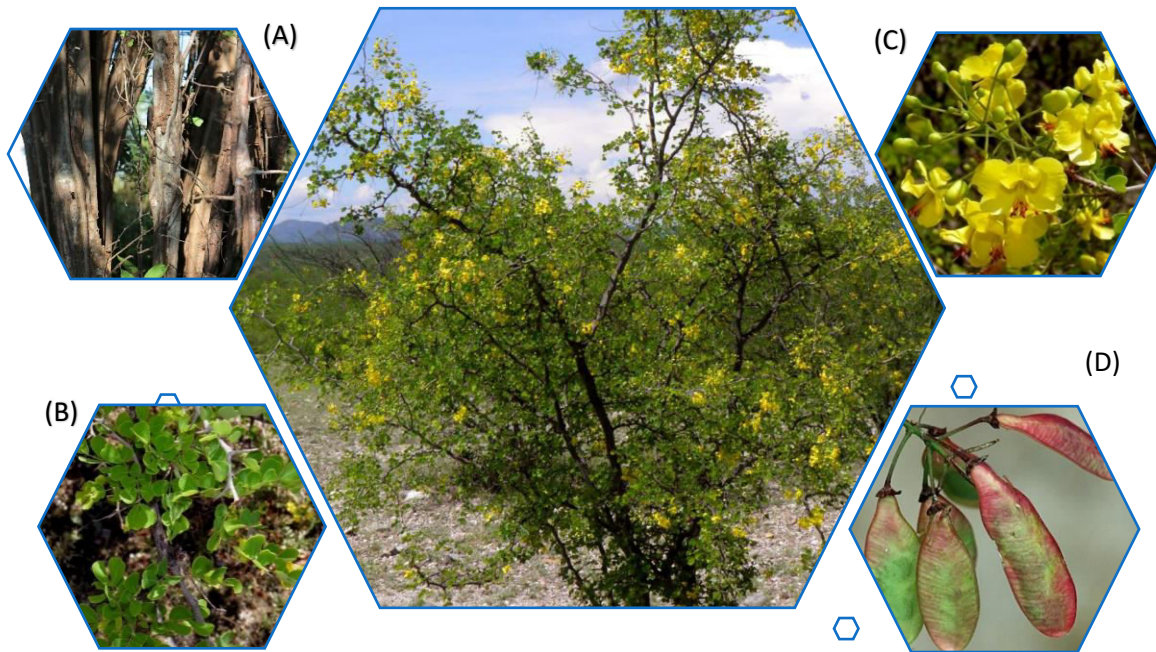
*Haematoxylum brasiletto* pertenece a la familia Leguminosae. Es un árbol nativo de América Central, comúnmente conocido como "Palo de Brasil", palo de tinta, Brasil, palo tinto, azulillo, brasileto o Campeche [20-21].

### 2.3.1 Etimología

Su nombre deriva de las palabras griegas *hemato* = "sangre", y *xylum* = "madera", en referencia a la resina que produce la especie; y *brasiletto*, epíteto geográfico que alude a su localización en Brasil [20-22].

### 2.3.2 Botánica

Es un árbol espinoso de 3 m a 10 m de alto con el tronco acanalado (Figura 5A). Crece en las selvas bajas caducifolias y bosques deciduos [23-24]. Las ramas presentan espinas duras de 1 cm a 3 cm de largo. El color de la corteza va de café claro a rojiza y el centro del tallo es café oscuro a rojo intenso. Las hojas, dispuestas como moños (opuestas) están divididas en seis hojuelas (Figura 5B). Tiene racimos de flores amarillas, muy vistosas, ligeramente desiguales en tamaño (Figura 5C). Los frutos son legumbres aplanadas más largas que anchas y no abren al madurar (Figura 5D) [21-24].



**Figura 5.** *Haematoxylum brasiletto*. (A) Tronco; (B) hojas; (C) flores y (D) fruto

### 2.3.3 Sustancias inorgánicas

Se han realizado estudios para identificar las sustancias inorgánicas presentes en la corteza, la albura y el duramen. Los resultados arrojan que el mayor porcentaje (18.20%) corresponde a la corteza, seguido de albura (4.31%) y duramen (2.88%). En la tabla 1 se observa que calcio, potasio y magnesio son los principales elementos presentes en la madera; mientras que el calcio y el potasio lo son en la corteza [21, 25, 26].

**Tabla 1. Porcentaje de sustancias inorgánicas en la madera y corteza de *H. brasiletto***

| Elemento | Duramen | Albura  | Corteza |
|----------|---------|---------|---------|
| Magnesio | 3.26 %  | 3.76 %  | 1.18 %  |
| Fósforo  | Nd      | 3.71 %  | 1.83 %  |
| Potasio  | 2.09 %  | 11.26 % | 10.36 % |
| Calcio   | 94.65 % | 81.28 % | 85.03 % |

Nd= no detectado

### 2.3.4 Actividad antimicrobiana

Es conocido que los extraíbles del duramen y la corteza pueden presentar alta resistencia al biodeterioro; a este respecto se ha encontrado que el extracto acuoso del duramen actúa como un antibiótico efectivo [23]; mientras que el extracto alcohólico de la corteza es inhibidor de bacterias y levaduras ya que en él se ha identificado hematoxilina, brasilina y ácido gálico como los mayores inhibidores de estos agentes biológicos [21,23,27].

El efecto antimicrobiano de *H. brasiletto* ha sido probado contra bacterias como *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus*; dando mejores resultados contra este último [28-30].

En estudios más recientes, se descubrió que el extracto alcohólico de la corteza inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* O157: H7 (EHEC), la producción de verotoxinas y la adhesión de *E. coli* O157: H7 a las células HeLa, ya que tiene actividad antiproliferativa contra líneas celulares cancerígenas SiHa, MDA, A549 y H1299 [20, 29,30].

### 2.3.5 USOS

El duramen de esta especie se utiliza en la medicina tradicional para tratar trastornos renales, problemas cardiacos (hipertensión) y digestivos (úlceras gástricas), fiebre, infecciones bucales, diarrea, infecciones de membranas mucosas, heridas o hemorragias y cáncer [21, 28,31].

### 2.3.6 METABOLITOS SECUNDARIOS

Las sustancias que las plantas elaboran y acumulan en sus tejidos son importantes desde el punto de vista farmacéutico, porque muchos poseen propiedades farmacológicas y pueden usarse con fines terapéuticos:

- ♣ Los principios del metabolismo primario (metabolitos primarios) se encuentran en todas las plantas y desempeñan funciones vitales para el desarrollo del vegetal, como la obtención de energía, la morfogénesis o la reproducción.
  
- ♣ A los principios del metabolismo secundario (metabolitos secundarios) se les considera como no esenciales para la vida, aunque pueden ser fundamentales para que pueda operar una determinada función biológica. Son, sin duda alguna, los compuestos de mayor interés farmacológico, los que van a constituir los llamados "principios activos" de la droga. *Haematoxylum brasiletto*, ha reportado una alta concentración de taninos y flavonoides.

#### 2.3.6.1 TANINOS

Los taninos son compuestos fenólicos hidrosolubles, de masa molar comprendida entre 500 y 3000 g/mol, que presentan la propiedad de precipitar los alcaloides, la gelatina y otras proteínas. El tipo y el contenido de tanino varía, por factores diversos como la madurez, especie, condiciones del árbol y localización, así como la parte del árbol que se analice [32-34].

##### 2.3.6.1.1 Clasificación

Se distinguen dos grupos de taninos diferentes por su estructura y por su origen biosintético: taninos hidrolizables y taninos condensados.

- A. Los taninos hidrolizables son poliésteres de un azúcar y un número variable de ácidos fenólicos. Según la naturaleza del ácido unido al azúcar se han distinguido dos tipos de taninos hidrolizables: taninos gálicos, cuando el ácido fenólico es el ácido gálico y los llamados taninos elágicos, cuando el ácido fenólico es el hexahidroxidifenico (HHDP) y sus derivados de oxidación.
  
- B. Los taninos condensados o proantocianidinas son oligómeros y polímeros flavánicos. Se diferencian de los taninos hidrolizables en que sus moléculas son más resistentes a la ruptura, carecen de osas y su estructura está relacionada con los flavonoides [32].

### 2.3.6.1.2 Propiedades biológicas y farmacológicas

Son conocidos por sus propiedades curtientes y astringentes, por lo que se han utilizado tradicionalmente en la industria del cuero y en terapéutica como cicatrizantes en uso externo y antidiarreicos en uso interno.

Su propiedad cicatrizante está ligada, a su capacidad para unirse a las proteínas de la piel y de las mucosas, previendo una especie de curtido que hace que las capas superficiales sean menos permeables y protejan a las capas subyacentes. Esta unión se establece por medio de interacciones hidrófobas y puentes de hidrógeno entre los grupos fenólicos de los taninos y las macromoléculas. Además, intervienen enlaces covalentes para asegurar la estabilidad de la unión a los largo del tiempo. Esto requiere que el tanino posea una masa molecular entre límites bien definidos (500-3000 g/mol), no demasiado elevada para que pueda intercalarse entre los espacios interfibrilares, ni demasiado pequeña, pues en ese caso no formaría un número suficiente de enlaces como para asegurar la estabilidad de la unión en el tiempo.

- ✓ Poseen también propiedades vasoconstrictoras por lo que se utilizan tanto interna como tópicamente en el tratamiento de afecciones vasculares como várices o hemorroides y en pequeñas heridas.
- ✓ Presentan también los taninos propiedades antioxidantes comportándose como captadores de radicales libres.
- ✓ Por sus propiedades astringentes se pueden utilizar en cosmetología en la preparación de lociones y tónicos.
- ✓ En uso interno son antidiarreicos y, además de disminuir el peristaltismo, tienen acción antiséptica ya que precipitan los enzimas extracelulares secretados por los microorganismos causantes de las infecciones; esta acción se ejerce también en uso externo, por lo que son útiles en el tratamiento de dermatosis.
- ✓ También se han utilizado como contraveneno de metales pesados y de alcaloides debido a su propiedad de formar complejos con los mismos.
- ✓ Y actúan como inhibidores enzimáticos al precipitar la fracción proteica de los enzimas; esto permite en ocasiones la buena conservación de otros principios activos en las drogas [32, 35-36].

### 2.3.6.2 FLAVONOIDES

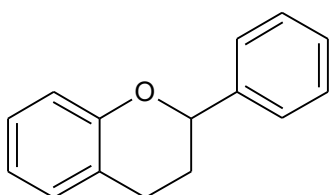
Estos compuestos, intervienen en los vegetales en la formación de pigmentos, en la protección frente a la radiación ultravioleta y en la defensa durante la interacción planta-patógeno.

Están ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal constituyendo la mayoría de los pigmentos amarillos (flavonas, flavonoles, chalconas, auronas), rojos y azules (antocianos). Se encuentran sobre todo en hojas y flores, donde se acumulan, a altas concentraciones.

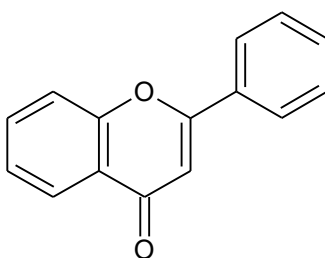
#### 2.3.6.2.1 Clasificación

Se clasifican en base a sus variaciones estructurales:

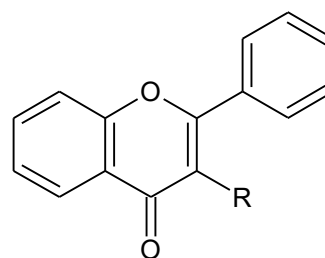
1. Con doble enlace entre las posiciones 2 y 3
  - flavonas: con H en la posición 3
  - flavonoles : con OH<sup>-</sup> en la posición 3
2. Con doble enlace entre las posiciones 2 y 3
  - flavanonas: con H en la posición 3
  - flavanololes con OH<sup>-</sup> en la posición 3
3. Chalconas. Con el anillo C abierto
4. Isoflavonoides con el anillo B en la posición 3



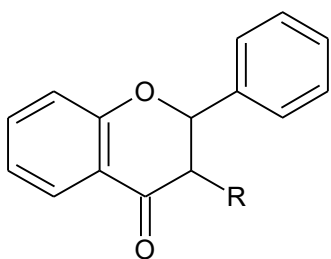
Flavano



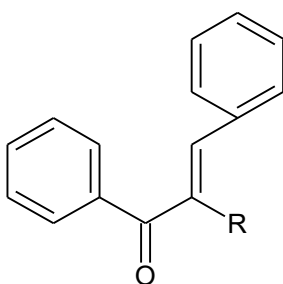
2-Fenil-y-cromona



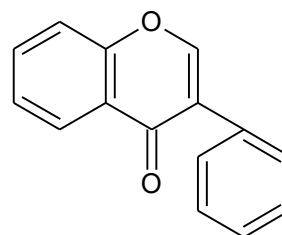
Flavona R=H  
Flavonol R=OH



Flavanona R=H  
Flavanonol R=OH



Chalcona



Isoflavonoides

**Figura 6.** Principales grupos estructurales de flavonoides

### 2.3.6.2.2 Interés farmacognóstico

A nivel vascular, los flavonoides muestran actividad sobre la pared de los capilares, disminuyendo su permeabilidad y aumentando su resistencia. La acción antiinflamatoria que poseen muchos flavonoides se relaciona en parte con su interacción con diversas enzimas implicadas en el metabolismo del ácido araquidónico. Otros mecanismos implicados en la acción antiinflamatoria son:

- ✓ Inhibición de la liberación de histamina
- ✓ Inhibición de la migración celular (en el proceso inflamatorio los leucocitos se dirigen por quimio tactismo hacia el foco inflamatorio, donde son activados liberando otros agentes pro inflamatorios)
- ✓ Acción antioxidante (actuando frente a los radicales libres que originan en la inflamación )
- ✓ Efecto protector vascular (contribuye a disminuir la exudación)

Muchos flavonoides muestran actividad frente a la úlcera péptica, reduciendo el índice de ulceración y la intensidad del daño mucosal. Este efecto puede ser mediado por distintos mecanismos:

#### A. Gastroprotector:

- ✓ Incrementando la cantidad del mucus gástrico
- ✓ La acción vasoprotectora de los flavonoides implica una mejora en la microcirculación, lo que favorece el proceso de cicatrización y la neoformación de vasos

#### B. Antisecretor

- ✓ Disminuyendo el volumen de jugo gástrico o su acidez
- ✓ Por disminución de la secreción de pepsina

La mayoría de los flavonoides se comportan in vitro como inhibidores enzimáticos, lo que explica el mecanismo de acción de varios de sus efectos farmacológicos. Otras muchas propiedades son atribuidas a los flavonoides: antialérgica, antimicrobiana, antivírica, antiagregante plaquetaria, diurética, antihepatotóxica, espasmo lítica, antihipercolestelemica [32,36].

## 2.4 APATITA

Este compuesto pertenece a la familia de las apatitas cuya fórmula general es:  $M_{10}(TO_4)_6N_2$ .

Donde

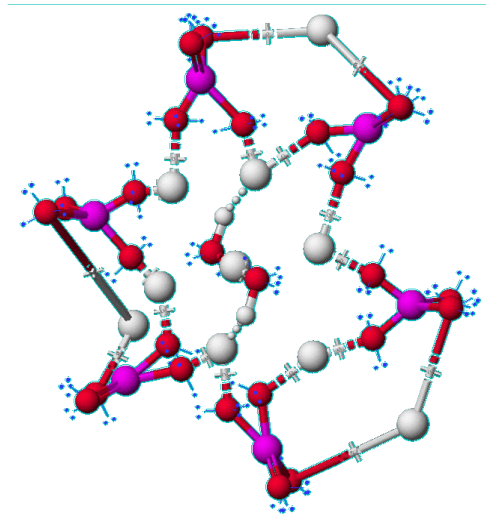
- M representa un catión divalente o trivalente; con número de coordinación 7, 8 o 9
- T es un catión con número de coordinación 4 y presenta una geometría tetraédrica; la combinación  $TO_4^+$  forma un radical negativo.
- N simboliza un anión con número de coordinación 3. El anión es el que produce cambios más significativos, tanto en la estructura cristalina como en sus propiedades, además identifica el tipo de apatita: si es  $OH^-$  resulta ser hidroxiapatita; si es F<sup>-</sup>, fluorapatita [37-39].

### 2.4.1 HIDROXIAPATITA

La hidroxiapatita [ $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , peso molecular 1004.63 g/mol] es un mineral con una composición química muy similar a la del hueso humano y esmalte de los dientes, esta similitud favorece la formación de enlaces con el hueso, siendo por consiguiente un material biocompatible, bioactivo y bioabsorbible [37, 40-42].

#### 2.4.1.1 COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA QUÍMICA

Su composición química se determina a partir de la relación molar calcio: fósforo que puede ser de 1.667 en el compuesto estequiométrico pero resulta ser de 1.63 en el esmalte dental [37, 38, 43,44]. Este fosfato tiene una estructura porosa que cristaliza en el sistema hexagonal (Figura 7).



**Figura 7.** Estructura química y densidad electrónica de la molécula de hidroxiapatita

El carácter iónico (Ca-O) de la HA la hace una cerámica muy dura, idónea para implantes ortopédicos; refractaria, con un punto de fusión mayor a 1500°C. Su densidad calculada es de 3.219 g/cm<sup>3</sup> y sus propiedades varían de acuerdo con el proceso de síntesis [42,45].

#### **2.4.1.2 USOS**

En el área médica se utiliza como recubrimiento de implantes, debido a su biocompatibilidad y biactividad [46,47], ya que proporciona una superficie ósteoconductiva para el crecimiento de hueso nuevo [48]. También se emplea como relleno de cavidades en odontología, y como vehículo liberador de fármacos [40,45].

En áreas tecnológicas, se utiliza como soporte de catalizadores [49-51], como intercambiadores iónicos, como sensores o como biocerámicas, entre otras [37].

#### **2.4.1.3 MÉTODOS DE SÍNTESIS**

Los métodos más comunes para producir HA sintética incluyen: la precipitación [52,53], hidrotermal [54], hidrólisis [55], mecanoquímica [56] y sol-gel [57].

Estas técnicas generan cristales de HA que van del tamaño nano a micrométrico [58,59].

Las características del producto obtenido son altamente influenciadas por las variables de síntesis. Particularmente en los métodos de precipitación, son variables importantes la relación Ca/P utilizada, los reactivos, la temperatura de síntesis, el método de agitación, el pH de la mezcla de reacción, la concentración y velocidad de agregado de los reactivos, y el tiempo de secado del precipitado [60-63].

El comportamiento biológico (bioactividad) de la cerámica, en términos de áreas de contacto y degradación mejoradas [64], va a depender de la composición química, tamaño de poro, cristalinidad y la nanoestructura [65].

## 2.5 NANOTECNOLOGÍA

La nanotecnología comprende la creación, manipulación y utilización de materiales en escala nanométrica ( $10^{-9}$  m) y su aplicación en diversos campos como la química, la biología, la física, la ingeniería y en especial la medicina.

Uno de sus objetivos es el diseño de nanodispositivos de alto rendimiento y miniaturización de dispositivos electrónicos. Las nanopartículas inorgánicas son atractivas como piezas de construcción para tales propósitos, debido a sus propiedades ópticas, electrónicas y catalíticas, muchas de las cuales pueden ser controladas modificando su tamaño y forma, sin cambiar la composición del material.

### 2.5.1 Aplicaciones de las nanopartículas

Entre las aplicaciones más usuales de las nanopartículas se encuentran: electrodos (baterías/celdas de combustible), catalizadores, sensores, celdas solares y administración de fármacos. Sin embargo, la estabilización de las nanopartículas en el medio dispersante es esencial para prevenir la aglomeración. Varios agentes estabilizadores tales como agar, ciclodextrina, polivinilpirrolidona (PVP) y acetato de celulosa han sido probados con éxito.

Existen diversos métodos físicos y químicos para la síntesis de nano partículas, sin embargo en la actualidad uno de los más utilizados es el método sol-gel, ya que permite la obtención de nanopartículas de tamaño y morfología homogéneos.

### 2.5.2 Método sol-gel

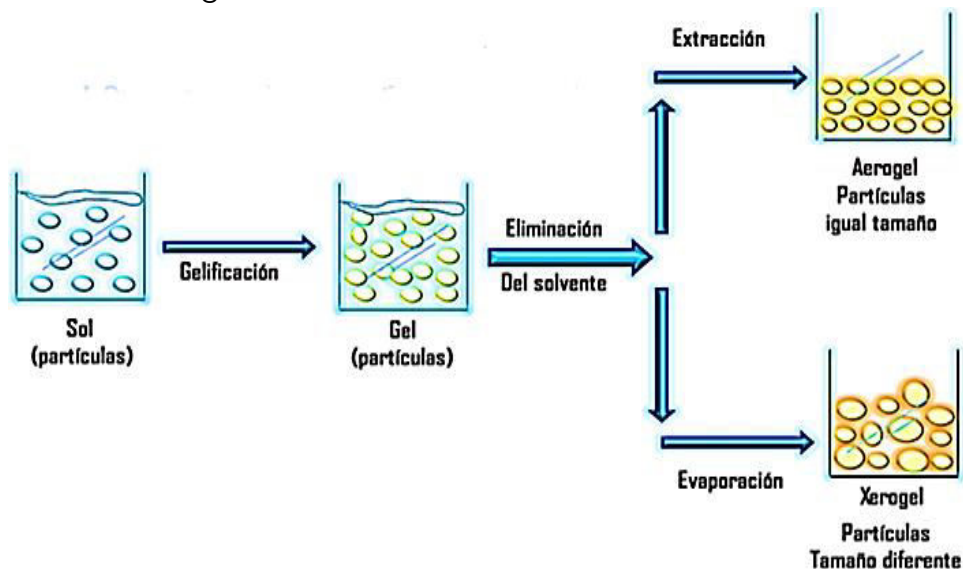
El método sol-gel permite la fabricación de materiales cristalinos de tamaño nanométrico (Figura 8). Consiste en la preparación de un sol, la gelación del mismo y la remoción del disolvente para formar el sólido.

- Un sol es una dispersión de partículas coloidales en fase líquida que son suficientemente pequeñas para permanecer suspendidas
- Un gel es un sólido compuesto por dos fases: una fase sólida que forma una red que atrapa e inmoviliza a una fase líquida.

En el proceso sol-gel los precursores pueden ser alcóxidos metálicos, soluciones salinas metálicas o complejos metálicos. Los precursores más utilizados son los alcóxidos metálicos, ya que estos reaccionan con agua a través de las reacciones de hidrólisis y condensación (que es prácticamente una polimerización) hasta producir un óxido metálico amorfo, el alcohol producido durante la reacción de hidrólisis se puede eliminar de los poros de la red.

La remoción del disolvente, tiene efectos dramáticos en las propiedades del producto final. Si se remueve mediante un tratamiento térmico convencional, el

resultado es un xerogel; sin embargo, si se remueve a presión reducida, el resultado es un aerogel.



**Figura 8.** Esquematación del método sol-gel

Los aerogeles tienen baja densidad y son buenos aislantes térmicos y acústicos. Por otra parte, los xerogeles son más densos, tienen un área superficial grande y son a menudo microporosos; estos pueden usarse como soporte de catalizadores, conductor iónico (cuando es dopado apropiadamente), y como precursor para una gran variedad de vidrios, cerámicas, recubrimientos y fibras.

### 2.5.2.1 Ventajas del método sol-gel.

- Mayor homogeneidad y pureza de los materiales.
- Mejor control micro estructural de las partículas.
- Mejor estabilidad térmica de los materiales soportados.
- Distribución de tamaño de poro bien definido.
- Facilidad en la adición de elementos en la red de los materiales.
- Obtención de estructuras inorgánicas generales en la solución.
- Excelente grado de control en la hidroxilación del soporte.

### 2.5.2.2 Desventajas del método sol-gel.

Algunas de las desventajas que se mencionan del método sol-gel son:

- Precio elevado de los precursores (especialmente los alcóxidos).
- Largos procesos de síntesis, dependiendo del proceso de sol-gel.
- Partículas finas residuales que fácilmente pueden entrar por vías respiratorias dañando la salud.
- Tiempo largo de adición de los reactivos en el reflujó.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro de un centro de salud, alrededor del 27% al 50% de las camas están siendo ocupadas por pacientes que presentan heridas. Las intervenciones quirúrgicas, que sin duda mejoran la vida de los pacientes, producen heridas de forma inevitable y estas también son vulnerables a infectarse, en promedio en un 4% de los casos. En México, un día de hospitalización está valuado en \$5684 MXN. Profesionales dedicados al tratamiento y curación de heridas han reportado tiempos de curación muy prolongados, que no solo generan costos excesivos, sino que también incrementan el riesgo de presentar infecciones a nivel sistémico. Los pacientes no pueden ser dados de alta hasta que la herida tenga buen avance en su cicatrización, por lo que cualquier retraso en la misma tiene un impacto significativo en los días de hospitalización y por consiguiente en el costo del tratamiento. El gran problema ha sido, cómo tratarlas para acelerar el proceso de cicatrización, ya que mientras más rápido lo hacen, disminuyen las complicaciones y molestias para el paciente.

Por ejemplo, una úlcera por presión se puede desarrollar en 24 horas, limita la recuperación funcional del paciente, causa serias infecciones y gran dolor. En México, 2.5 millones de pacientes desarrollan estas úlceras, alargando la estancia hospitalaria hasta por 13 días; estudios reportan que los costos del tratamiento oscilan entre los \$20000 y los \$350000.

Las infecciones presentes en las heridas incrementan la cantidad de exudado, causan dolor y pueden resultar en un mayor número de intervenciones quirúrgicas para su desbridamiento o escisión, incrementando significativamente los costos y estancias en las Instituciones de Salud.

## IV. JUSTIFICACIÓN

Debido a los diversos grados de lesión a los que se encuentra expuesta la piel es necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos para la regeneración de la misma, que sean accesibles en cuanto costo y disponibilidad para la población.

A pesar de la hegemonía alopática actual para uso local y sistémico en el tratamiento de heridas, se observa un creciente interés por alternativas naturistas, que promuevan la cicatrización de las lesiones en tiempos menores.

El extracto de la planta *Haematoxylum brasiletto* conocida como Palo del Brasil, ha reportado un efecto cicatrizante debido a su contenido de sustancias polifenólicas conocidas como taninos, los cuales han tenido diversos usos en la elaboración de productos químicos y farmacéuticos. Su utilización puede ser muy amplia en el área biomédica, el extracto acuoso del duramen es reconocido como un antibiótico efectivo y se utiliza para los trastornos renales, problemas cardíacos y digestivos, fiebre, hemorragias e infecciones de membranas mucosas; mientras que el extracto metanólico de la corteza es inhibidor de bacterias y levaduras.

Por otra parte, el desarrollo de nanomateriales con potencial farmacológico ha cobrado un gran interés dentro de la industria farmacéutica; se conoce que la hidroxiapatita es una cerámica biocompatible y bioactiva que constituye el mineral de los huesos, y se ha empleado como vehículo para la administración de fármacos.

Con el objetivo de ampliar las posibilidades de recursos terapéuticos para el tratamiento de heridas, este trabajo propone el desarrollo de nanoreservorios de HA-extracto como una alternativa en el tratamiento de lesiones que permita disminuir el tiempo de cicatrización y el riesgo a presentar infecciones.

## V. HIPÓTESIS

El extracto de *Haematoxylum brasiletto* se encapsula en la matriz del nanoreservorio de hidroxiapatita, potencializando así su efecto cicatrizante.

## VI. OBJETIVOS

### General

Elaborar y caracterizar un nanoreservorio sintetizado a partir de hidroxiapatita y el extracto de *Haematoxylum brasiletto* para evaluar su actividad cicatrizante en un modelo animal.

### Particulares

- a. Obtener el extracto acuoso y etanólico de *Haematoxylum brasiletto* (Hb) y caracterizarlos por técnicas espectroscopias: UV-VIS y FT-IR.
- b. Realizar pruebas antimicrobianas empleando el método de difusión con disco.
- c. Sintetizar hidroxiapatita (HA) por el método de precipitación y caracterizarla por técnicas espectroscópicas: FT-IR, SEM, EDS y DRX.
- d. Obtener la nanomatriz Hb/HA y caracterizarla por espectroscopia de FT-IR, SEM, EDS y DRX.
- e. Evaluar el efecto cicatrizante de los extractos de *Haematoxylum brasiletto*; hidroxiapatita y nanomatriz HA<sub>550</sub>/Hb<sub>85%</sub> en un modelo animal por vía tópica.

## VII. PARTE EXPERIMENTAL

### 7.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

El material vegetal fue comprado en un local de plantas medicinales localizado en el estado de Puebla. Se descartaron los ejemplares que tuvieran signos de infección y se seleccionaron los troncos que presentaran un color similar. Los extractos se obtuvieron en base a la metodología descrita por González-Salvatierra

#### 7.1.1 Extracto alcohólico de corteza

El extracto etanólico de la corteza se obtuvo colocando 100 g de corteza en un vaso de precipitado, con 300 mL de etanol al 96% a temperatura ambiente durante tres días. Posteriormente se evaporó el disolvente a presión reducida en un rotavapor para producir el extracto concentrado (85%).

#### 7.1.2 Extracto alcohólico de duramen

El extracto etanólico del duramen de *H. brasiletto* se obtuvo por infusión con etanol al 96%, colocando 100 g de tronco seco con 300 mL de disolvente, a temperatura ambiente durante 10 días con agitación manual regular dos veces al día. Los extractos se evaporaron a presión reducida en un rotavapor para producir el extracto concentrado (85%).

#### 7.1.3 Extracto acuoso de duramen

Se pesaron 50 g de tronco seco, los cuales se colocaron en un vaso de precipitado con 150 mL de una mezcla de acetona-agua desionizada (60:40 v/v) durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se evaporó el acetona a presión reducida en un rotavapor para producir el extracto acuoso.

Los extractos fueron monitoreados diariamente por espectroscopia UV-Vis, y una vez extraído el disolvente correspondiente se procedió a realizar las pruebas fitoquímicas.

## 7.2 PRUEBAS FITOQUÍMICAS

Cada prueba se realizó por triplicado, con el fin de corroborar los primeros resultados.

### 7.2.1 TANINOS.

A 1 mL del extracto se le adicionan 2 mL de agua destilada y 3 gotas de cloruro de sodio al 2%; calentar a ebullición por un minuto, enfriar y filtrar. Dividir el filtrado en tubos de ensaye:

- 1) Reacción de Cloruro férrico. Se adicionan de 3-5 gotas de cloruro férrico al 5%, si se observa:
  - ♣ coloración naranja se confirma la presencia de compuestos fenólicos.
  - ♣ coloraciones de azul a negro indican la presencia de derivados del ácido gálico
  - ♣ coloraciones verdes de derivados del catecol.
  
- 2) Reacción con gelatina. Adicionar 2 gotas de reactivo de gelatina. La formación de un precipitado blanco indica presencia de taninos.

### 7.2.2 FLAVONOIDES.

Diluir 0.5 mL del extracto en 2 mL de etanol absoluto y dividir en tubos:

- 1) Reacción de Shinoda. Adicionar 5 gotas de ácido clorhídrico concentrado y un trozo de magnesio metálico, se obtiene una coloración anaranjada, roja, roja-azulosa o violeta si están presentes flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantona. Ocasionalmente los flavanoles, las flavanonas y flavononoles dan colores verdes o azules.
  
- 2) Reacción de hidróxido de sodio al 10%. Se adicionan 3-5 gotas de hidróxido de sodio si se forman coloraciones:
  - de amarillo a rojo, indica la presencia de xantonas y flavonas;
  - de café a naranja de flavonoles;
  - de púrpura a rojizo de chalconas
  - azul de antocianinas.

### **7.2.3 QUINONAS.**

Se colocan 2 mL del extracto en una cápsula de porcelana y se concentra a sequedad, posterior a ello se divide el extracto en dos porciones.

1. Reacción de hidróxido de amonio. Se adiciona una gota de hidróxido de amonio concentrado al extracto. Se considera positiva la prueba para antraquinonas al tener la presencia de una coloración rosa-roja que aparece en los dos primeros minutos.
2. Reacción con ácido sulfúrico. Se agrega 1-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La formación de una coloración roja indica la presencia de antraquinonas.

### **7.2.4 ALCALOIDES.**

Se toma una porción del extracto y se adicionan de 2 a 3 mL de ácido clorhídrico al 5%; calentar a ebullición por cinco minutos, dejar enfriar y filtrar. Posteriormente dividir el filtrado en tubos:

1. Ensayo de Mayer. Se añade una gota de reactivo de Mayer. Si se forma un precipitado o turbiedad, se confirma la presencia de alcaloides.
2. Ensayo de *Wagner*. Añadir 5 gotas de reactivo de *Wagner*, si se forma precipitado de color marrón a rojizo es indicativo de la presencia de alcaloides
3. Reacción de *Dragendorff*. Agregar 2 gotas de reactivo. La aparición de un precipitado color naranja-marrón es positiva.

### **7.2.5 SAPONINAS. Prueba de altura y estabilidad de espuma.**

En un tubo de ensaye se coloca 1 mL de extracto, agitar vigorosamente y se tomar la altura de la espuma, en caso de que se presentara. Se considera positivo si la espuma alcanza una altura de 8 mm a 10 mm y se mantenía estable por 20 minutos.

### **7.2.6 LACTONAS. Prueba de Legal.**

A 1 ml de extracto se le añaden en 2-3 gotas de piridina; en seguida se añade una gota de nitroprusianato de sodio al 5 % y después se añaden gota por gota, 4 gotas de hidróxido de potasio 2N. Una coloración roja intensa se considera positiva.

### **7.2.7 SESQUITERPENLACTONAS. Prueba de Baljet.**

A 0.5 mL de extracto se le añaden y de 3-4 gotas de reactivo, siendo positiva si se forma coloración anaranjada o roja oscura.

### **7.2.8 CUMARINAS. Reacción de Erlich.**

Se colocan 0.5 mL de extracto en una cápsula de porcelana, se concentra y se agregan dos gotas de Reactivo Erlich. La coloración naranja, indicó presencia de cumarinas.

### **7.2.9 ESTEROLES Y METILESTEROLES. Prueba de Salkowski.**

A 0.5 ml de extracto agregar en 1 ml de cloroformo se pone en contacto con un ml de  $H_2SO_4$ , si hay colores amarillo o rojo se considera una prueba positiva.

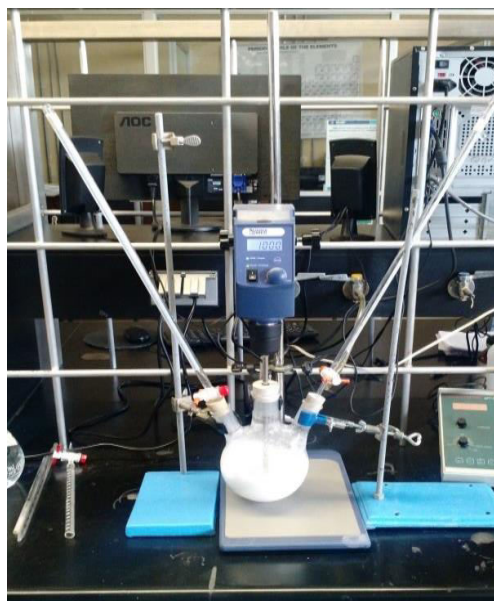
### **7.2.10 TERPENOS. Prueba de Liebermann- Burchard.**

Se mezcla 1 ml de anhídrido acético y uno de cloroformo, se enfrían a  $0^\circ C$  y se les añade una gota de ácido sulfúrico. Una porción de este reactivo se pone en contacto con el extracto. Si hay formación de colores azul, verde, rojo o púrpura en la interfase la prueba es positiva.

### 7.3 SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITA

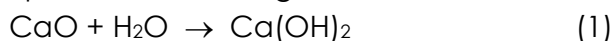
La síntesis se llevó a cabo por el método de precipitación, se pesan los reactivos en una relación estequiométrica de Ca/P de 1.667, para obtener teóricamente 20 gramos de producto.

Se pesaron 11.14 g de óxido de calcio (CaO), los cuales se añaden a un matraz de tres bocas de 500 mL, se agregan 250 mL de agua desionizada, y se agita a 1000 rpm, a temperatura ambiente, durante 2 horas (Figura 9), formándose una suspensión de Ca(OH)<sub>2</sub>.

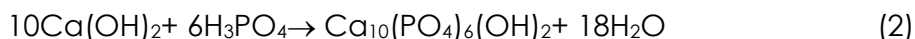


**Figura 9.** Equipo empleado para la síntesis de hidroxiapatita a temperatura ambiente

La reacción química producida es la siguiente:



En seguida se añaden 8.74 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> lentamente y con agitación constante, la cual se mantiene durante 24 horas, llevándose a cabo la siguiente reacción química:



Durante la reacción se controla el pH agregando hidróxido de amonio (12 mL) para conseguir que el pH esté por encima de 9 y garantizar la formación de HA. Terminada la síntesis se obtienen cristales blancos de HA que se filtran, se lavan 3 veces con agua desionizada y se dejan secar en la mufla a 70°C durante 24 horas. Posteriormente el producto obtenido se raspa y muele en un mortero de ágata; se coloca en un crisol de porcelana y se le da tratamiento térmico a 550°C durante 24 horas.

#### **7.4 SÍNTESIS DE LA NANOMATRIZ HA<sub>550</sub>/Hb<sub>85</sub>**

Para llevar a cabo la síntesis de las nanomatrices de hidroxiapatita por el método de sol gel:

Se pesa 1g de polivinilpirrolidona (PVP), el cual se coloca en un vaso de precipitado, añadiendo 10 mL de agua destilada y 100 mL de etanol al 96 % con agitación constante a temperatura ambiente, posteriormente se agrega el extracto etanólico del duramen al 85% manteniendo una relación 1:1 del extracto respecto a la cantidad de hidroxiapatita.

Una vez obtenida la solución, esta se coloca en un matraz de bola y se mantiene en agitación constante a temperatura ambiente. Se añade la hidroxiapatita lentamente. La mezcla se mantiene en agitación durante 15 minutos posteriores a la adición de la hidroxiapatita.

Se coloca el matraz en el rotavapor; una vez extraído el disolvente, el matraz se coloca en la mufla a 70°C durante 24 horas.

Finalmente el producto obtenido se raspa y muele en un mortero de ágata para caracterizarlo por FT-IR, SEM, EDS y DRX.

## 7.5 CARACTERIZACIÓN

### 7.5.1 Espectroscopia de ultravioleta visible (UV-VIS)

Esta técnica se llevó a cabo con el equipo CARY 50 de VARIAN; las diluciones de los extractos fueron colocadas en una celda de cuarzo de 3 mL para su respectiva caracterización. Las longitudes de onda de los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlace en una determinada molécula.



### 7.5.2 Espectroscopia de Infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

El estudio se realizó en un espectrómetro de marca Digilab SCIMITAR Series. Las medidas se tomaron en un rango espectral desde 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$  y mediante el software del equipo se llevó a cabo la transformación de Fourier. Todas las muestras fueron mezcladas con bromuro de potasio grado analítico, y conformados en pastillas a 10 toneladas de presión.

Esta técnica es de gran utilidad en la identificación de grupos funcionales presentes en sustancias orgánicas e inorgánicas. Estos grupos funcionales suelen absorber la radiación infrarroja con la consecuente excitación de varios de sus modos vibracionales y rotacionales, generando señales muy características que permiten hacer algunas deducciones sobre la naturaleza química de la sustancia en estudio.



### 7.5.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido empleado fue Zeiss (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), operado a 100 kV con una resolución de punto a punto de 0.4nm; las microfotografías fueron tomadas con una cámara CCD (MegaVision, Santa Barbara, CA). Las muestras fueron previamente fijadas con cinta de grafito y metalizadas con oro a fin de garantizar su conductividad.

Este instrumento permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. La resolución nominal del equipo es de 3 nm, lo cual permite estudiar características de los materiales a una escala muy pequeña.

#### 7.5.4 Espectroscopia de energía dispersiva (EDS)

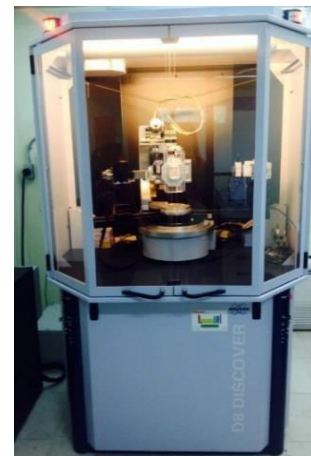
Es una técnica no destructiva que permite el estudio de superficie de alta resolución, consiguiendo una imagen al detalle de la capa y el microanálisis de rayos X, para determinar los elementos químicos constituyentes de la muestra y cuantificarlos. El detector de energía dispersiva, EDS, permite recolectar los Rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis semicuantitativos y de distribución de elementos químicos presentes en superficies, como la energía de cada rayo X es característica de cada elemento, podemos obtener información analítica cualitativa y cuantitativa de áreas del tamaño que deseemos de la superficie.

#### 7.5.5 Difracción de Rayos X (DRX)

El estudio se realizó con el equipo de Difracción de Rayos X (DRX) marca Bruker modelo D8-Discover, con lector LynxEye, voltaje de 40 Kv.

Previo al análisis las muestras fueron pulverizadas, empaquetadas y posteriormente analizadas a temperatura ambiente (25°C), con intervalo angular de 0.04 ° localizado en el rango de 5° a 80°, con un tiempo de incidencia de 1 segundo, con radiación de Cu Ka y Mo a una longitud de onda de 1.5406 Å.

La Difracción de Rayos X es un método utilizado para identificar las estructuras o fases cristalinas presentes en polvos policristalinos desconocidos. El análisis se efectúa mediante la comparación de patrones de difracción recopilados de una muestra desconocida con los patrones de difracción de compuestos conocidos.



## 7.6 EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA

La actividad antimicrobiana se evaluó por el método de difusión con disco. El cual consiste en impregnar discos estériles de papel filtro con 15  $\mu$ L de cada extracto y colocarlos en una placa Petri que contenga el medio Mueller Hinton, obteniendo halos de inhibición que indican si los extractos tienen efecto antimicrobiano.

Las bacterias empleadas para el ensayo fueron

1. *Escherichia coli*,
2. *Staphylococcus aureus*
3. *Pseudomonas aeruginosa*

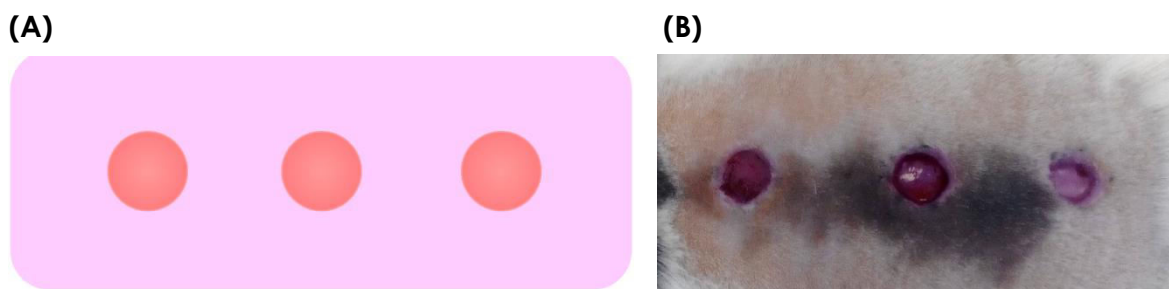
Para preparar las suspensiones de cada microorganismo, Se seleccionaron colonias aisladas y se transfirieron a un tubo con solución salina isotónica estéril (SSI), el inóculo se ajustó a una turbidez igual al del estándar 0.5% de McFarland. La suspensión bacteriana se inoculo con un hisopo estéril en la superficie de las placas Petri con agar Mueller Hinton. Se colocan los discos distribuidos en forma uniforme con presión ligera sobre la placa y se impregnan con 15  $\mu$ L de cada extracto; incluyendo etanol como control del efecto antimicrobiano del disolvente, las placas de incubaron en forma invertida durante 24 horas a 35°C. Finalmente se miden los halos de inhibición con una regla.

## 7.7 EVALUACIÓN BIOLÓGICA

Se utilizaron 4 ratas macho de la cepa Long evans de 60 días de edad. Las ratas se mantuvieron en jaulas de acrílico individuales con libre acceso de agua y alimento, a una temperatura de 21°C, 50% de humedad y un ciclo de luz-oscuridad de 12-12 horas.

Los procedimientos de manejo y cirugía de los animales, estuvieron sujetos a los protocolos aprobados por el comité institucional bajo la normatividad vigente (NOM-062-ZOO-1999), sobre el manejo y el uso de animales de laboratorio.

Los animales fueron anestesiados con ketamina / xilacina (0.2 mL/Kg, vía IP), se rasuró a cada rata en la parte superior del lomo, posteriormente se acondiciono la zona y se realizaron tres heridas circulares tipo “ponch quirúrgico” que se extendieron a través del panículo carnoso en la región interescapular, con un diámetro de 1 cm y una profundidad de 2.0 mm (Figura 13). Finalmente a cada animal se le administró una dosis de Ketoprofeno (0.1 mL/100g) como analgésico y antibiótico (enroflaxina).



**Figura 13.** Esquema de las lesiones. (A) Esquema representativo las lesiones; (B) Fotografía de las heridas en la región interescapular de la rata

### 7.7.1 APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

Los animales recibieron diferentes tratamientos: extracto acuoso y etanólico del duramen de *Haematoxylum brasiletto*, hidroxiapatita y nanoreservorio HA-Hb85 ; de tal manera que las ratas 1 y 2 recibieron: hidroxiapatita y extracto etanolico, mientras que las ratas 3 y 4 fueron administradas con el nanoreservorio y extracto acuoso. Todos los tratamientos fueron aplicados vía tópica sobre la herida generada.

El control de los sujetos de experimentación se realizó en los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15 posterior a la lesión. En donde, los animales fueron pesados y se midió el diámetro de la herida para obtener el porcentaje de retracción con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de retraccion de la herida} = \frac{((d_0 - d_f))}{d_0} \times 100$$

Donde:

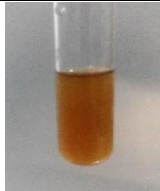
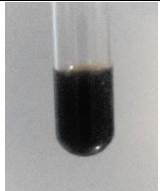

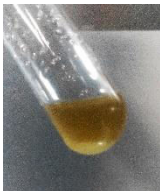

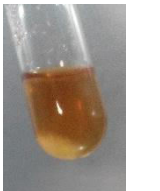
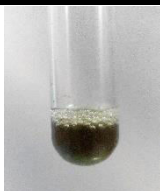
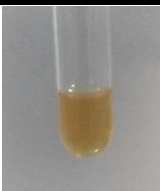

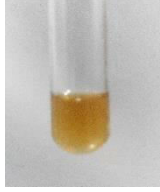
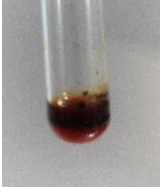
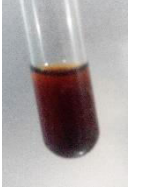
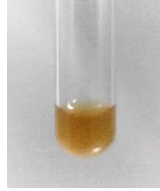

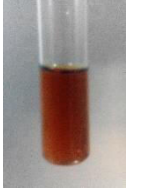

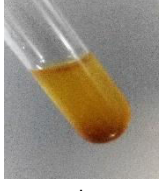

$d_0$ : Diámetro inicial de la herida en el día 0 (10 mm)



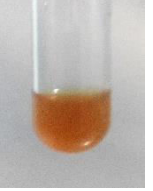

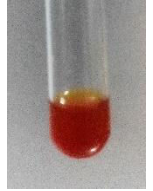
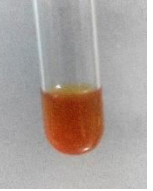



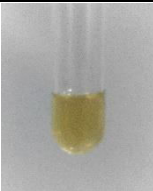

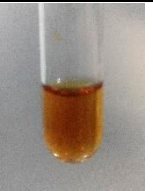


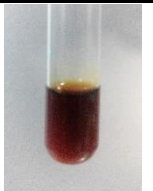

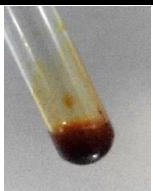

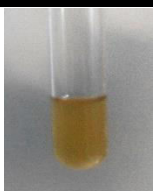


$d_f$ : Diámetro de la herida después de la lesión al día 3, 6, 9, 12 y 15.

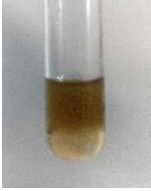


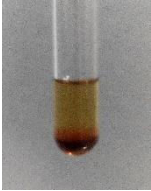

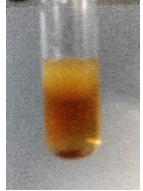
Al término de la evaluación, se realizó eutanasia, a través de una sobredosis de Pentobarbital sódico (50mg/kg) siguiendo los criterios de la NOM-062-ZOO-1999

## VIII . RESULTADOS

### 8.1 PRUEBAS FITOQUÍMICAS

| Metabolito  | Prueba                   | Extracto alcohólico de corteza   | Extracto alcohólico del duramen   | Extracto acuoso del duramen  |
|-------------|--------------------------|--|---|--|
| Taninos     | Cloruro férrico (5%)     | <br>+   | <br>+++  | <br>+++   |
|             | Gelatina                 | <br>++  | <br>++   | <br>++    |
| Flavonoides | Shinoda                  | <br>+  | <br>++  | <br>+++  |
|             | Hidróxido de sodio (10%) | <br>+ | <br>++ | <br>+++ |
| Quinonas    | Hidróxido de amonio      | <br>+ | <br>++ | <br>++  |
|             | Ácido sulfúrico          | <br>- | <br>+  | <br>++  |

|                      |                    |   |   |   |
|----------------------|--------------------|---|---|---|
| Alcaloides           | Mayer              |    |    |    |
|                      |                    | -   | -   | -   |
|                      | Wagner             |    |    |    |
|                      | -                  | -   | -   |   |
|                      | Dragendorff        |    |    |    |
|                      |                    | -   | -   | -   |
| Saponina             | Altura-Estabilidad |   |   |   |
|                      |                    | -   | -   | -   |
| Lactonas             | Legal              |  |  |  |
|                      |                    | +   | +++   | ++  |
| Sesquiterpenlactonas | Baljet             |  |  |  |
|                      |                    | -   | +++   | ++  |
| Cumarinas            | Erlich             |  |  |  |
|                      |                    | -   | ++  | +++   |

|           |                     |  |  |   |
|-----------|---------------------|--|--|---|
| Esteroles | Salkowski           | <br>-   | <br>+++ | <br>++ |
| Terpenos  | Liebermann-Burchard | <br>+++ | <br>+   | <br>++ |

### Valoración cualitativa

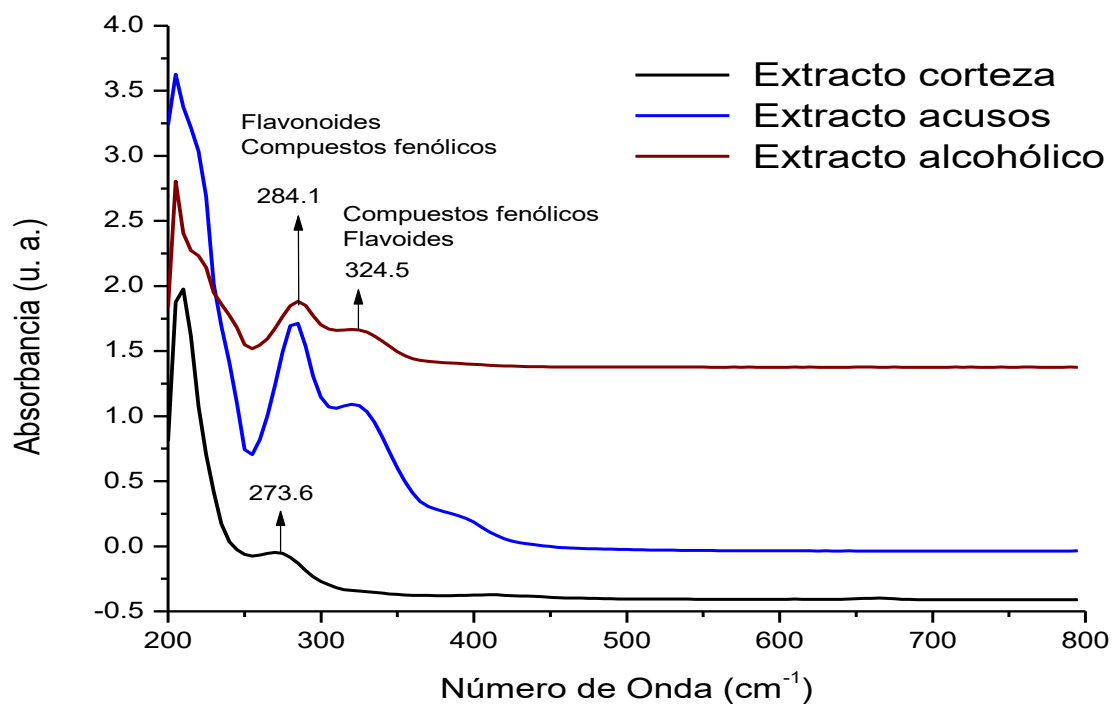
- + Prueba positiva a baja concentración
- ++ Prueba positiva a mediana concentración
- +++ Prueba positiva en alta concentración
- Prueba negativa

El estudio fitoquímico de los extractos de *Haematoxylum brasiletto* determinó la presencia de taninos, flavonoides, quinonas, lactonas, sesquiterpenlactonas, cumarinas, esteroles y terpenos, como metabolitos secundarios.

En las imágenes se puede observar que el extracto etanólico de corteza da pruebas positivas a baja concentración y prueba negativa para sesquiterpenlactonas, cumarinas y esteroles, mostrando una alta concentración de terpenos a diferencia de los demás extractos.

## 8.2 Caracterización por espectroscopia ultravioleta visible (UV-VIS)

Los espectros de UV-VIS del extracto etanólico de la corteza, y los extractos acuoso y etanólico del duramen de *Haematoxylum brasiletto*, se muestran en la figura 14. Todos los espectros muestran la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos correspondientes a la banda de absorción en 284.1 nm y en 273.6 nm. La banda de absorción ubicada en 324.5 nm es asignada a las moléculas de los compuestos de tipo fenólico. Esta banda de absorción solo la presentan los extractos: acuoso y etanólico del duramen de *Haematoxylum brasiletto*.



**Figura 14.** Espectros de ultravioleta-visible de los extractos de corteza, acuoso y etanólico de *Haematoxylum brasiletto*

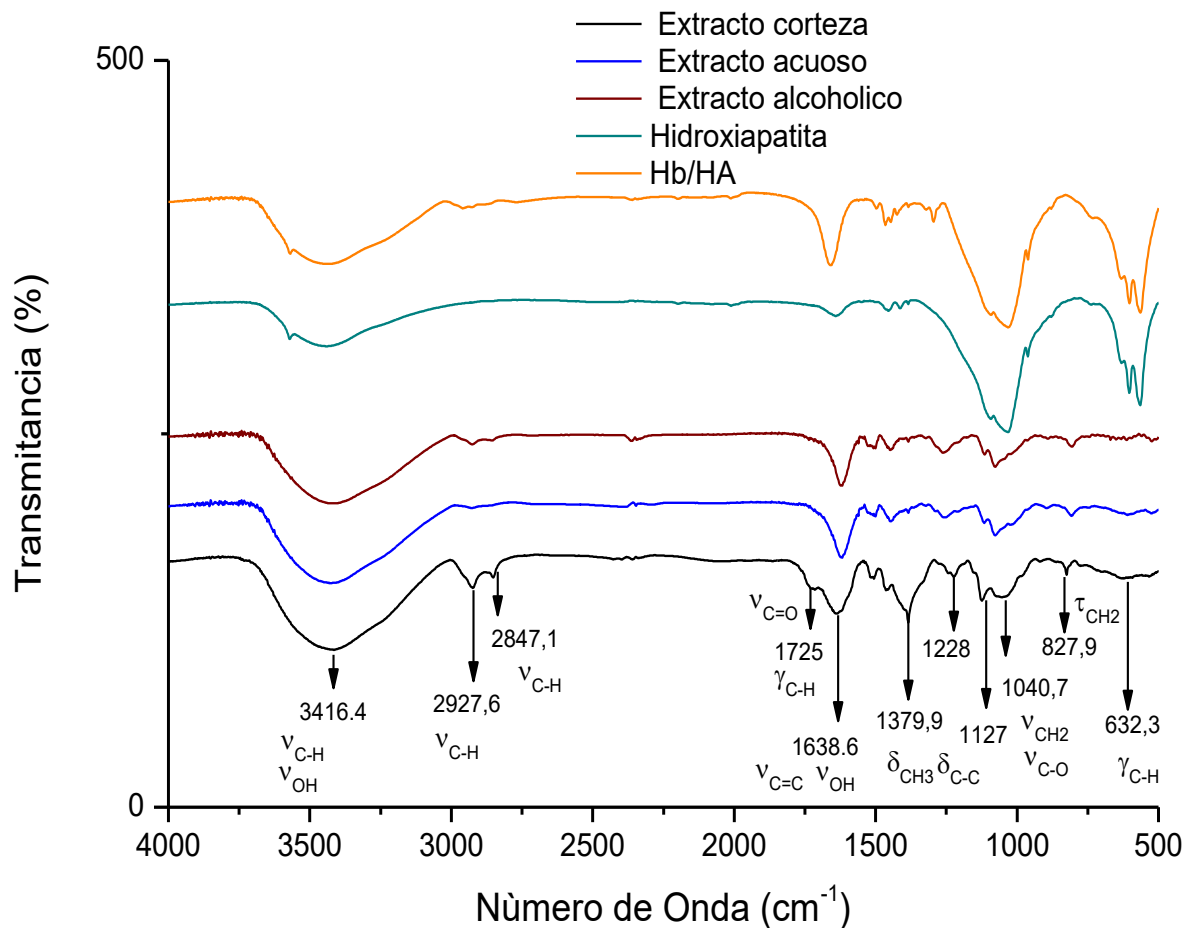
### 8.3 Caracterización por espectroscopia infrarroja (FT-IR)

De acuerdo al espectro de IR del extracto etanólico de la corteza de *Haematoxylum brasiletto* (Hb), se observa una banda de absorción ubicada en  $3416.4\text{ cm}^{-1}$  que identifica al modo de vibración tipo alargamiento ( $\nu_{\text{O-H}}$ ) asignados a los grupos hidroxilos ( $\text{OH}^-$ ), así como al modo de vibración ( $\nu_{\text{C-H}}$ ) de las especies aromáticas de la moléculas de taninos y flavonoides del extracto de Hb. Los modos de vibración tipo alargamiento ( $\nu_{\text{C-H}}$ ) ubicados en  $2927.6\text{ cm}^{-1}$  y  $2847.1\text{ cm}^{-1}$ , son asignados a la fase degenerada y a la vibración de los metilenos  $\square_{\text{CH}_2}$  de tipo estiramiento fuera de fase, de los flavonoides y taninos condensados. El modo de vibración tipo deformación ( $\square_{\text{C-H}}$ ) ubicado en  $1725.0\text{ cm}^{-1}$ , representa a la interacción C-H del anillo aromático y metilos de las sustancias activas del extracto de Hb. La banda de absorción en  $1638.6\text{ cm}^{-1}$ , representa a los modos de vibración ( $\nu_{\text{C-C}}$ ), del tipo flexión ( $\nu_{\text{OH}}$ ), ( $\nu_{\text{Csp}^3\text{-H}}$ ), ( $\nu_{\text{C-O}}$ ) y ( $\nu_{\text{C-O-O}}$ ), y a la deformación  $\delta_{\text{HOH}}$  de las moléculas de los taninos, y flavonoides. Las bandas de absorción ubicadas entre  $1379.9\text{ cm}^{-1}$  y  $1127.0\text{ cm}^{-1}$ , corresponden a los modos de vibración tipo flexión tipo de deformación del grupo metil ( $\square_{\text{CH}_3}$ ) y la interacción C=C. Hacia  $1040.7\text{ cm}^{-1}$  se presenta el modo de vibración ( $\nu_{\text{CH}_2}$ ) tipo balanceo, el modo de vibración ( $\square_{\text{O-C-C}}$ ) y el modo de tensión-deformación ( $\square_{\text{O-H}}$ ) correspondiente a los grupos  $\text{OH}^-$  de las moléculas que conforman el extracto de componentes *Haematoxylum brasiletto*. La banda de vibración localizada en  $827.9\text{ cm}^{-1}$  y la banda de vibración en  $632.3\text{ cm}^{-1}$ , se ubican los modos de vibración de doblaje fuera del plano ( $\square_{\text{C-H}}$ ) de las olefinas y de tensión-deformación ( $\square_{\text{O-H}}$ ).

De forma similar al espectro correspondiente del extracto etanólico de la corteza de *Haematoxylum brasiletto* (Hb), los extractos acuoso y etanólico del duramen, presentan modos de vibración muy similares tipo alargamiento, flexión y deformación.

De acuerdo al espectro de la hidroxiapatita [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ], (Figura 15), muestra tres bandas de absorción ubicadas en  $3474.1\text{ cm}^{-1}$ ,  $3263.3\text{ cm}^{-1}$  y  $3162.0\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a los modos de vibración ( $\square_{\text{OH}}$ ) de los grupos  $\text{OH}^-$  terminales, puente y de alargamiento respectivamente, los cuales son asignados a los grupos hidroxilo del solvente y a la hidroxiapatita hidratada. La banda de absorción en  $1638.3\text{ cm}^{-1}$ , representa a los modos de vibración de tipo flexión ( $\nu_{\text{OH}}$ ), de los grupos hidroxilos del agua presentes en la superficie del nanoreservorio de la HA, asociados principalmente a la humedad del nanoreservorio, al solvente y a la deformación  $\delta_{\text{HOH}}$  del agua coordinada. A  $1445.7\text{ cm}^{-1}$  se localizan las vibraciones de tipo alargamiento simétricas  $\nu_{\text{COO}^-}$  y deformación  $\delta_{\text{CH}_3}$ , así como los grupos de deformación ( $\delta_{\text{H-OP}}$ ) de las especies H-OP. En  $1036.8\text{ cm}^{-1}$  de adsorción, corresponden a los modos de vibración de tipo flexión de los grupos C-C ( $\square_{\text{C-C}}$ ),  $\text{CH}_2$  ( $\square_{\text{CH}_2}$ ) y C-O ( $\square_{\text{C-O}}$ ) de tipo simétrico, que corresponden a las especies metoxi puente, así como a solventes, productos, subproductos de la reacción de síntesis del material y del modo de vibración ( $\square^{\text{as}}_{\text{PO}_4}$ ) del tipo asimétrico de los grupos fosfato. Las bandas de vibración ubicada

en  $876.1\text{ cm}^{-1}$  y  $787.7\text{ cm}^{-1}$  se ubican los modos de vibración ( $\nu_{\text{spO}_4}$ ) de tipo simétrico de los grupos fosfato. Hacia regiones de baja energía del espectro infrarrojo en  $539.5\text{ cm}^{-1}$ , se ubican los modos de vibración de tipo flexión ( $\nu_{\text{Ca-O}}$ ) de las especies Ca-O y el modo de deformación ( $\delta_{\text{PO}_4}$ ) de los grupos fosfato.



**Figura 15.** Espectros de IR de los extractos de corteza, acuoso y etanólico, de las nanomatrices de hidroxiapatita y Hb/HA

El espectro de IR de la nanomatrix *Hb/HA*, tiende a presentar los modos de vibración del tipo alargamiento, flexión y deformación de la nanomatrix de HA y del extracto de *Haematoxylum brasiletto*. Así también se observa que en la región del número de onda en  $611.9\text{ cm}^{-1}$  y  $539.5\text{ cm}^{-1}$  se ubican los modos de flexión correspondientes a las interacción metal-oxígeno ( $\nu_{\text{Ca-O}}$ ) correspondiente a la HA y los modos de vibración ( $\nu_{\text{spO}_4}$ ); ( $\delta_{\text{PO}_4}$ ) y ( $\delta_{\text{C-H}}$ ) correspondientes al extracto de Hb.

## 8.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La micrografía de la nanomatriz de Hidroxiapatita (HA) se muestra en la figura 16, presenta una morfología de agregados de partículas cristalinas del tipo hexagonal. El diámetro promedio de partícula de la hidroxiapatita es de 613 nm.

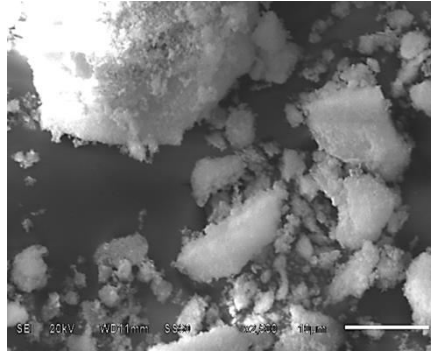


Figura 16. Micrografía de la nanomatriz HA

La micrografía de la nanomatriz de Hb/HA, se presenta en la figura 17, muestra un aglomerado de partículas cristalinas del tipo hexagonal. El tamaño promedio de partícula que presenta al nanomatriz es de aproximadamente de 511 nm.

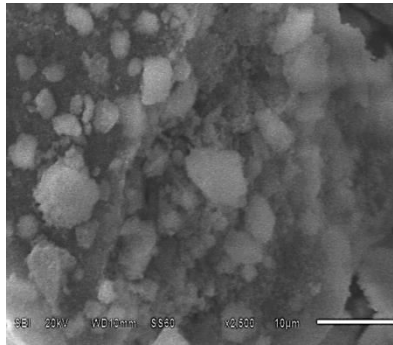


Figura 17. Micrografía de la nanomatriz Hb/HA.

## 8.5 Caracterización por Energía Dispersiva (EDS)

### 8.5.1 Hidroxiapatita

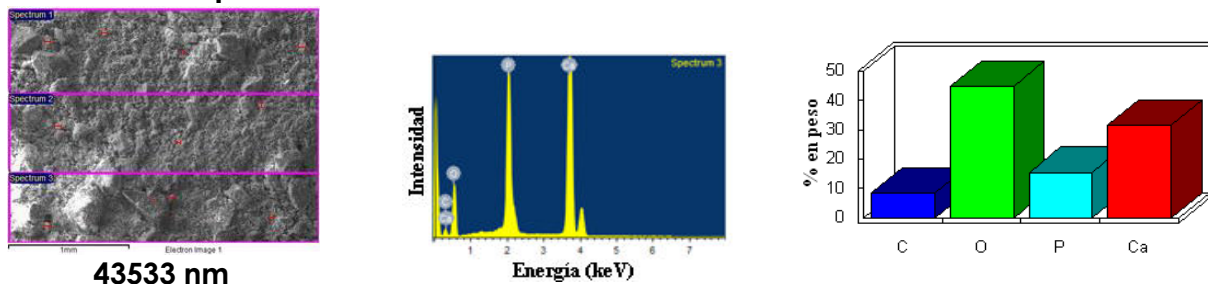


Figura 18. Gráfica correspondiente al porcentaje en peso de hidroxiapatita

Las partículas de polvo analizadas por EDS con un tamaño promedio de 43533 nm, fueron analizadas el espectro 3 y los otros dos, el promedio de porcentaje en peso corresponde a 8.04 % de carbono, 45.02 % de oxígeno, 15.34 % de fósforo y 31.60 % de calcio, el valor de calcio corresponde a 0.79 moles y el valor de fósforo a 0.49 moles, por lo tanto la relación estequiométrica Ca/P es igual a 1.61 que corresponde a 3.6 % diferente del porcentaje en la hidroxiapatita que vale 1.67. El carbono y el oxígeno se encuentran en un exceso porque corresponde a una contaminación por la presencia de CO<sub>2</sub> en el momento de la síntesis.

### 8.5.2 Nanoreservorio HA<sub>550</sub>/Hb<sub>85%</sub>

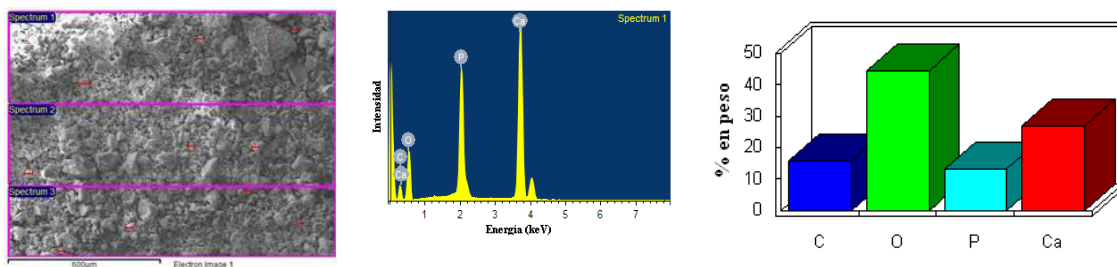


Figura 19. Gráfica correspondiente al porcentaje en peso del nanoreservorio Hb/HA

El tamaño promedio de las partículas de polvo del nanoreservorio es de 25284 nm, se analizaron el espectro 1 y los otros dos dando un porcentaje en peso promedio con los siguientes valores: 18.80 % de carbono, 43.37 % de oxígeno, 12.45 % de fósforo y 25.38 % de calcio, el valor de calcio es 0.63 moles y el valor de fósforo corresponde a 0.40 moles, entonces su relación estequiométrica Ca/P es 1.58 que corresponde a 5.4 %. El porcentaje de carbono y oxígeno aumenta considerablemente por la presencia de dióxido de carbono más la composición química del extracto tanto de taninos como de flavonoides.

## 8.6 Caracterización por Difracción de Rayos X (DRX)

La figura 20, muestra los difractogramas de las nanomatrices de hidroxiapatita (HA) y Hb/HA. En el análisis se usaron los factores atómicos de dispersión por los átomos neutros de "International Tables for X-Ray Crystallography".

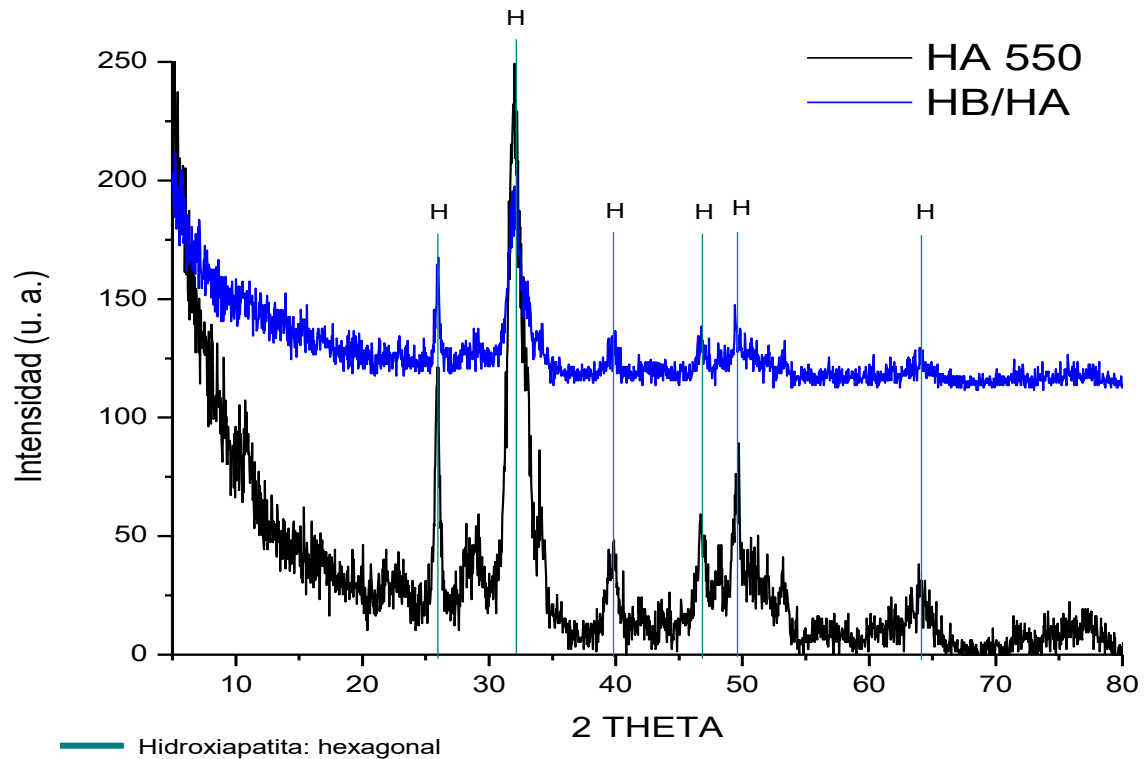


Figura 20. Difractogramas de las nanomatrices de HA y Hb/HA

De acuerdo al difractograma, se observan que ambas nanomatrices presentan una estructura cristalina de tipo hexagonal de acuerdo a los patrones de difracción teóricos. Además se puede observar que el difractograma de DRX de la nanomatrix de HA presenta una intensidad mayor respecto a la intensidad de la nanomatrix Hb/HA, esto puede establecer la interacción del extracto en la malla de la matriz de Hb/HA; disminuyendo el tamaño promedio de la partícula de la nanomatrix de Hb/HA respecto a la nanomatrix de HA.

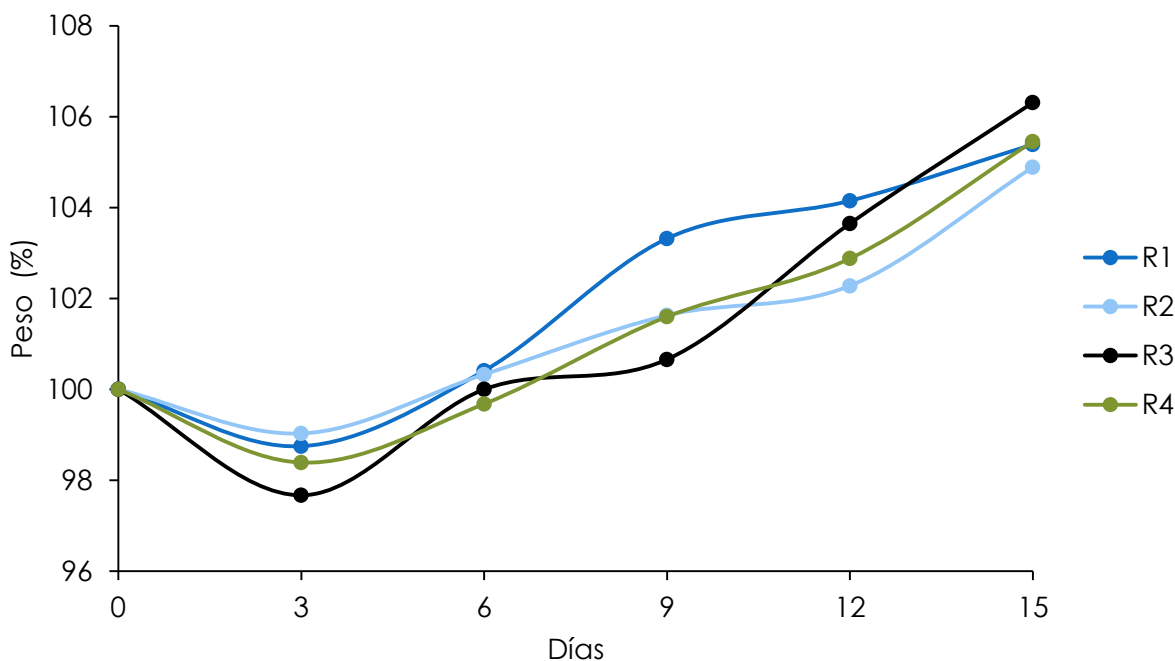
## 8.7 Evaluación microbiológica

El diámetro de la zona de inhibición se midió a las 24 horas y se reporta en milímetros

| <b>Diámetro del halo de inhibición en mm. para evaluar la actividad antimicrobiana</b> |                         |                              |                               |
|--|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|
|  | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| <b>Control (etanol 96%)</b>  | 8                       | 8                            | 7                             |
| <b>Extracto acuoso del duramen</b>   | 16                      | 14                           | 14                            |
| <b>Extracto etanolico del duramen</b>  | 13                      | 12                           | 13                            |
| <b>Extracto etanolico de corteza</b>   | 12                      | 13                           | 13                            |

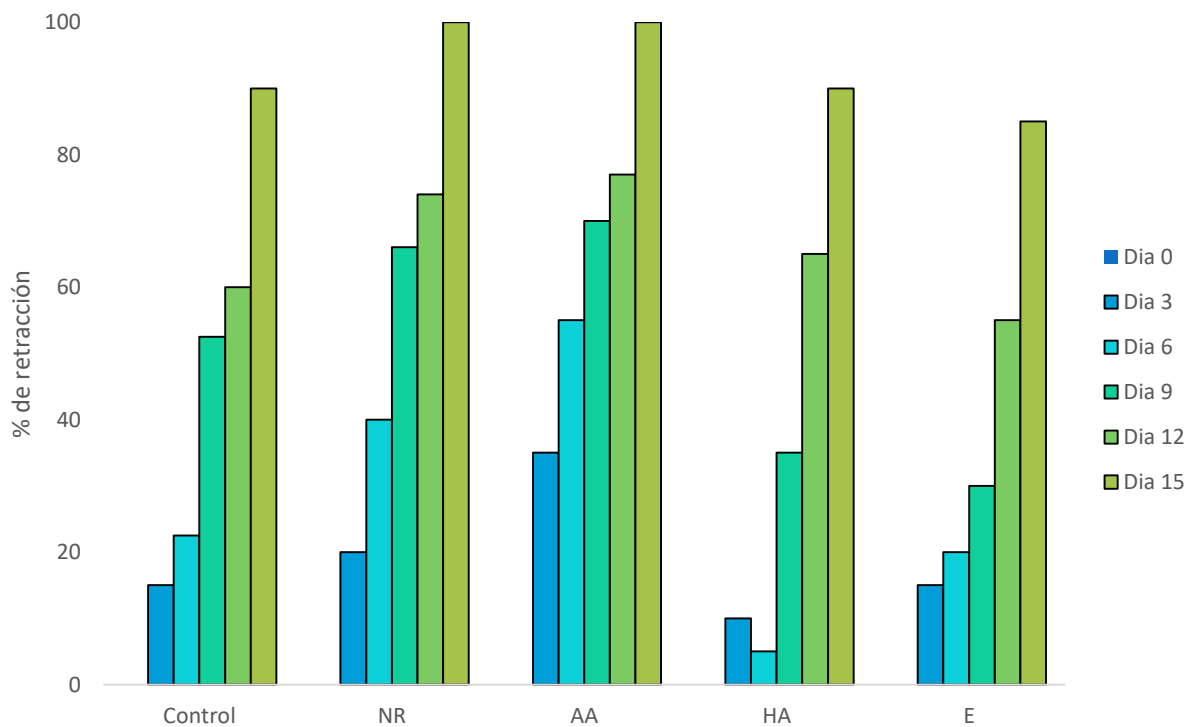
## 8.8 Evaluación biológica

Se ha mostrado que, durante una cirugía, y posterior a ella los animales muestran estímulos anorexigénicos que se lleva a través de proteínas de fase aguda, citosinas e interleucinas, dando como resultado una disminución de peso. La figura 21 muestra el control de peso realizado en los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15 del tratamiento. Los resultados indican que el peso de los animales no tuvo un cambio significativo durante la aplicación de los tratamientos.



**Figura 21.** Gráfica que muestra el peso en porcentaje de las cuatro ratas utilizadas en el proyecto a los días 0,3,6,9,12 y 15 del tratamiento

Para evaluar el efecto cicatrizante de los materiales y extractos obtenidos, se determinó el porcentaje de retracción de las lesiones. La evolución de los tratamientos se muestra en la figura 22.



**Figura 22.** Gráfica que muestra el porcentaje de retracción de los diferentes tratamientos: nanoreservorio Hb/HA (NR); extracto acuoso del duramen de *Haematoxylum brasiletto* (AA), hidroxiapatita (HA) y extracto etanólico del duramen de *Haematoxylum brasiletto* (E) a los días 3, 6, 9, 12 y 15 de su aplicación vía tópica

Los resultados indican que el grupo control mostró una retracción gradual (%) del sitio de lesión durante el día 3 (15%), 6 (22.5%), 9 (52.5%), 12 (60%) y 15 (88%).

En el grupo tratado con el extracto acuoso (AA), los sujetos mostraron un porcentaje de retracción de la herida equivalente a 35, 55, 70, 77 y 100 % a los días 3, 6, 9, 12, y 15 respectivamente ; mientras que el grupo tratado con extracto etanólico registro 15, 20, 30, 55 y 85% en los tiempos respectivos de seguimiento.

Así mismo la administración de los materiales solidos mostro un 20, 40, 66, 74 y 100% para el nano reservorio Hb/HA en los días 3, 6, 9, 12 y 15; en el grupo administrado con hidroxiapatita (HA) estos valores fueron 10, 5, 35, 65 y 90% en los días correspondientes.

### 8.8.1 Evaluación cualitativa del efecto cicatrizante

Para demostrar el efecto cicatrizante de los extractos y materiales empleados en este proyecto, se capturaron imágenes de la lesión durante la administración de los tratamientos. Las imágenes muestran el proceso de reparación tisular de los animales a los días 3, 6, 9, 12 y 15.

### Esquema 1. Evolución de la herida en rata control.



Día 3

Día 6

Día 9

Día 12

Día 15

Esquema 1. Evolución de la herida control. La herida inicial midió 1 cm de diámetro, al 15° día tuvo un porcentaje de retracción igual al 88%

### Esquema 2. Evolucion de la herida con nanoreservorio



Día 3

Día 6

Día 9

Día 12

Día 15

Esquema 2. Evolución de la herida tratada con el nano reservorio (NR). La herida inicial midió 1 cm de diámetro y 2 mm de profundidad, al 12° día presentó un porcentaje de retracción del 74%; al 15° día éste fue del 100%

### Esquema 3. Evolucion de la herida con extracto acuoso



Día 3

Día 6

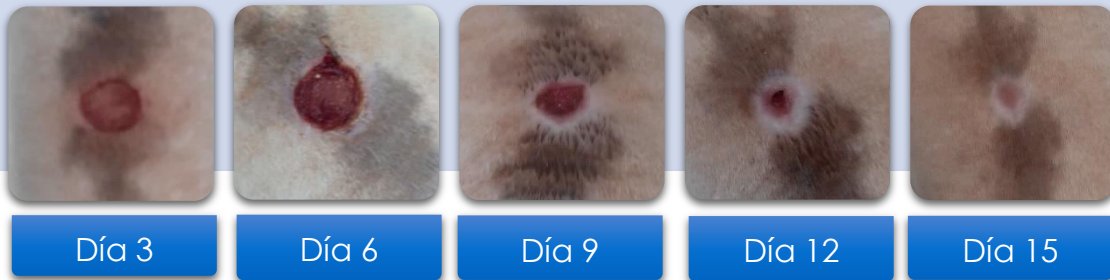
Día 9

Día 12

Día 15

Esquema 3. Evolución de la herida tratada con el extracto acuoso del duramen de *Haematoxylum brasiletto* (AA). La herida inicial midió 1 cm de diámetro y 2 mm de profundidad, al 12° día presentó un porcentaje de retracción del 77%; al 15° día éste fue del 100%

Esquema 43. Evolucion de la herida con



Esquema 4. Evolución de la herida tratada con hidroxiapatita (HA<sub>550</sub>). La herida inicial midió 1 cm de diámetro y 2 mm de profundidad, al 15° día presento un porcentaje de retracción del 90%

---

Esquema 53. Evolucion de la herida con [extracto](#)



Esquema 5. Evolución de la herida tratada con extracto etanólico del duramen de *Haematoxylum brasiletto* (E). La herida inicial midió 1 cm de diámetro y 2 mm de profundidad, al 15° día presento un porcentaje de retracción del 85%

---

## IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 9.1 Pruebas fitoquímicas

La presencia de compuestos fenólicos en el extracto etanólico y acuoso del duramen de *Haematoxylum brasiletto* permite suponer que estos metabolitos son los responsables de la propiedad cicatrizante de esta planta. Además la presencia de flavonoides puede verse involucrada en sus propiedades antimicrobianas.

### 9.2 Espectroscopia Ultravioleta visible (UV-VIS)

Analizando los espectros (figura 14), encontramos una coincidencia en las longitudes de onda máximas (284 y 320 nm) en los extractos acuoso y etanólico del duramen de *Haematoxylum brasiletto*, pero con una intensidad de absorción diferente, con este dato podríamos suponer que el extracto acuoso tiene una mayor concentración de compuestos fenólicos y flavonoides respecto al extracto etanólico.

### 9.3 Espectroscopia infrarroja (FT-IR)

El espectro de infrarrojo de la nanomatriz Hb/HA, presenta un incremento en la intensidad del porcentaje de transmitancia de los modos de alargamiento y flexión de los grupos funcionales de tipo orgánico (C-C; C-O; O-H; C=C; C=O), entre la región del número de onda  $3500\text{ cm}^{-1}$  y  $1040.7\text{ cm}^{-1}$ , esto se debe a la interacción del extracto de Hb en la malla de la nanomatriz de HA y al acoplamiento de tipo físico de las moléculas de los taninos y flavonoides sobre la superficie porosa de la nanomatriz de HA.

### 9.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La disminución del tamaño promedio de la partícula por parte de la nanomatriz Hb/HA se debe a la interacción del extracto de *Haematoxylum brasiletto* en la malla de la matriz de la hidroxiapatita.

### 9.5 Energía dispersiva (EDS)

Comparando los porcentajes en peso, (tabla 4), podemos decir, que hay un incremento considerable de carbono en el nanoreservorio respecto a la hidroxiapatita, esto puede deberse a la presencia de dióxido de carbono en el

momento de la síntesis, más la composición química del extracto tanto de taninos como de flavonoides.

|         | Porcentaje en peso (%) |                |
|---------|------------------------|----------------|
|         | Hidroxiapatita         | Nanoreservorio |
| Carbono | 8.04                   | 18.80          |
| Oxígeno | 45.02                  | 43.37          |
| Fosforo | 15.34                  | 12.45          |
| Calcio  | 31.60                  | 25.38          |

## 9.6 Difracción de rayos X (DRX)

Observando los difractogramas concluimos que ambos materiales son cristalinos, y que aparentemente la estructura de la hidroxiapatita no se modifica al agregar el extracto de *Haematoxylum brasiletto*. Al revisar los parámetros ( $2\theta$  y planos) podemos observar pequeñas modificaciones que probablemente son el resultado de esta interacción.

## 9.7 Actividad antimicrobiana

Al medir los halos de inhibición de los extractos y comparándolos con el halo control del disolvente (etanol 96%), se determinó que el extracto etanólico del duramen de *Haematoxylum brasiletto* es el que tiene una mayor actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*; seguido del extracto acuoso del duramen y extracto etanólico de la corteza.

## 9.8 Evaluación biológica

La cicatrización es un proceso complejo que depende de la interrelación de los elementos celulares que componen la sangre, el sistema inmunológico y tejidos, los cuales producen las proteínas necesarias para la reacción inflamatoria y la reparación tisular. En este proyecto, se pretende mejorar el fenómeno de cicatrización, acelerando el tiempo de reparación y evitar la aparición de procesos infecciosos.

En los extractos acuoso y etanólico del duramen de *Haematoxylum brasiletto* se identificó la presencia de taninos y flavonoides, que influyen de manera positiva en la aceleración del proceso de cicatrización: los taninos tienen la capacidad de unirse a las proteínas de la piel, previendo una especie de curtido que hace que las capas superficiales sean menos permeables y protejan a las capas subyacentes; mientras que los flavonoides tienen actividad vasoconstrictora deteniendo así la posibilidad de hemorragia durante la lesión y favoreciendo la adhesión y agregación plaquetaria.

En la figura 3 podemos observar que el extracto acuoso (100%) presenta un mayor porcentaje de retracción que el extracto etanólico (85%), analizando los espectros de UV-Visible de ambos, se determinó que hay una mayor concentración de taninos y flavonoides en el extracto acuoso, lo que podría explicar que éste presente una mayor actividad cicatrizante.

La hidroxiapatita presenta un porcentaje de retracción del 90%. Hasta el día de hoy no se ha informado su mecanismo para mejorar la bioactividad del entorno dérmico. Una de las propuestas se relaciona con el papel de las ondas Ca<sup>2+</sup> en la expresión génica mediada por TGF- $\beta$  en fibroblastos [30]. Según la literatura, la modulación de la señalización de Ca<sup>2+</sup> de la HA, produce la fosforilación de la vía SMAD, acelerando la expresión de diversos factores de crecimiento, incluidos TGF y EGF que finalmente controla la función biológica de los fibroblastos, aumentando su densidad en la dermis. El colágeno se produce en los fibroblastos, por lo que aumentar la tasa de proliferación de estas células puede aumentar la producción de colágeno y favorecer la remodelación tisular [4].

Dado el mecanismo propuesto para acción dérmica de la HA y tomando en cuenta la actividad terapéutica que pueden ejercer los extractos, el nanoreservorio resulto ser el tratamiento con mayor eficacia en el proceso de cicatrización, cuyo porcentaje de retracción fue del 100%; podemos suponer que las partículas de HA en el nanoreservorio: funcionan como una barrera que impide la degradación del extracto, lo que contribuye a una alta estabilidad [ACAS] ; favorece la modulación de la función biológica de los fibroblastos promoviendo la producción de factores de crecimiento y colágeno [4,30].

Mientras que los taninos presentes en el extracto promueven el proceso de cicatrización, formando enlaces de tipo covalente con las proteínas de la piel, creando una especie de curtido, lo que disminuye la permeabilidad de misma y protege a las capas subyacentes; por otra parte los flavonoides ejercen un efecto anti inflamatorio, que contribuye a la disminución del dolor y finalmente tanto los flavonoides como las quinonas ejercen acción antimicrobiana contra bacterias como *Staphylococcus aureus* disminuyendo el riesgo a presentar infecciones.

## X. CONCLUSIONES

1. Los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *Haematoxylum brasiletto*, son principalmente taninos y flavonoides.
2. El extracto etanólico del duramen, presenta mayor actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Se sintetizó un nanoreservio a partir de hidroxiapatita y el extracto etanólico del duramen de *haematoxylum brasiletto* por el método sol gel.
4. Se comprobó que tanto el extracto acuoso del duramen de *Haematoxylum brasiletto*, como el nanoreservio Hb/HA son los tratamientos con mayor actividad cicatrizante.

## XI. REFERENCIAS

1. Informed Health Online [Internet]. Institute for Quality and Efficiency in Health Care. (2016). How does the skin work?. PubMed Health.
2. Tortora G.J. & Derrickson B. Principios de anatomía y fisiología. 11ª edición. Editorial médica panamericana.
3. Martini F.H., Timmons M.J. & Tallitsch R.B. (2009) Anatomía humana. Editorial Pearson.
4. Sepulveda J. (2012). Texto atlas de histología biología celular y tisular. Editorial Mc Graw Hill.
5. Navarrete G. (2003). Histología de la piel. Rev. Fac. Med. UNAM Vol.46 No.4.
6. Asociación mexicana de cirugía general.(2017). Tratado de cirugía general. Volumen 1. Tercera edición. Editorial manual moderno. Capítulo 42. Tipo de cierre de heridas. 337-341
7. Joseph, H. (2004). Chapter 1 - Wound Healing. Small Animal Surgery Secrets (Second Edition). Philadelphia, Hanley & Belfus: 1-6.
8. Secretaria de salud. Manual Clínico para la estandarización del cuidado y tratamiento a pacientes con heridas agudas y crónicas
9. Brunicardi C.F. Schwartz. principios de cirugía. Décima edición. Editorial Mc Graw Hill. 241- 266
10. Singer, A.J; Clark, R.A. Cutaneous Wound Healing. N. Eng. J. Med. 1999; 341: 738 – 746.
11. Amado S. Lecciones de dermatología. 16ª edición. Mc Graw Hill 392- 395
12. Enoch S y Leaper, DJ. Basic Science of Wound Healing. Surgery 2007; 26: 31 – 37.
13. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V: The wound healing process: An overview of cellular and molecular mechanisms. The Journal of International Medical Research 2009;37:1528-1542.
14. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y et al.: Wound repair and regeneration. Nature 2008;453:314-321.
15. Karp G. Biología Celular y Molecular. 5ª edición McGraw-Hill Interamericana. México. 2009. Ham
16. Eming S.A., Martin P., Tomic-Canic M. (2014) Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. Sci. Transl. Med. 6 doi: 10.1126/scitranslmed.3009337.
17. FINN Gottrup, Organization of wound healing services: The Danish experience and the importance of surgery. En Wound Repair and Regeneration. Vol. 11, No. 6. p. 452.
18. Kopp J, Preis E, Said H, Hafemann B, Wickert L, Gressner AM, et al. Abrogation of transforming growth factor-beta signaling by SMAD7 inhibits collagen gel contraction of human dermal fibroblasts. J Biol Chem 2005; 280:21570-6.
19. BELLO-MARTÍNEZ J, et al. (2017). Antiproliferative Activity of Haematoxylum brasiletto H. Karst
20. Ávila-Calderón L.E. & Rutiaga-Quiñones J.G. Componentes químicos de la madera y la corteza de Haematoxylum brasiletto Karsten
21. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=palo%20de%20brasil&id=7910>

22. Amstrong, W.P. 1992. Logwood and Brazilwood: Trees that spawned 2 Nations. (Modificado de: Pacific Horticulture 53:38-43). [Internet]. Disponible en: <http://waynesword.palomar.edu/ecoph4.htm>. Fecha de acceso: 03/14/2014. 5Conafor, 2011)
23. Fengel, D. y G. Wegener. 1989. Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Walter de Gruyter. Berlín. 415 p. 7Rowell (2005).
24. Rivero-Cruz, J.F. 2008. Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*. Journal of Ethnopharmacology 119(1,2):99–103
25. Pérez-Treviño K.C. Evaluación de la actividad anti-trypanosomal de extractos metanólicos de plantas con uso medicinal
26. Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Perez, L., Lopez-Villafranco, E., Estrada-Muñiz, E., Aguilar, A. and R. Reyes-Chilpa. 2005. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. Journal of Ethnopharmacology, 97: 293–299.
27. Argueta A. Atlas De Las Plantas De La Medicina Tradicional Mexicana. Vol. 1. México City, México: Instituto Nacional Indigenista; 2004.
28. Heredia N, Escobar M, Rodríguez-Padilla C, García S. Extracts of *Haematoxylum brasiletto* inhibit growth, verotoxin production, and adhesion of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. J Food Prot 2005;68:1346-51.
29. González-Salvatierra C, Luis Andrade J, Escalante-Erosa F, García-Sosa K, Manuel Peña-Rodríguez L. Antioxidant content in two CAM bromeliad species as a response to seasonal light changes in a tropical dry deciduous forest. J Plant Physiol 2010;167:792-9.
30. Pedraza-Bucio F.E. & Rutiaga-Quiñones J.G. Extracto Tánico de la Madera de Palo de Brasil
31. Romahn de la Vega, C. F., (1992), Principales productos forestales no maderables de México. Universidad Autónoma Chapingo. México.
32. Rowell, R. 2005. Handbook of wood chemistry and wood composites. Taylor & Francis. Boca Raton. 473 p.
33. Téllez S., C., H.G. Ochoa-Ruíz, R. San Juan-Dueñas y J.G. Rutiaga-Quiñones. 2010. Componentes químicos del duramen de *Andira inermis* (W. Wright) DC. (Leguminosae). Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 16(1):87-93.
34. Rivera J.A., Fetter G., P. Boschll. Efecto del pH en la síntesis de hidroxapatita en presencia de microondas.
35. CALDERÍN, L., STOTT, M.J., RUBIO, A., "Electronic and crystallographic structure of apatites", Physical Review, v. 67, pp. 134106 (1-7), April 2003.
36. DRIESSENS, F.C.M., VERBEECK, R.M.H., Biominerals, Florida, CRC Press, 2000.
37. Asghar & Murtaza. Synthesis and characterization of nanohydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction.
38. ITOKAZU, T. OHNO, T. TANEMORI, E. WADA, N. KATO\* and K. WATANABE
39. Antibiotic-loaded hydroxyapatite blocks in the treatment of experimental osteomyelitis in rats
40. Londoño M.E., Echavarría A. & De la Calle F. Características cristalógicas de la hidroxapatita sintética tratada a diferentes temperaturas. Revista EIA, ISSN 1794-1237 Número 5 p. 109-118. Junio 2006

41. OGLIVIE, A, FRANK, R.M., BENQUE, E.P., GINESTE, M., HEUGHEBAERT, M., HEMMERLE, J., "The biocompatibility of hydroxyapatite implanted in the human periodontum", *Journal of Periodontal Research*, v. 22, pp. 270-283, July 1987.
42. GUTIERREZ, P., PIÑA, C., LARA, V.H., BOSCH, P., "Characterization of enamel with variable caries risk", *Archives of Oral Biology*, v. 50, pp. 843-848, October 2005
43. PARKS J. & LAKES R. *Biomaterials :an introduction*. New York, Plenum PRESS. 1992. 2ª ed.
44. Itokazu M, Yang W, Aoki T and Kato N 1998 *Biomaterials* 19 817
45. Minguez F, Agra M, Luruena S, Ramos C and Prieto J 1990 *Drugs Exp. Clin. Res.* 16 231
46. Liu, Y., et al., (2005), —BMP-2 Liberated from Biomimetic Implant Coatings Induces and Sustains Direct Ossification in an Ectopic Rat Model. *Bone*, Vol. 36, pp. 745 – 757
47. MORI, K., HARA, T., MIZUGAKI, T., EBITANI, K., KANEDA, K., "Hydroxyapatite-bound cationic ruthenium complexes as novel heterogeneous lewis acid catalysts for diels-alder and aldol reactions", *Journal of the American Chemical society*, v. 125, pp. 11460-11461, August 2003.
48. SMAHI, A., SOLHY, A., BADAoui, H. E., AMOUKAL, A., TIKAD, A., MAIZI, M., SEBTI, S., "Potassium fluoride doped fluorapatite and hydroxyapatite as new catalysts in organic synthesis", *Applied Catalysis A: General*, v. 250, pp. 151-159, September 2003.
49. ELAZARIFI, N., CHAOUI, M.A., OUASSOULI, A.E., EZZAMARTY, A., TRAVERT, A., LEGLISE, J., DE MENORVAL, L.C., MOREAU, C., "Hydroprocessing of dibenzothiophene, 1methylnaphthalene and quinoline over sulfided NiMo-hydroxyapatite-supported catalysts", *Catalysis Today*, v. 98, pp.161-170, November 2004.
50. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite powder using sol-gel technique K P SANOSH†, MIN-CHEOL CHU, A BALAKRISHNAN†, T N KIM† and SEONG-JAI CHO\*
51. Saeri M R, Afshar A, Ghorbani M, Ehsani N and Sorrell C C 2003 *Mater. Lett.* 57 4064
52. Masahiro Y, Hiroyuki S, Kengo O and Koji I 1994 *J. Mater. Sci.* 29 3399
53. Shih W J, Yung-Feng C, Moo-Chin W and Min-Hsiung H 2004 *J. Cryst. Growth* 270 211
54. Silva C C, Pinheiro A G, Miranda M A R, Góes J C and Sombra A S B 2003 *Solid State Sci.* 5 553
55. Kim I S and Kumta P N 2004 *Mater. Sci. Eng. B* 111 232
56. Dean-Mo L, Troczynski T and Tseng W J 2001 *Biomaterials* 22 1721
57. Afshar A, Ghorbani M, Ehsani N, Saeri M R and Sorrell C C 2003 *Mater. Des.* 24 197
58. M. A. Giardina y M. A. Fanovich síntesis de hidroxiapatita por precipitación a partir de Ca(OH)<sub>2</sub> y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> asistida por irradiación ultrasónica.
59. Hossein Eslami, Mehran Solati-Hashjin, Mohammadreza Tahriri. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Nanocrystals via Chemical Precipitation Technique.

60. Mavropoulos E, Rossi AM, Rocha NCC, Soares GA, Moreira JC, Moure GT. Dissolution of calcium-deficient hydroxyapatite synthesized at different conditions. *Mater Charact*2003; 5578:15.
61. Orlovskii V. P., Komlev V. S., and S. M. Barinov. Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Ceramics.
62. Afshar A, Ghorbani M, Ehsani N, Saeri MR, Sorrell CC. Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite. *Mater Design*2003; 24: 197-202.
63. QUEIROZ, A.C., SANTOS, J. D., MONTEIRO, F.J. and PRADO DA SILVA, M. H. Dissolution studies of hydroxyapatite and glass-reinforced hydroxyapatite ceramics. *Materials Characterization*. Vol. 50. 2003 197-2
64. MATHEW, Mathai and TAKAGI. Crystal structures of calcium orthophosphates. *Monographs in Oral Science* 2001. Vol.18. Basel, Switzerland. 1-16.
65. Liou SC, Chen SY, Liu DM. Synthesis and characterization of needlelike apatitic nanocomposite with controlled aspect ratios. *Biomaterials*2003; 24: 3981-8.