



EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE Y ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS DE *Buddleja cordata* KUNTH Y *Vismia baccifera* (L.) TRIANA & PLANCH

In vitro EVALUATION OF THE HEALING AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF *Buddleja cordata* KUNTH AND *Vismia baccifera* (L.) TRIANA & PLANCH

Griselda Hernández-Pasteur¹, Phaedra S. Silva-Bermúdez², Ricardo Reyes-Chilpa³, Heike Vibrans¹ y Marcos Soto-Hernández^{1*}

¹Colegio de Postgraduados, Posgrado en Botánica, Montecillo, Texcoco, Edo. de México, México. ²Instituto Nacional de Rehabilitación-Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa, Ciudad de México, México. ³Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química, Ciudad de México, México.

*Autor para correspondencia (msoto@colpos.mx)

RESUMEN

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y cumple diversas funciones como barrera de protección. Ésta puede verse afectada por lesiones que interrumpen la continuidad de su estructura; y por infecciones microbianas que retardan el proceso de cicatrización. En la medicina tradicional se usan plantas para el tratamiento de heridas mediante infusiones, decocciones o cataplasmas. Dos especies distribuidas en México que tienen reportes etnomédicos para dicho fin son *Buddleja cordata* Kunth (tepozán) y *Vismia baccifera* (L.) Triana & Planch (chotillo). El objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* el potencial de estas especies para promover el cierre de heridas y como agentes antibacterianos contra *Pseudomonas aeruginosa*. Los extractos orgánicos de las hojas de ambas especies se evaluaron en un modelo *in vitro* de herida en monocapa celular y en un modelo de microdilución contra *P. aeruginosa*. También se evaluó *in vitro* el posible efecto citotóxico de los extractos mediante ensayo de reducción de la sal de tetrazolio. El extracto de diclorometano-metanol de tepozán a 50 µg mL⁻¹ incrementó significativamente (35 %) el cierre de herida en monocapa celular. El efecto puede deberse al verbascosido, compuesto con actividad cicatrizante previamente identificado en extractos polares de hojas de tepozán. El extracto de *V. baccifera* no incrementó la tasa de reparación en el modelo de herida *in vitro* usado. Ninguno de los extractos evaluados en las dos especies presentó efecto citotóxico (hasta 100 µg mL⁻¹); tampoco se inhibió el crecimiento de *P. aeruginosa* (hasta 1000 µg mL⁻¹). Los resultados sugieren que el uso popular de tepozán para el tratamiento de heridas tiene sustento científico, pero aún se requiere profundizar en su estudio químico y farmacológico *in vivo*.

Palabras clave: *Buddleja cordata*, *Vismia baccifera*, fibroblasto, ensayo de herida *in vitro*, MTT, *Pseudomonas aeruginosa*.

SUMMARY

The skin is the largest organ in human body and it has various functions as a protective barrier. This can be affected by lesions that interrupt the continuity of its structure; and by microbial infections that retard the healing process. In traditional medicine, a wide variety of plants is used for wound treatment by infusions, decoctions or poultices. Two species distributed in Mexico that have ethnomedicinal reports for this purpose are *Buddleja cordata* Kunth (tepozán) and *Vismia baccifera* (L.) Triana & Planch (chotillo). The objective of this study was to evaluate *in vitro* the potential of these species to promote wound healing and as antibacterial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. The organic extracts from leaves of both species were evaluated using an *in vitro* model of cell monolayer wound and in a microdilution model against *P. aeruginosa*. The possible cytotoxic effect of the extracts was also evaluated

in vitro through a tetrazolium salt reduction assay. The dichloromethane-methanol extract of tepozán at 50 µg mL⁻¹ significantly increased (35 %) wound closure in cell monolayer. The effect may be due to verbascoside, a compound with wound healing activity previously identified in polar extracts of tepozán leaves. The extracts of *V. baccifera* did not increase the rate of repair in the *in vitro* wound model used. None of the evaluated extracts of both species showed cytotoxic effect (up to 100 µg mL⁻¹); the growth of *P. aeruginosa* was not inhibited either (up to 1000 µg mL⁻¹). Results suggest that the popular use of tepozán for the treatment of wounds has scientific support, but it is still necessary to deepen its chemical and pharmacological studies *in vivo*.

Index words: *Buddleja cordata*, *Vismia baccifera*, fibroblast, *in vitro* scratch assay, MTT, *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y lo protege contra fuerzas mecánicas, radiaciones, microorganismos y otros factores; sin embargo, ésta puede ser afectada por lesiones (heridas) que interrumpen su estructura y función (Guarín-Corredor *et al.*, 2013). Aunque la piel tiene la capacidad de auto-reparación, cuando una herida afecta la dermis, el proceso de cicatrización puede alterar factores que se desencadenan durante la reparación cutánea (Houghton *et al.*, 2005). De acuerdo con el daño provocado en la piel, es necesario usar sustitutos o tratamientos que estimulen la reparación celular y el proceso de cicatrización. En las heridas se pueden presentar microorganismos, entre ellos bacterias como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Malassezia* spp. y *Pseudomonas aeruginosa* (Muthukumar *et al.*, 2014 y Wu *et al.*, 2018) que provocan infecciones y retardan el proceso de curación; por ello, es primordial crear un ambiente libre de infecciones en una herida (Leise, 2018).

En la medicina tradicional se encuentran reportes de plantas usadas para el tratamiento de diferentes afecciones, entre ellas para sanar heridas cutáneas, pues

aceleran el proceso de cicatrización y mantienen un ambiente séptico (Gallardo y Barboza, 2015; Leise, 2018); sin embargo, existe poca o nula evidencia científica sobre su efectividad. Al validar su eficacia se podrían recomendar medicamente, con lo que se espera una alta tasa de apego al tratamiento entre la población. Las plantas son una fuente importante de compuestos, por lo que los estudios dirigidos a corroborar su efectividad permitirán conocer moléculas con potencial cicatrizante, antiséptico y antimicrobiano más accesibles y económicas.

En México se usan las hojas de *Buddleja americana* L., *B. cordata* Kunth y *B. parviflora* Kunth en forma de cataplasma para el tratamiento de heridas (Argueta, 1994). Ávila *et al.* (2005, 2014) demostraron que los extractos metanólicos de *B. cordata* y *B. scordioides* Kunth presentan efecto fotoprotector contra la radiación UV y no presentan genotoxicidad; ésto se atribuyó al verbascosido y a la linarina. La especie *B. globosa* Hope es usada por la etnia Mapuche (Chile) para la curación de heridas. El extracto acuoso de esta especie tiene actividad antioxidante, pero no estimula el crecimiento de fibroblastos *in vitro*; se identificó como compuestos responsables a la luteolina, linarina, verbascosido y equinacosido (Mensah *et al.*, 2001).

Otro de los géneros que se emplean en la medicina tradicional para sanar heridas de la piel es *Vismia*. La corteza de *V. baccifera* (L.) Triana & Planch es usada por la etnia Yanasha (Perú) para tratar heridas infectadas (Valadeau *et al.*, 2010). Dicha especie presenta actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *Enterococcus faecalis* (Salas *et al.*, 2007).

En México se distribuyen algunas especies del género *Buddleja* y *Vismia*, por lo que se eligió trabajar con *B. cordata* (tepozán) y *V. baccifera* (vismia) con el objetivo de mostrar las primeras evidencias científicas de su posible efectividad en el tratamiento de heridas para incentivar el cierre de heridas en monocapas celulares de fibroblastos humanos. También se estudió la viabilidad de los cultivos celulares en contacto con los extractos mediante el ensayo de reducción de la sal de tetrazolio y su posible actividad antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria presente en heridas infectadas, en un ensayo de microdilución.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y autenticidad

Se recolectaron hojas de ambas especies, *Vismia baccifera* fue recolectada en septiembre de 2011 en la localidad La Esperanza, municipio de Santiago Comaltepec,

Oaxaca. *Buddleja cordata* se recolectó en noviembre de 2015 en las instalaciones de Ciudad Universitaria, UNAM en la Ciudad de México. Se depositó un ejemplar de cada especie en el herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM, con número de registro 134792 y 160639, respectivamente. La identificación fue hecha por los coautores, quienes corroboraron las especies con el M. en C. Ramiro Cruz Durán.

Obtención de los extractos orgánicos

Se obtuvieron extractos de las hojas secas (a temperatura ambiente y en sombra) de ambas especies mediante el método de maceración en frío (Chen *et al.*, 2016), que consiste en obtener un extracto a partir de disolventes orgánicos puestos en contacto con el material vegetal. Se colocaron 118 g de hojas secas y molidas en un matraz (de manera independiente), se cubrió con diclorometano-metanol (CH_2Cl_2 -MeOH) (1:1) y cada tercer día se recolectaron los extractos, se colocó nuevamente mezcla de disolventes. El disolvente se eliminó a presión reducida. Este proceso se repitió hasta que el disolvente fue incoloro. Los extractos finales se denominaron vismia y tepozán. Los extractos de diferente polaridad de tepozán se obtuvieron a partir de 470 g de hoja seca y molida bajo el mismo procedimiento; primero, se extrajo con hexano, luego con acetato de etilo y finalmente con metanol. Los extractos secos se nombraron como THex, TAcOEt y TMeOH, respectivamente.

En todos los casos se hizo una solución stock a partir de 1 mg de extracto seco que se disolvió en la cantidad mínima necesaria de dimetilsulfoxido (DMSO; Sigma Aldrich). Esta solución stock se filtró con una membrana de 0.22 μm (Merck Millipore) y se aforó hasta 2 mL con medio de cultivo celular (DMEM-F12 complementado; DMEM-F12 con 10 % suero fetal bovino y 1 % antibiótico-antimicótico; Gibco). Los extractos de vismia y tepozán se evaluaron en las concentraciones 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que los extractos de diferente polaridad de tepozán se usaron en las concentraciones 5, 10 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los tratamientos se mantuvieron a 4-8 °C hasta su uso.

Cultivo celular y condiciones

Los fibroblastos (FBH) en criopreservación (INR, México) se obtuvieron de remanentes de cirugía de circuncisión (Firma de Consentimiento Informado). Los FBH se descongelaron y expandieron en cajas de cultivo Corning T25, el cultivo se mantuvo con DMEM-F12 complementado en una incubadora a 37 °C y con 5 % de CO_2 (Velasquillo *et al.*, 2017).

Viabilidad celular MTT

Se cultivaron 7000 células por pozo en placas Costar de 48 pozos con DMEM:F12 complementado a 37 °C y 5 % de CO₂ hasta alcanzar 80 % de confluencia celular; después, se retiró el medio de cultivo, se agregaron 200 µL del tratamiento correspondiente y se incubaron. Como control negativo se evaluó el vehículo de disolución de los extractos (DMSO); para ello, se incubaron pozos con diluciones de DMSO:DMEM-F12 complementado (con el DMSO correspondiente usado en los extractos).

Para el control positivo se incubaron pozos con DMEM:F12 complementado (sin DMSO ni extractos) para evaluar el proceso normal de las monocapas. Después de 24 h se retiraron los tratamientos y se hicieron lavados con buffer (PBS; Phosphate Buffer Saline 1X, pH 7; Gibco). Se agregaron 150 µL de una solución 9:1 DMEM-F12:MTT (sal de tetrazolio; Sigma Aldrich) y se incubaron durante 3 h. La mezcla DMEM-F12:MTT se retiró, se hicieron lavados con PBS y se añadieron 150 µL de DMSO-isopropanol 1:1 para solubilizar los cristales de formazán producidos. Se tomó una alícuota de 100 µL de esta solución, se colocó en una placa de cultivo Costar de 96 pozos para tomar la lectura de absorbancia de la placa a 620 nm. Aunque la absorbancia máxima ocurre a 570 nm, se pueden hacer lecturas incluso a 630 nm, mientras se encuentre dentro de la curva de absorbancia (Riss *et al.*, 2016). Los datos se normalizaron con respecto al control (DMEM-F12) como el 100 % de viabilidad. Se hicieron tres ensayos independientes.

Ensayo de scratch (reparación de herida)

El ensayo de cierre de herida *in vitro* en monocapas celulares (*in vitro* wound healing scratch assay) es un modelo sencillo para evaluar la migración celular, al mimetizar este proceso que ocurre durante el cierre de heridas *in vivo* (Liang *et al.*, 2007). Este ensayo ha sido usado por diferentes autores como un modelo para evaluar o predecir el potencial de diferentes compuestos o tratamientos para acelerar el cierre o reparación de heridas cutáneas (Walter *et al.*, 2010), por lo que se decidió evaluar los extractos de vismia y tepozán bajo condiciones similares a las de Dinda *et al.* (2015).

Se sembraron 45,500 FBH por pozo en placas Costar de 12 pozos y se cultivaron con DMEM-F12 complementado hasta alcanzar 80 % de confluencia celular. A partir de estas monocapas celulares se simuló una herida, al hacer un rayado con una punta estéril de micropipeta (Axygen) de 1000 µL. Los restos celulares fueron removidos con PBS. Inmediatamente después se aplicaron 800 µL del tratamiento correspondiente y se tomaron fotografías

(5X) de la herida en un microscopio invertido (Carl Zeiss, Thornwood, NY, EUA) al tiempo 0 h. Las muestras se incubaron por 24 h a 37 °C y 5 % CO₂. Posteriormente, se tomaron fotografías (t = 24 h) de la misma zona que se fotografió al tiempo 0 h. Primero se evaluaron los extractos de tepozán y vismia (5, 10, 50 y 100 µg mL⁻¹) para determinar el efecto de las dos especies sobre la promoción del cierre de la herida en la monocapa.

Una vez que se descubrió que tepozán presentó mayor potencial, se evaluaron los extractos de diferente polaridad en las dosis de 5, 10 y 50 µg mL⁻¹ con el mismo procedimiento. Como controles se usaron el vehículo DMSO (concentraciones presentes en los tratamientos) y DMEM-F12 (sin DMSO ni extracto) para conocer el proceso natural del cierre de la herida en las monocapas. Los ensayos se hicieron por triplicado. Las micrografías se analizaron con el software Tscratch (ETH Zürich, Suiza) que analiza las micrografías a partir de un algoritmo que permite medir el porcentaje del área que ocupa la herida con respecto al área total. Posteriormente, se aplicó la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de cierre de la herida ocurrido a las 24 h de cultivo con tratamiento, con respecto al área inicial de cada herida (0 h de cultivo con los tratamientos):

$$\% \text{ de cierre de la herida} = \frac{(T_i - T_f) \times 100}{T_i}$$

donde: T_i es el porcentaje de área ocupada por la herida a 0 h respecto del área total analizada y T_f es el porcentaje que ocupó la herida a las 24 h de cultivo con tratamiento, con respecto al área total analizada. El área analizada de la monocapa fue la misma a las 0 y 24 h.

Actividad inhibitoria contra *Pseudomonas aeruginosa*

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 fue donada por el Dr. Rodolfo García Contreras de la UNAM; corresponde a un aislado clínico de un paciente con quemaduras, previamente caracterizada por Kukavica-Ibrulj *et al.* (2008). La bacteria se reactivó con medio Luria Bertani (LB) sólido (Sigma Aldrich) y se incubó a 35 °C por 24 h. Para preparar el inóculo se homogenizaron de dos a tres colonias en 10 mL de medio LB líquido, se incubó por 8 h a 35 °C con agitación orbital. El inóculo se ajustó a una densidad óptica de 0.025 ($\approx 1 \times 10^6$ UFC) a 600 nm en un espectrofotómetro. El método de microdilución se realizó de acuerdo con Al-Bayati y Al-Mola (2008).

En placas Costar de 96 pozos se agregaron 200 µL del inóculo por pozo ($\approx 1 \times 10^5$ UFC). Se adicionó la cantidad necesaria de extracto de vismia o tepozán previamente disuelto en DMSO, las concentraciones finales fueron de 1, 10, 100 y 1000 µg mL⁻¹. También se colocaron pozos

con agua estéril o DMSO (control negativo) y como control positivo se usó colistina (concentración fija de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y se tomó la lectura para restar la absorbancia de fondo. Finalmente, se incubaron todas las muestras a 28 °C con agitación orbital para reducir la evaporación de los pozos. Se tomaron las absorbancias a 3, 6, 9 y 12 h. Se hicieron tres ensayos independientes con seis réplicas en cada caso.

Análisis estadístico

Los datos se promediaron y se muestran con \pm ee (error estándar). Se hicieron análisis de varianza de una vía con comparación de Dunnett's (GraphPad Prism5). Se consideraron diferencias significativas $P < 0.05$ y $P < 0.01$, las que se representaron como * y **, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Viabilidad celular, ensayo de MTT

Ninguno de los extractos de CH_2Cl_2 -metanol de vismia ni de tepozán mostró un efecto citotóxico en los cultivos celulares a las 24 h de incubación (Figura 1), pues ninguno de los tratamientos disminuyó más del 50 % la actividad metabólica-viabilidad de los FBH con respecto al control (Riss *et al.*, 2016). Tampoco se encontró un efecto citotóxico por parte de los extractos de diferente polaridad de tepozán (TMeOH, THex y TAcOEt) (Figura 2) ni de los controles con DMSO con respecto al control (DMEM-F12).

Previamente Mensah *et al.* (2001) evaluaron el potencial de proliferación de fibroblastos tratados con el extracto acuoso de *B. globosa* mediante el ensayo de rojo neutral, en el que se encontró que a 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ el extracto favorece la proliferación celular, pero con 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se presentó un efecto tóxico. Nuñez *et al.* (2013) estudiaron la actividad citotóxica de *V. guianensis* en células de riñón de embrión de mono, en el ensayo de MTT; encontraron que a partir de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ los extractos hexánicos de hojas inducen muerte celular, mientras que el extracto metanólico no tuvo efecto citotóxico, incluso a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En el presente estudio no se encontró efecto citotóxico en ninguno de los tratamientos evaluados, tanto de vismia como de tepozán, lo cual se puede deber a que corresponden a especies diferentes a las ya reportadas, o a que no se evaluaron dosis mayores de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Cierre de herida *in vitro*; ensayo de "scratch" en monocapas celulares

En los ensayos de herida *in vitro* donde se evaluaron los extractos de vismia y tepozán se encontró que el extracto de tepozán (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) incrementó significativamente el cierre de la herida en la monocapa a las 24 h con respecto al control (DMEM-F12). El extracto de vismia no mostró una mejora significativa en ninguna dosis (Figura 3).

Al evaluar los extractos de diferente polaridad de tepozán (THex, TAcOEt y TMeOH) se encontró que ninguno de los tratamientos incrementó significativamente el cierre de la herida en la monocapa celular con respecto al control (Figura 4); sin embargo, los tratamientos de TMeOH (5 y

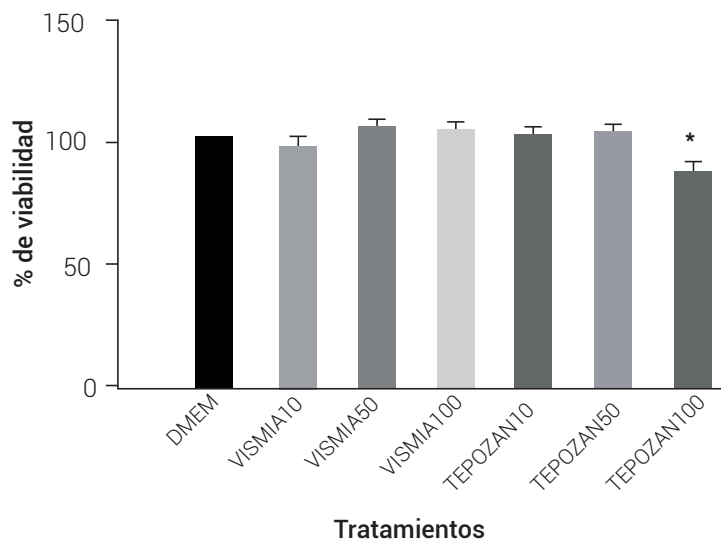


Figura 1. Ensayo de MTT a las 24 h de incubación celular en presencia de extractos de CH_2Cl_2 -metanol de vismia y tepozán. *: $P \leq 0.05$ con respecto al control DMEM-F12.

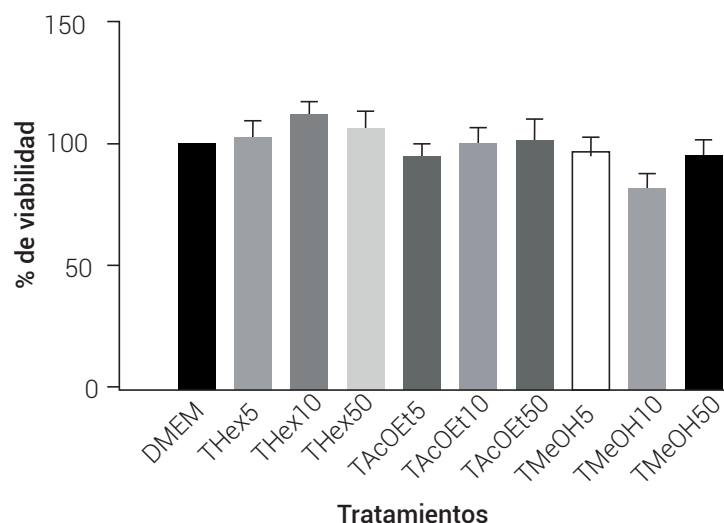


Figura 2. Ensayo de MTT a las 24 h de incubación celular en presencia de extractos de diferente polaridad de tepozán (Hexano, THex; Acetato de etilo, TAcOEt y metanólico, TMeOH). No existen diferencias significativas, con respecto al control DMEM-F12.

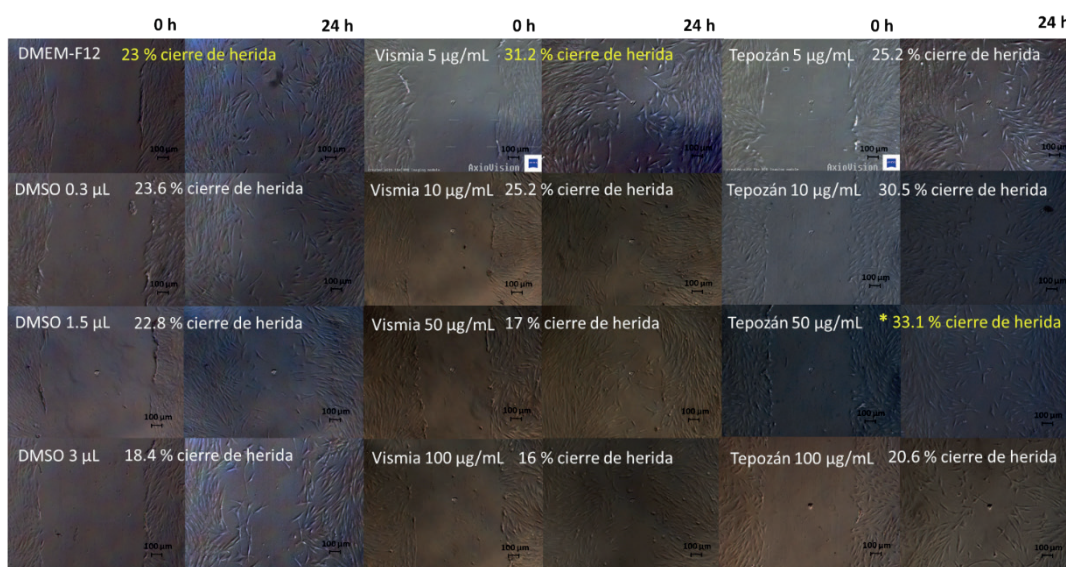


Figura 3. Ensayo de herida "scratch" con los extractos de CH₂Cl₂-metanol de vismia y tepozán. Micrografías de 0 y 24 h. Promedio del porcentaje de cierre de herida por tratamiento. *: P ≤ 0.05 con respecto al control DMEM-F12.

10 µg mL⁻¹) mostraron el mayor porcentaje de cierre de la herida. El tratamiento con DMSO:DMEM-F12 no tuvo efecto en el cierre de la herida.

Estos efectos sugieren que el extracto de tepozán (CH₂Cl₂-MeOH), al ser más complejo, podría estar presentando un efecto sinérgico de sus componentes, lo que potencia su actividad, la cual disminuye al fraccionarlo. Un resultado similar se presentó en el trabajo de Dinda *et al.* (2016), donde los extractos presentaron una actividad

diferenciada dependiendo de su polaridad, los extractos más polares fueron más activos. El extracto de CH₂Cl₂-MeOH presentó compuestos de baja, mediana y alta polaridad, mientras que el extracto metanólico (TMeOH) sólo presentó compuestos polares, como los fenoles (Aleixandre-Tudo *et al.*, 2018). No hay estudios que hayan evaluado extractos del género *Buddleja* en el modelo de cierre de herida *in vitro*; sin embargo, sí existen estudios que han evaluado otras especies.

Tonin *et al.* (2016) evaluaron la actividad cicatrizante del extracto metanólico de *Rubus imperialis*, el cual fue efectivo de 1 a 100 µg mL⁻¹; el mayor efecto fue a 10 µg mL⁻¹, mientras que Lee *et al.* (2016) encontraron que el extracto metanólico de *Piper cambodianum* fue efectivo de 1 a 50 µg mL⁻¹, con mayor actividad a 10 µg mL⁻¹. En este estudio se observó efecto positivo de 10 a 50 µg mL⁻¹, lo cual es semejante a lo encontrado en otras especies.

Previamente, Estrada-Zúñiga *et al.* (2009) analizaron el extracto metanólico de hojas de *B. cordata* por HPLC-UV; encontraron seis compuestos en dicho extracto, cuatro ácidos (cafeíco, cumárico, ferúlico y sinápico) y dos feniletanoides (linarina y verbascosido como compuesto mayoritario). El verbascosido aislado de *Verbascum mucronatum* Lam. tiene actividad cicatrizante *in vivo* (en modelos de escisión e incisión a los 10 y 12 d), efecto antiinflamatorio al inhibir el edema de pata trasera en rata (200 mg kg⁻¹) y actividad antinociceptiva en un 50 a 67 % (Akdemir *et al.*, 2010), también presenta un efecto antioxidante con un porcentaje de protección del 68 al 88 % (Mensah *et al.*, 2001), efecto fotoprotector *in vitro* contra la radiación UV-B (Ávila *et al.*, 2005) e inhibe la agregación plaquetaria (Campo *et al.*, 2012). Todas estas actividades favorecen el cierre de la herida de forma gradual, lo que evita anomalías en la cicatrización.

Todo lo anterior sugiere la presencia del verbascosido en los extractos de tepozán del presente estudio, lo que ayuda a potenciar el cierre de la herida *in vitro* en las concentraciones activas; sin embargo, es necesario estudiar la composición química de los extractos para corroborar la presencia de este compuesto. También se

deben estudiar los posibles mecanismos celulares sobre los que estarían actuando los extractos de *B. cordata*.

Actividad inhibitoria contra *Pseudomonas aeruginosa*

Ninguno de los tratamientos de tepozán y vismia tuvo actividad inhibitoria contra *P. aeruginosa*. Estos resultados no fueron los esperados, pues ambos géneros (*Buddleja* y *Vismia*) cuentan con estudios previos que avalan su efecto antimicrobiano. En el caso de *Buddleja*, Ali *et al.* (2011) demostraron que *B. asiatica* tiene efecto contra *P. aeruginosa* en el modelo de difusión en agar en dosis mayores a las estudiadas en el presente trabajo. Kuete *et al.* (2007), Núñez *et al.* (2013) y Salas *et al.* (2007) evaluaron a *V. laurentii*, *V. guianensis* y *V. baccifera*, respectivamente, en las que encontraron efecto inhibitorio contra la misma bacteria en el modelo de difusión en agar, al usar dosis mayores a las aquí estudiadas. Dados los resultados obtenidos y que no se observó un efecto de dosis dependiente (datos no mostrados), no se evaluaron otros extractos ni otras dosis de tepozán y vismia.

CONCLUSIONES

El extracto de CH₂Cl₂-MeOH, y en menor medida el extracto metanólico de *B. cordata*, presentaron un incremento en el cierre de herida en el modelo *in vitro* en monocapa utilizado en el presente estudio. Ninguno de los tratamientos presentó actividad citotóxica en fibroblastos humanos. No se encontraron efectos antibacterianos contra *Pseudomonas aeruginosa*.

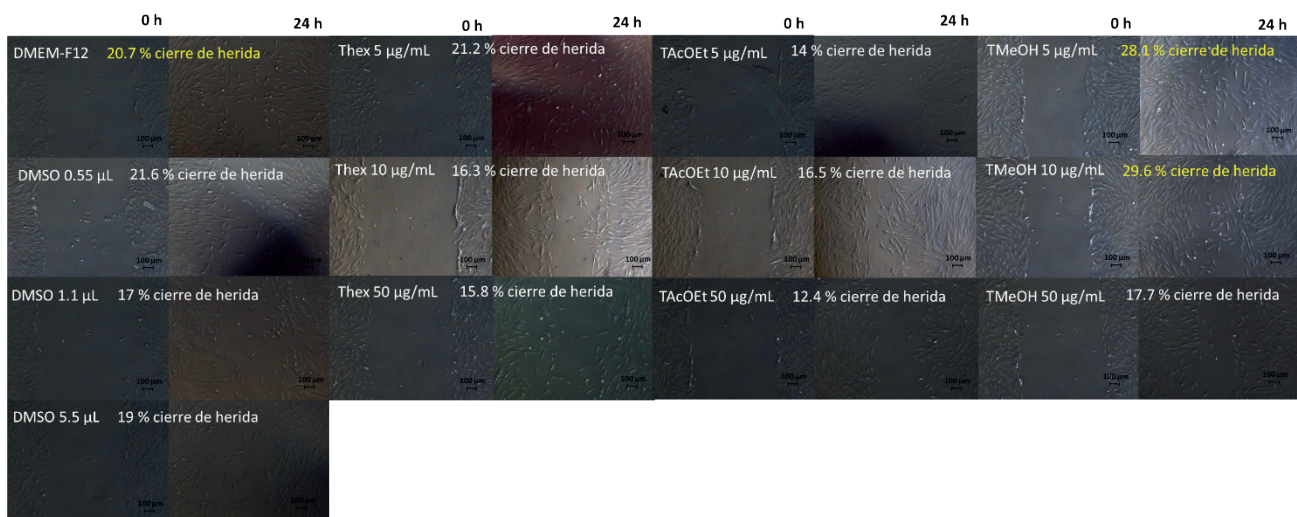


Figura 4. Ensayo de herida "scratch" con los extractos de diferente polaridad de tepozán. Micrografías a 0 y 24 h. Promedio del porcentaje de cierre de herida por tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Akdemir Z., C. Kahraman, I. I. Tatli, A. E. Küpeli, I. Süntar and H. Keles (2010) Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory, antinociceptive and wound healer glycosides from the flowers of *Verbascum mucronatum* Lam. *Journal of Ethnopharmacology* 136:436-443, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.059>
- Al-Bayati F. A. and H. F. Al-Mola (2008) Antibacterial and antifungal activities of different parts of *Tribulus terrestris* L. growing in Iraq. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 9:154-159, <https://doi.org/10.1631/jzus.B0720251>
- Alexandre-Tudo J. L. and W. du Toit (2018) Cold maceration application in red wine production and its effects on phenolic compounds: a review. *LWT – Food Science and Technology* 95:200-208, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.096>
- Ali F., I. Ali, H. U. Khan, A. U. Khan and A. H. Gilani (2011) Studies on *Buddleja asiatica* antibacterial, antifungal, antispasmodic and Ca⁺⁺ antagonist activities. *African Journal of Biotechnology* 10:7679-7683.
- Argueta V. A. (1994) Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México, D. F. 1786 p.
- Ávila A. J. G., A. M. Espinosa G., D. Matamoros M. C., J. C. Benítez F., T. Hernández D., S. Flores M., J. L. Muñoz L. and A. M. García B. (2014) Photoprotection of *Buddleja cordata* extract against UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14:281, <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-281>
- Ávila A. J. G., C. M. C. Castañeda, F. J. C. Benítez, D. A. Durán, V. R. Barroso, C. G. Martínez, L. J. L. Muñoz, C. A. Martínez and A. Romo de Vivar (2005) Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. *Fitoterapia* 76:301-309, <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.03.009>
- Campo G., J. Marchesini, L. Bristot, M. Monti, S. Gambetti, R. Pavasini, A. Pollina and R. Ferrari (2012) The *in vitro* effects of verbascoside on human platelet aggregation. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 34:318-325, <https://doi.org/10.1007/s11239-012-0757-z>
- Chen Q., K. Y. Fung, Y. T. Lau, K. M. Ng and D. T. W. Lau (2016) Relationship between maceration and extraction yield in the production of Chinese herbal medicine. *Food and Bioprocess Technology* 98:236-243, <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.02.005>
- Dinda M., U. Dasgupta, N. Singh, D. Bhattacharyya and P. Karmakar (2015) PI3K-mediated proliferation of fibroblasts by *Calendula officinalis* tincture: implication in wound healing. *Phytotherapy Research* 29:607-616, <https://doi.org/10.1002/ptr.5293>
- Dinda M., S. Mazumdar, S. Das, D. Ganguly, U. B. Dasgupta, A. Dutta, K. Jana and P. Karmakar (2016) The water fraction of *Calendula officinalis* hydroethanol extract stimulates *in vitro* and *in vivo* proliferation of dermal fibroblasts in wound healing. *Phytotherapy Research* 30:1696-1707, <https://doi.org/10.1002/ptr.5678>
- Estrada-Zúñiga M. E., F. Cruz-Sosa, M. Rodríguez-Monroy, J. R. Verde-Calvo and E. J. Vernon-Carter (2009) Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 97:39, <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9496-z>
- Gallardo V. G. J. y L. Barboza M. (2015) Efecto cicatrizante del gel elaborado del látex de *Croton lechleri* "Sangre de Drago". *Revista Científica Ciencia Médica* 18:10-16.
- Guarín-Corredor C., P. Quiroga-Santamaría y N. S. Landínez-Parra (2013) Proceso de cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas. *Revista de la Facultad de Medicina* 61:441-448.
- Houghton P. J., P. J. Hylands, A. Y. Mensah, A. Hensel and A. M. Deters (2005) *In vitro* tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. *Journal of Ethnopharmacology* 100:100-107, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.07.001>
- Kuete V., J. R. Nguemeving, V. P. Beng, A. G. B. Azebaze, F. X. Etoa, M. Meyer, B. Bodo and A. E. Nkengfack (2007) Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). *Journal of Ethnopharmacology* 109:372-379, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.07.044>
- Kukavica-Ibrulj I., A. Bragonzi, M. Paroni, C. Winstanley, F. Sanschagrin, G. A. O'Toole and R. C. Levesque (2008) *In vivo* growth of *Pseudomonas aeruginosa* strains PA01 and PA14 and the hypervirulent strain LESB58 in a rat model of chronic lung infection. *Journal of Bacteriology* 190:2804-2813, <https://doi.org/10.1128/JB.01572-07>
- Lee H., Y. Hong, S. H. Kwon, J. Park and J. Park (2016) Anti-aging effects of *Piper cambodianum* P. Fourn. extract on normal human dermal fibroblast cells and a wound-healing model in mice. *Clinical Interventions in Aging* 11:1017-1026, <https://doi.org/10.2147/CIA.S107734>
- Leise B. S. (2018) Topical wound medications. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 34:485-498, <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2018.07.006>
- Liang C. C., A. Y. Park and J. L. Guan (2007) *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nature Protocols* 2:329-333, <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
- Mensah A. Y., J. Sampson, P. J. Houghton, P. J. Hylands, J. Westbrook, M. Dunn, M. A. Hughes and G. W. Cherry (2001) Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. *Journal of Ethnopharmacology* 77:219-226, [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00297-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00297-5)
- Muthukumar T., K. Anbarasu, D. Prakash and T. P. Sastry (2014) Effect of growth factors and pro-inflammatory cytokines by the collagen biocomposite dressing material containing *Macrotyloma uniflorum* plant extract - *In vivo* wound healing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 121:178-188, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.06.018>
- Nuñez R., J. Rojas, M. Lucena, A. Roa y P. Meléndez (2013) Evaluación de la actividad antibacteriana y efecto citotóxico de extractos obtenidos de la especie *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. (Hypericaceae). *Revista de la Facultad de Farmacia de la Universidad de los Andes* 55:29-34.
- Riss T. L., R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella and L. Minor (2016) Cell viability assays. In: *Assay Guidance Manual*. G. S. Sittampalam, N. P. Coussens, K. Brimacombe, A. Grossman, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, J. Baell, B. Bejcek, J. M. M. Caaveiro, T. D. Y. Chung, J. L. Dahlin, V. Devanaryan, T. L. Foley, M. Glicksman, M. D. Hall, J. V. Haas, J. Inglese, P. W. Iversen, S. D. Kahl, S. C. Kales, M. Lal-Nag, and Z. Li, J. McGee, O. McManus, T. Riss, O. J. Trask, J. R. Weidner, M. J. Wildey, M. Xia and X. Xu (eds.). Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Bethesda, Maryland, USA. pp:355-385.
- Salas F., J. Velasco, J. Rojas and A. Morales (2007) Antibacterial activity of the crude extract and constituents of *Vismia baccifera* var. *dealbata* (Guttiferae) collected in Venezuela. *Natural Product Communications* 2:185-188.
- Tonin T. D., L. C. Thiesen, M. L. de Oliveira N., M. F. Broering, M. P. Donato, M. J. Goss, M. Petreanu, R. Niero, I. D. Machado and J. R. Santin (2016) *Rubus imperialis* (Rosaceae) extract and pure compound nigaichigoside F₁: wound healing and anti-inflammatory effects. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 389:1235-1244, <https://doi.org/10.1007/s00210-016-1285-8>
- Valadeau C., J. A. Castillo, M. Sauvain, A. F. Lores and G. Bourdy (2010) The rainbow hurts my skin: medicinal concepts and plants used among the Yanasha (Amuesha), an Amazonian Peruvian ethnic group. *Journal of Ethnopharmacology* 127:175-192, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.09.024>
- Velasquillo C., P. Silva-Bermúdez, N. Vázquez, A. Martínez, A. Espadín, J. García-López, A. Medina-Vega, H. Lecona, R. Pichardo-Baena, C. Ibarra and K. Shirai (2017) *In vitro* and *in vivo* assessment of lactic acid-modified chitosan scaffolds for potential treatment of full-thickness burns. *Journal of Biomedical Materials Research A* 105:2875-2891, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36132>
- Walter M. N. M., K. T. Wright, H. R. Fuller, S. MacNeil and W. E. B. Johnson (2010) Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an *in vitro* study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Experimental Cell Research* 316:1271-1281, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.026>
- Wu Y. K., N. C. Cheng and C. M. Cheng (2018) Biofilms in chronic wounds: pathogenesis and diagnosis. *Trends in Biotechnology* 1722:1-13, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.011>