Trabajo científico

Estudios preliminares de caracterización y acción cicatrizante de nanomatrices de ZnO con extracto de *Plantago major* en la piel de rata

Preliminary studies of the cicatrization action of ZnO nanomatrices of *Plantago major* extract in rat skin

Samuel Treviño,¹ Javier Aguila-Rosas,² Marco Antonio Gonzalez-Coronel,³ Genaro Carmona-Gutierrez,² Efrain Rubio-Rosas,⁴ Gustavo López-López,³ Jose Albino Moreno-Rodriguez,² Alfonso Díaz³

 ¹Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México
²Departamento de Química General, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México
³Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México
⁴Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México

Resumen

El uso de extractos con acción cicatrizante resulta una manera sencilla y económica en el tratamiento de heridas. Al combinarlo con formas farmacéuticas que optimizan la acción del tratamiento, se obtiene una alternativa que aventaja a las existentes. En el presente trabajo se logró acoplar dos potenciales favorecedores de la cicatrización (ZnO y extracto de *Plantago major*) en nanomatrices. Caracterizadas por SEM: ZnO= 720 nm, largo; 420 nm, base; *Pm*/ZnO= 500 nm, largo; 70 nm, base. Mientras el análisis de FTIR mostró interacción de las nanomatrices con *Pm* en las regiones 3651.4 cm⁻¹ y 3402.9 cm⁻¹ correspondientes a los glucósidos aucubina, y en la región 2088 cm-1 corresponde al benceno de la misma, como las de mayor relevancia. Finalmente, las nanomatrices diseñadas mostraron mejores resultados cicatrizantes que sus componentes por separado respecto del control en un 22.5, 37.5, 40, 72.5 y 85 % a los 3, 6, 9, 12 y15 días, respectivamente. Por lo que, la administración tópica de nanomatrices de *Pm*/ZnO, poseen un potencial terapéutico a considerar como tratamiento en lesiones de la piel.

Abstract

The application of extracts with healing action is a simple and inexpensive manner in the treatment of wounds. In combination with pharmaceuticals forms which improve the effects of treatment, is obtained an alternative that surpasses the existing. In this work was possible to couple two potentials flattering of healing (ZnO and extract of *Plantago major*) in nanomatrices. SEM characterization showed ZnO nanomatrices of 720 nm, long; 420 nm, base; *Pm/*ZnO= 500 nm, long; 70 nm, base. Meanwhile, FTIR analysis showed the interaction nanomatrix-*Pm* in the regions 3651.4 cm⁻¹ y 3402.9 cm⁻¹ corresponding to glucosides of aucubina, and in the region 2088 cm⁻¹ to to benzene thereof, being the most important. Finally, the nanomatrix designed showed better results on healing than its components by separate respect to the control in 22.5, 37.5, 40, 72.5 y 85 % at 3, 6, 9, 12 and 15 days, respectively. Therefore, the local administration of nanomatrices of Pm/ZnO possess a terapeutic potential to consider as treatment in lesions of skin.

Palabras clave: *Plantago major*, cicatrizantes, infrarrojo, microscopia electronica, nanomatrices de ZnO.

Key words: *Plantago major*, cicatrization, infrared, electron microscopy, matrices of ZnO.

Correspondencia:

Dr. Alfonso Díaz Fonseca Departamento de Farmacia Facultad de Ciencias Químicas Benemérita Universidad Autónoma de Puebla 14 sur y Av. San Claudio, Colonia San Manuel CP. 72570, Puebla, México

Tel: 2295500, Ext.7390

email: alfonso.diaz@correo.buap.mx

Fecha de recepción: 09 de septiembre de 2014 Fecha de recepción de modificaciones:

04 de marzo de 2015

Fecha de aceptación: 07 de abril de 2015

Introducción

El extracto de *Plantago major* (Pm) es comercializado y utilizado para diferentes afecciones en paises de Sudamerica y Mexico. Por ser una planta común de fácil localización, no se cultiva y se le considera una maleza. Generalmente se le puede hallar en zonas de pastos, laderas, cerca de cultivos y en los bordes de caminos. 1,2,3 El Pm se ha instaurado como alternativa alópata debido a sus propiedades antiinflamatorias, antibacterianas. astringentes antihemorrágicas.^{4,5} Particularmente, la injerencia del Pm sobre la hemostasia está en relación a la activación de factores que inducen coagulación favoreciendo el proceso de cicatrización y previenen el riesgo de infecciones. Su aplicación sobre quemaduras de piel ayuda a atenuar el dolor, debido a que presenta una cadena larga de alcoholes primarios presentes en la cera de sus hojas. Así mismo, la propiedad de cicatrización se atribuye a la presencia de taninos, glucósidos y alantoinas, esta última se caracteriza por estimular la regeneración de la epidermis.⁴ Los reportes indican que la mejor manera de obtener los principios activos del Pm es a partir de una extracción empleando una mezcla de disolventes alcohol-agua (70 mL: 30 mL). A una temperatura no mayor de 65-75 °C.5, 6, 7

Por otro lado, la ingeniería de los nanomateriales tiene gran importancia en el diseño de nuevas formas farmaceuticas, para incrementar y prolongar el efecto terapeutico de fármacos dirijidos a diversas enfermedades debido a que mantenienen una concentración constante en el sitio de acción. Una gran variedad de sistemas se han desarrollado y utilizados, incluyendo liposomas, micelas, dendrímeros, y co-polímeros. Recientemente, los nanomateriales de óxido de zinc (ZnO) han llamado la atención como posibles sistemas de liberación. Las nanomatrices de ZnO, son químicamente inertes, hidrofílicas y de fácil síntesis, además de que poseen alta resistencia mecánica y baja toxicidad.

El ZnO, además de ser útil como matrices para transportar y estabilizar al fármaco durante el tratamiento, también posee propiedades terapéuticas sobre las irritaciones y heridas superficiales por su efecto astringente y antibacterial en las concentraciones adecuadas, protegiendo la lesión de infecciones. ^{10,11} Para las lesiones y quemaduras en piel es recomendable su aplicación en polvo y en cremas sobre la parte afectada, quedando una fina capa protectora. En el proceso de cicatrización el zinc tiene un papel importante, debido a que forma parte de las metaloproteinasas implicadas en la reparación celular en el sitio de la lesión por degradación de colágeno y facilitan la migración de queratinocitos. ¹² Así mismo, se ha reportado que la administración de ZnO tanto oral como tópica en personas con niveles bajos de este metal en

sangre y tejidos, mejora los procesos de regeneración celular y aceleran la reparación de heridas en la piel. ¹³ En este sentido, nosotros realizamos la síntesis de nanomatrices las cuales presentan una degradación lenta en condiciones tópicas por lo se les considera como una estrategia terapéuticas de liberación controlada o de liberación continua. ¹⁴ Por lo que la fusión de dos potenciales moléculas con propiedades cicatrizantes fue empleada para la elaboración de nanomatrices de ZnO con el extracto de *Pm* a través de método de sol-gel (nombradas como Pm/ZnO), la cual permita potenciar el proceso de cicatrización. De ahí que el objetivo de este trabajo fue evaluar la acción cicatrizante de las nanomatrices de Pm/ZnO en una lesión de piel en rata.

Materiales y métodos

Extracción del extracto de Plantago major

Las hojas de *Pm* se recolectaron en la zona urbana de Puebla, las cuales fueron autentificadas por el personal experto del jardín botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), bajo criterios botánicos de tamaño y grosor de tronco y de hojas la cuales mostraron las siguientes características: alternas, todas basales, dispuestas en roseta, gruesas y algo coriáceas, pecíolo acanalado, verdoso, a veces de color púrpura en la base, de 4 a 20 cm de largo, láminas ovadas, elíptico-ovadas o cordado-ovadas hasta orbicular-ovadas, de 4 a 15 cm de largo y de 3 a 12 cm de ancho, ápice obtuso, margen entero o ligeramente ondulado y con frecuencia irregularmente dentado, base prolongada hacia el tallo o pecíolo, con o sin pelos, venas por lo general divergentes desde la base, 3 a 5, paralelas. Las hojas fueron lavadas con agua y desinfectadas con hipoclorito de sodio (80 ppm), posteriormente se secaron a temperatura ambiente durante 15 días, se pulverizaron y maceraron completamente en etanol al 96 % (2:50, planta:disolvente). Con la ayuda del Soxhlet se obtuvo el extracto se filtro y finalmente se concentró a 65 °C a través de un rotavapor. El producto concentrado fue empleado para formar las nanomatrices de Pm/ZnO.7

Preparación de las nanomatrices de Plantago major / ZnO

En un sistema por reflujo con agitación constante y a una temperatura de 70 °C, se preparó una solución homogénea con 150 mL de alcohol butílico, 10 mL de agua desionizada, 0.5 g de polivinilpirrolidona y 2 mL de extracto de *Pm.* A 70 °C de reflujo se agregó (a la solución) gota a gota 21.5 mL de solución ZnO (97 %, Sigma-Aldrich). La solución final con propiedades de gel se sumergió en un recipiente con hielo por 15 min a 3 °C. Se eliminó el disolvente en un rotavapor a 40 °C con vacío. Se obtuvieron las nanomatrices de Pm/ZnO.¹⁵

Las nanomatrices de Pm/ZnO se caracterizaron por los métodos referidos como apropiados que correspondieron a la microscopia



electrónica de barrido (SEM) (JEOL JSM-6610LV) y la técnicas de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) (Digilab SCMITAR).

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (n=20) proporcionadas por el Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. El rango de peso fue de 310 - 360 gramos. El uso y cuidado de los animales se realizó en concordancia con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y al comité de investigación de usos de animales de laboratorio de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Protocolo de administración

Se formaron cuatro grupos experimentales (n = 5 por grupo): 1) Control: lesión; 2) lesión + extracto de Pm (100μ L) y 3) lesión + nanomatrices de ZnO vacías (50 mg) y 4) lesión + nanomatrices de Pm /ZnO (50 mg).

Los animales fueron previamente anestesiando con ketamina-xilacina (0.2mL/100g) y con una navaja de bisturí se generó una lesión de 2 cm de largo en la piel a nivel de cavidad craneal. Posteriormente se aplicaron los tratamientos respectivos de forma tópica en el área de la lesión. Al término de la aplicación de cada tratamiento, los animales fueron administrados con bencilpenicilina (20 UI) durante tres días. Los animales fueron alojados en cajas de acrílico individuales con libre acceso de agua y alimento. En los días 0. 3, 6, 9, 12 y 15 posterior a la lesión, los animales fueron pesados y se midió la longitud de la lesión para obtener el porcentaje de retracción de la herida con la siguiente fórmula:

% de retraccion de la herida=
$$\frac{(do-dt)}{do}$$
 x 100

Donde:

do: Longitud inicial de la herida en el día 0 (2 cm) dt: Longitud de la herida después de la incisión en los 3, 6, 9, 12 y 15 días.

Análisis estadístico

Las datos fueron expresados como la media ± el error estándar de la media (ESM) para todos los experimentos. El análisis estadístico se desarrolló, por medio de una ANOVA de una vía y un nivel de confianza de 95 % y cuando fue necesario, se compararon las medias aplicando la prueba de Bonferroni.

Resultados y discusión

La cicatrización es un proceso complejo y concatenado de una variedad de células y componentes de matrices que actúan en la reparación del daño tisular, regulando procesos de hemostasia, inflamación, proliferación celular (reparación) y remodelamiento tisular. ¹⁶ En el presente estudio se abordó la acción cicatrizante de las nanomatrices de Pm /ZnO en la piel de rata después de generar una lesión de 2 cm de longitud en la cavidad craneal. Con la finalidad de evaluar si las nanomatrices de ZnO con el extracto de *Pm* podrían acelerar la cicatrización en la piel de rata lesionada.

Los resultados del presente trabajo obtenidos por la técnica de SEM muestran que los nanomateriales de ZnO presentan una morfología estructural cristalina hexaédrica (Fig. 1 A). En donde los prismas muestran diferentes tamaños, los más grandes tienen una dimensión en promedio de 720 nm de largo y 420 nm de base, mientras que los más pequeños presentan una dimensión en promedio de 150 nm de largo y 50 nm de base. Por otra parte la micrografía del material de Pm /ZnO (Fig. 1B y 1C) proporciona información sobre la topografía superficial, la cual permite determinar la homogeneidad y tamaño promedio de las partículas a un aumento de 5,000 y 10,000 X. Cuando aplicamos un aumento de 40,000 X se observa una morfología de partículas semialargadas cristalinas, en donde el tamaño promedio de estas fue de 500 nm de largo y 70 nm de base, después la unión del *Pm* (Fig. 1C).

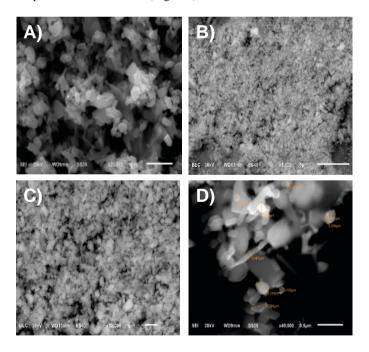


Figura 1. Fotomicrografías representativas de nanomatrices de ZnO a 40, 000X (A) y Pm / ZnO a 5,000X (B), 10,000X (C) y 40, 000X (D).

Así mismo, se desarrollaron los estudios de FTIR para ZnO, *Pm* y *Pm* /ZnO (Fig. 2), en donde los espectros de las nanomatrices de ZnO muestran una banda de absorción ubicada en 3883.8 cm⁻¹,

la cual representa el modo de vibración molecular de los grupos hidróxidos terminales (vO-H),17 enlazados en las aristas de los átomos de Zn del soporte (ZnO). En 3651.4 cm-1 y 3402.9 cm-1 se observa una banda de absorción ancha, que identifica al modo de vibración tipo alargamiento de los grupos hidroxilos correspondientes a los glucósidos aucubina (vO-H) asignados a los grupos hidroxilos (OH-) del agua (H-OH), disolvente (etanol, R-OH) y a la hidroxilación del gel (Zn-OH), que muestran la interacción de Pm con las nanomatrices de ZnO. Estos grupos funcionales se encuentran en los poros del ZnO formados durante la primera etapa de gelación. Los modos de vibración de alargamiento de tipo vC-H, ubicados en 2905.9 cm⁻¹, corresponden a las especies químicas C-H de los metilos (Zn-O-CH3) y en 2504.9 cm⁻¹ los grupos etóxi (Zn-OCH₂CH₂), que no llegaron a reaccionar durante la síntesis del ZnO.^{17, 18} La absorción en 2344.4 cm⁻¹, corresponde a las interacciones de las especies C-O del CO₂ atmosférico. La absorción en 2088 cm⁻¹ corresponde al benceno de la aucubina de Pm, la cual al formar parte de las nanomatrices desaparecen del espectro de IR. Hacia 1464 cm⁻¹ se ubican las vibraciones de alargamiento simétricas vCOO- y deformación δCH_3 .

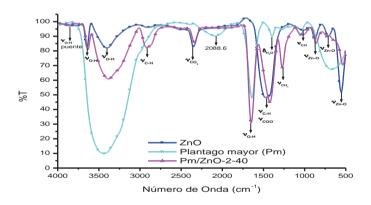


Figura 2. Figura 2. Espectro de FTIR de nanomatrices de ZnO, Pm/ZnO y Pm.

La banda de absorción localizada entre 1013.1 cm⁻¹, corresponde a vibraciones de tipo alargamiento de los grupos C-C (vC-C), y C-O (vC-O), las cuales se deben a especies metoxi, 19, 20 así como a disolventes, productos y subproductos de la reacción de síntesis del material. 21, 22 A regiones de baja energía del espectro, se observan tres bandas de absorción, ubicadas en 876.8 cm⁻¹, 708.9 cm⁻¹ y 554.5 cm⁻¹ que corresponden a vibraciones de tipo flexión de los grupos ZnO. 17, 21 Respecto al espectro de FTIR del nanomaterial *Pm*/ZnO, se pueden diferenciar con precisión los modos de vibración correspondientes al ZnO y al *Pm*, como se presenta en la Fig. 2. Por lo que con todo lo anterior se puede establecer que el *Pm* está presente en el nanomaterial de ZnO.

Una vez que las nanomatrices de Pm/ZnO fueron caracterizadas, se evaluó su acción cicatrizante en el sitio de la lesión en la piel de ratas. El primer parámetro a evaluar fue el peso de los animales como un indicador de estrés en respuesta a la lesión, se ha mostrado que durante una cirugía, y sobre todo en la recuperación existen estímulos anorexigenicos mediados por proteínas de fase aguda, citocinas e interleucinas, sobre el núcleo arcuato hipótalámico que conllevan a la pérdida de peso. La Fig. 3 muestra el control de peso realizado en los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15 del tratamiento. Los resultados nos indican que el peso de los animales de cada grupo experimental no se modificó en el curso de la evaluación de la actividad cicatrizante de los nanomateriales de Pm/ZnO. El peso de cada uno de los animales con los diferentes tratamientos osciló entre los 310 a 360 gramos, además el análisis estadístico no reveló cambios significativos con respecto al grupo control.

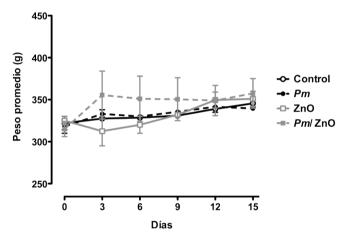


Figura 3. Evaluación del control de peso de los animales tratados con las nanomatrices de Pm/ZnO. Se emplearon ratas macho de 310 a 360 gramos con una lesión de 2 cm en la cavidad craneal. Se formaron 4 grupos: control, tratados con extracto de Pm, ZnO y nanomatrices (Pm/ZnO). El peso de los animales se registró a los 0, 3, 6, 9 12 y 15 días respecto a la administración local de los diferentes tratamientos. Los datos graficados corresponden a la media \pm el ESM. (ANOVA de una vía, post test de Bonferroni).

Para demostrar el efecto cicatrizante de las nanomateriales de *Pm*/ZnO, se determinó el porcentaje de retracción de la lesión craneal. Los resultados nos indican que el grupo control mostró una retracción gradual (%) del sitio de lesión durante el día 3 (10 %), 6 (25 %), 9 (30 %), 12 (35 %) y 15 (40 %). Por otra parte en el grupo tratado únicamente con el extracto, denotó un porcentaje de retracción de la lesión del 12.5, 32.5, 35, 50 y 60 % a los 3, 6, 9, 12, y 15 días, respectivamente. Asímismo la administración de ZnO registró un 30, 35, 40, 40, 50 % en los tiempos respectivos de seguimiento. Finalmente los datos obtenidos del grupo tratado con los nanomateriales con glucósidos del extracto mostraron mejores resultados que las

nanomatrices sin extracto o el extracto solo administrado tópicamente, correspondiendo al 22.5 % a los 3 días, 37.5 % a los 6 días, 40 % a los 9 días, 72.5 % a los 12 días y 85 % a los 15 días, respectivamente (Fig. 4). El análisis de ANOVA del % de retracción de la lesión craneal en cada uno de los tiempos respecto al grupo control, evidenció que el tratamiento de las nanomateriales con extracto fue estadísticamente significativo ($P \le 0.05$).

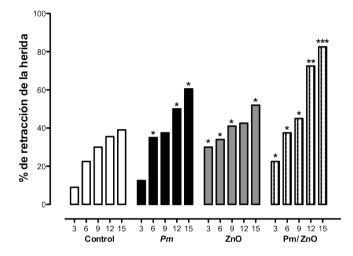


Figura 4. Evaluación de la actividad cicatrizante de las nanomatrices. Se emplearon ratas macho de 310 a 360 gramos con una lesión de 2 cm en la cavidad craneal. Se formaron 4 grupos: control, tratados con extracto de Pm, ZnO y nanomatrices (Pm/ZnO). La actividad cicatrizante se evaluó por medio del porcentaje de retracción de la lesión craneal de cada grupo experimental a los 3, 6, 9, 12 y 15 días después de la administración local de los diferentes tratamientos. Los datos graficados corresponden a la media \pm el ESM. (Control vs Pm, ZnO, Pm/ZnO en cada tiempo: ANOVA de una vía, *p < 0.05; **p< 0.01; ***p<0.001).

El extracto de Pm y el ZnO por separado ejercen de forma similar un efecto cicatrizante con respecto al grupo control. Debido a que el porcentaje de retracción de la lesión craneal del grupo tratado únicamente con el extracto de Pm incrementó de forma significativa respecto al control en el día 12 (50 %) y 15 (60 %). Mientras que el grupo tratado únicamente con el ZnO reveló un incremento significativo en los días 3, 6, 9 y 15 posteriores a la aplicación. El análisis del curso temporal del % de retracción de cada grupo experimental reveló que el tratamiento de las nanomatrices de Pm/ZnO expresa cambios significativos a partir del día 9, 12 y 15 en comparación a los diversos tratamientos. Esto sugiere que la velocidad de cicatrización del Pm/ZnO es mayor a largo plazo.

El ciclo de cicatrización – renovación tisular es en gran medida es debido a la redistribución del Zn a la zona de lesión, así como a los hepatocitos responsables de la síntesis de proteínas de

respuesta de fase aguda (estimulada por IL-1, IL-6 y TNF-α), las cuales pueden contener al bioelemento en su estructura, sitio catalítico, enlaces tiolicos y en aminoácidos aromáticos formando compuestos de coordinación.²³ El Zn forma parte de más de 300 proteínas presentes en el organismo, entre las que destacan polimerasas de DNA y RNA, transcriptasas inversas, proteasas y más de 70 metaloenzimas que tienen un papel central en la reconstrucción de la piel lesionada.^{24, 25}

Por lo que el Zn, es esencial para la actividad de muchas enzimas involucradas en la cicatrización, por ser un acelerador, precursor y cofactor del mecanismo de señalización en fibroblastos, células endoteliales y en la angiogénesis de la placa queratinosa que bloquea la herida. El grupo enzimático Zn dependiente de mayor relevancia en el proceso de cicatrización son las matrices metaloproteinasas (MMP), proteínas capaces de degradar los componentes de las matrices extracelulares y que exhiben diversidad de especificidad proteolítica en un rango importante de proteínas y glicoproteínas, en las que se incluyen citocinas y sus receptores, así como para moléculas de adhesión. Las MMP son sintetizadas por diversos grupos celulares en el sitio de la herida: macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y en menor proporción por queratinocitos, el Zn en ellas se encuentra unido al sitio catalítico, por lo que es indispensable para su actividad en el proceso cicatrización – reparación.²⁶

Por otro lado, va se han reportado los diferentes principios activos contenidos en el extracto de Pm.6, 7 Carbohidratos extraídos de la planta como glucosa, fructosa, xilosa y ramnosa actúan como inmuno estimulantes incrementando la fagocitosis 15 - 50 %, han sido usados con excelentes resultados en el tratamiento de úlceras e inflamación, utilizando dosis de 1.5 – 3 g/día. Ácidos grasos, como el araquidónico, triterpeno, oleanólico, ursólico y mayormente el palmítico han sido aislados y demostrado su efecto curativo en lesiones superficiales en conejos. Derivados del ácido cafeico, que se ha identificado como un potente antioxidante por secuestro de radicales libres,20 inhibidor de los efectos del ácido araquidónico^{24,25} y de las 5 y 15 lipooxigenasas.²⁶ Flovonides como baicaleina, hispidulina y plantaginina de los cuales se conoce a detalle su poder antiinflamatorio y antioxidante, secuestrando radicales libres e impidiendo lipoperoxidación.²⁷ Glucosidos Iridoideos, como la aucubina que aunque se encuentra presente en alrededor del 1.3 % del propiedades estracto presenta antiinflamatorias espasmolíticas. Vitaminas, como provitamina A, vitamina C y vitamina K.²⁸ Propiedades hacen del *Pm* una planta usada en la medicina tradicional como analgésico y antiinflamario, antioxidante, antihipertensivo, hipoglucemiante, diurético antiulcerogénico, anticancerígeno, inmunomodulador, antibiótico, antifúngico, antiviral y antiparasitario.¹

Por lo tanto el ZnO y el extracto de *Pm* coadyuvan para la recuperación de la lesión, mantiene constante el efecto farmacológico, acelerando la cicatrización (día 6 al 15).

Conclusión

Los experimentos de caracterización demostraron la presencia del Pm en las nanomatrices de ZnO, las cuales mostraron una mayor eficacia terapéutica que acelera la cicatrización generada en piel de rata. Por lo que estas nanomatrices poseen un potencial terapéutico importante a considerar en el tratamiento cicatrizante, pudiéndose emplear en un futuro como un sistema coadyuvante entre las propiedades del Zn y del glúcosido de Pm (aucubina), que se liberó en las lesiones dérmicas de los sujetos de estudio.

Agradecimientos

Al Dr. Carlos Escamilla Weinmann, director de bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por haber proporcionado los animales de experimentación. Este trabajo fue apoyado parcialmente por la Dirección de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP.

Referencias

- Samuelsen AB. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of Plantago major L. J Ethnopharmacol. 2000; 71,1-2: 1-21.
- Campos JL. Plantaginaceae. In: Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. 2001; 1: 719-724. 2001.
- 3. Scott TL, Buhner SH. Invasive Plant Medicine: The Ecological Benefits and Healing Abilities of Invasives. Inner Traditions Bear & Co. 2010; 1: 253-255.
- 4. Zubair M. Genetic and environmental effects on polyphenols in Plantago major. Introductory Paper at the Faculty of Landscape Planning, Horticulture and Agricultural Science. 2010; 1-30.
- Aguila-Rosas J, Moreno-Rodriguez JA, Rubio Rosas E, Díaz A. Encapsulation of glycosides from extract Plantago major in ZnO matrices. Vía Sol-gel. J Mat Sc and Eng A & B. 2014; in press.
- 6. Aziz SA, See TL, Khuay LY, Osman K, Abu-Bakar MA. *In Vitro* Effects of *Plantago Major* Extract on Urolithiasis. Malays J Med Sci. 2005; 12(2): 22–26.
- Gomez-Flores R, Calderon CL, Scheibel LW, Tamez-Guerra P, Rodriguez-Padilla C, Tamez-Guerra R, Weber RJ. Immunoenhancing properties of *Plantago major* leaf extract. Phytother Res. 2000; 14(8): 617-22.

- 8. Rodríguez-Pargas A, León-Padilla MC, Hernández-Rodríguez A, Junco-Barranco J. Actividad anti fúngica in vitro de una crema de Plantago major L. Rev cubana plant med. 1996; 1 (3): 9 12.
- Rojas N, Avilés R, Villacaqui E, Neira E, Ramos W, Santiago J. Tratamiento de quemaduras con películas obtenidas por radiación gamma que contienen extracto hidroalcohólico de tara (Caesalpinia spinosa) en animales de experimentación. Dermatol Peru. 2011; 21(1): 6-12.
- 10. Sabag-Asfura V. Formulación de un fitomedicamento con actividad gastroprotectora a partir de extractos de llantén (Plantago major). BIOFARBO. 2010;1 (2): 44 52.
- 11. Sudheesh-Kumar PT, Vinoth-Kumar L, Mincy R, Raja B, Tamura H, Shantikumar V, Rangasamy J. Evaluation of Wound Healing Potential of β-Chitin Hydrogel/Nano Zinc Oxide Composite Bandage. Pharm Res. 2013; 30: 523–537.
- 12.Hansson A. Protein kinase C-dependent activation of a myelin basic protein kinase by gastrin-releasing peptide in Swiss 3T3 fibroblasts. Cell Signal. 1991; 3(4): 293-298.
- 13. Agren MS. Studies on zinc in wound healing. Acta Dermato-venereologica. Supplementum. 1990; 154:1-36.
- 14.Ban K, Park HJ, Kim S, Andukuri A, Cho KW, Hwang JW, Cha HJ, Kim SY, Kim WS, Jun HW and Yoon YS. Cell Therapy with Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Encapsulated in Injectable Nanomatrix Gel Enhances Cell Engraftment and Promotes Cardiac Repair. ACSNANO. 2014; 8(10): 10815 10825.
- 15.Maksyutina N. Baicalein and scutellare in the leaves of *Plantago major*, Chemistry of Natural Compounds. 1971; 7 (3): 352-258.
- 16.Kyung MS, Seok HC, Moon-Jin J, Seong SK. Effects of Aucubin on the Healing of Oral Wounds. in vivo. 2007; 21: 1037-1042.
- 17. Wang Z, Zhang H, Zhang L, Yuan J, Yan S, Wang C. Low-temperature synthesis of ZnO nanoparticles by solid-state pyrolytic reaction. Nanotecnology. 2003; 14: 11-15.
- 18. Takemoto T, Teng Y, He D, Nakayama A, Tabata K, Suzuki E. The Enhancement of Selectivity of Methanol in the Presence of CuO/ZnO/Al2O3 in the Gas Phase Partial Oxidation of Methane. Of the 5th Inter. Conf. On Greenhouse Gas Control Technologies. 2001; 2: 781-786.
- 19.Matranga C, Chen L, Smith M, Bittner E, Johnson J, Bockrath B. Trapped CO2 in Carbon Nanotube Bundles. J Phys Chem. 2003; 107(47): 12930–12941.
- 20. Win MH. Infrared Spectroscopy of Zinc Oxide and Magnesium nanostructures, Whashington State University. 2007; 1: 1-125.
- 21.Hadjiivanov K, Avreyska V, Klissurski D, Marinova T. Combined TPD and FTIR studies of Co/ZrO2 catalysts: determination of the cobalt dispersion. Surface and Interface Analysis. 2002; 34: 88-91.



- 22. Moreno-Rodríguez A, Carmona-Gutiérrez G, González-Corone MA, Marquez López R, Rubio E, Moreno-Rodríguez L. Nanoreservorios de oxido de titanio dopado con veneno de abeja liofilizado por sol-gel. Rev Nat y Tec. 2013; 1: 12-21.
- 23. Cem G, Irving K. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med. 1999; 340 (6): 448 454.
- 24. Indovina V, Occhiuzzi M, Pietrogiacomi D, Tuti S. The surface composition of CuOx/ZrO2 catalysts as determined by FTIR, XPS, ESR spectroscopies and volumetric CO adsorption. Phys Chem B. 1999. 103: 9967-9977.
- 25. Zaki MI, Hasan MA, Pasupulety L. Langmuir. Surface reactions of acetone on AI2O3, TiO2, ZrO2 and CeO2: IR spectroscopic assessment of impacts of the surface acid-base properties. Langmuir. 2001; 17: 768.

- 26.Lansdown A, Path F, Mirastschijski U, Stubbs N, Scanlon E, Magnus S. Zinc in wound healing: Theoretical, experimental, and clinical aspects. Wound Rep Reg. 2007; 15 2–16.
- 27. Agren MS. Studies on zinc in wound healing. Acta Derm Venereol Suppl. 1990; 154:1-36.
- 28.Hansson A. Extracellular Zinc Ions Induces Mitogen-Activated Protein Kinase Activity and Protein Tyrosine Phosphorylation in Bombesin-Sensitive Swiss 3T3 Fibroblasts. Arch Biochem Biophisics. 1996; 328 (2): 233-238.