

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE  
EXTRACTOS ETANÓLICOS DE HOJA Y CORTEZA DE MANGLE  
ROJO (*Rhizophora mangle* L.) MEDIANTE TÉCNICAS *IN VITRO*,  
PARA SU APROVECHAMIENTO EN LA  
INDUSTRIA FITOFARMACÉUTICA”**

María Nereida Marroquín Tintí

Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Plantas Medicinales

Guatemala, noviembre de 2016

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Para optar al grado de Maestra en Ciencias

Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Plantas Medicinales

Guatemala, noviembre de 2016

**JUNTA DIRECTIVA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	DECANO
M.A. Elsa Julieta Salazar de Ariza	SECRETARIA
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	VOCAL I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	VOCAL II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	VOCAL III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	VOCAL IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	VOCAL V

**CONSEJO ACADÉMICO**  
**ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

Ruben Dariel Velásquez Miranda, Ph.D.

María Ernestina Ardón Quezada, MSc.

Jorge Mario Gómez M.A.

Clara Aurora García González, MA.

José Estuardo López Coronado, MA.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, templo del saber, por darme la oportunidad de crecer académicamente y desarrollarme como profesional; y con la que tengo el compromiso de formar a los futuros profesionales.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, especialmente a mis profesores de la maestría MUPLAM por brindarme sus conocimientos, experiencia y amistad durante estos dos años de estudios, muchas gracias.

A mi asesora, Doctora Sully Margot Cruz Velásquez, por haberme orientado sabiamente para la elaboración del trabajo de investigación y fomentar en mí el espíritu de investigación hacia el gran campo de los productos naturales.

Al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales – LIPRONAT-, por permitirme trabajar dentro de sus instalaciones, así como haberme permitido compartir momentos muy especiales con todos mis compañeros de trabajo, los lipronenses.

Al Instituto Cloromido Picado, de la Universidad de Costa Rica, por permitirme realizar una fase experimental en sus instalaciones; especialmente a la Dra. Laura Monturiol, por sus consejos y enseñanza.

A toda mi familia: mi mamá, papá, hermanas, hermanos y sobrinos, que durante estos dos años de desvelo de viernes y madrugar los sábados siempre tuvieron una palabra de aliento o una taza de café caliente; gracias, si no fuera por ustedes no hubiera sido posible este nuevo logro en el que me acompañan.

A mi amiga la maestra en artes Ana Carolina Valdez Gomar, ya que no dudó en cada momento de estos dos años de la maestría, en brindarme sus consejos y experiencia durante la realización de la misma.

A mis compañeros de promoción por su amistad, ayuda y compañerismo; ya que cada una de las experiencias que vivimos: alegrías, tristezas, enojos y preocupaciones nos ayudaron a crecer como personas y profesionales.

A todas aquellas personas que de una manera u otra han contribuido en la culminación de esta etapa de mi carrera y sé que estarán compartiendo conmigo mis metas venideras.

## DEDICATORIA

**A Dios:** Por ser el que siempre me cuida, ilumina y guía durante cada etapa de mi vida; que durante las noches de desvelo y estudio nunca estuve sola, ya que contaba con su compañía.

**A Mi Madre la Virgen María:** Por ser luz en los momentos de oscuridad y dificultad, a ella le dedico este triunfo como hija de ella que soy.

**A mis Padres:** Fernando Marroquín Palencia y Apolonia Tintí Veliz, por su amor incondicional, su esfuerzo y dedicación para que todos sus hijos realicen sus estudios y lleguen a ser profesionales de éxito; esta meta que hoy alcanzo es gracias a ustedes.

**A mi Abuela:** Genara de Jesús Palencia Rojas, la mamá Naya, por su infinito amor; ya que es una verdadera segunda madre para todos sus nietos, por educarme con amor y regañarme cuando era necesario; sé que desde el cielo me sigue cuidando y está compartiendo este triunfo hoy conmigo.

**A mis Hermanos:** Mónica, Salomón, Sofía, Emperatriz, Andrea y José; por su ayuda en cada momento de mi vida, por las peleas que al final nos unen más como hermanos y ante todo saber que aunque se sienta tener todo el mundo en contra puedo contar con el apoyo de mis hermanos, los patojos Marroquín Tintí.

**A mis Sobrinos:** Gabriela Celeste y mi Súper Max por ser la luz de mi vida, mi inspiración para seguir adelante y verlos alcanzar sus propias metas. Ya que en los momentos de más tormento su sonrisa ilumina mi vida.

**A los Ángeles que me cuidan desde el cielo:** Genara Palencia, Maximiliano, Felisa, Teresa, Jóvito Marroquín y Dominga Véliz porque sé que desde el cielo están cuidándome y celebrando conmigo este momento.

**A mis Amigas y Amigos:** Por compartir conmigo cada momento de mi vida, alegrías, tristezas y preocupación; y en algún momento, darme un consejo sabio.

**A los MUPLANENSES:** Porque compartimos preocupaciones, desvelos, exámenes y sobre todo la alegría de estar todos juntos viviendo la aventura de la maestría.

**A los LIPRONENSES:** Los que fueron, son y serán, para que cada uno alcance sus metas y llegue muy alto, que sepan que no hay límites para su gran talento.

**A todas:** Aquellas personas que de una u otra manera me han ayudado y se alegran con esta meta alcanzada.

## RESUMEN

Los taninos tienen propiedad astringente, por lo que ayudan al proceso de cicatrización; la corteza de *Rhizophora mangle* L., conocido como mangle rojo, presenta una elevada cantidad de taninos; al respecto, se cuenta con evidencia de uso tradicional y estudios pre-clínicos que demuestran su acción cicatrizante. Las hojas de mangle tienen una cantidad de taninos y actividad antioxidante muy similar al reportado para la corteza. En este estudio, se correlacionó la actividad cicatrizante de los extractos etanólicos de hojas mediante métodos in vitro, se cuantificó la cantidad de taninos y flavonoides, se determinó la actividad antioxidante mediante la técnica micrométrica del 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y fenoles totales según el reactivo de Folin. También se evaluó su actividad antibacteriana contra bacterias específicas o que pueden causar infecciones en heridas. En los extractos de hojas se cuantificaron valores de 29.28% de taninos, de actividad antioxidante de  $CI_{50}$  0.18mg/mL, fenoles totales de 227.76 $\mu$ g expresados como equivalentes de ácido gálico/g de extracto y una concentración inhibitoria mínima (CIM) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 y *Staphylococcus salvaje* de 1mg/mL. Los estudios de proliferación, sobre fibroblastos de pulmón de Hamster Chino (QC) y fibroblastos Murinos (L-929), mostraron que los extractos de las hojas producen mayor estimulación de proliferación en concentraciones 0.0039mg/mL. Asimismo, se elaboró un producto fitofarmacéutico, gel, en base a los extractos etanólicos de hoja y corteza de mangle, fueron estables durante el tiempo de análisis; en base a sus características físicas y cuantificación de metabolitos secundarios. El análisis estadístico muestra una correlación entre la cantidad de taninos y actividad antioxidante con un valor de  $p < 0.0001$ . La prueba de t-student mostró que no existe diferencia entre los extractos etanólicos de hoja y los extractos de corteza de mangle rojo; por lo que la hoja puede ser una alternativa para el tratamiento de heridas como cicatrizante y conservación de la especie, ya que la obtención de la hoja como droga vegetal no ocasiona daño y se protege el recurso del manglar. Es importante transmitir esta conocimiento a la comunidad para dar un uso sostenible a la especie, empleando la hoja como droga vegetal para la cicatrización.

# ÍNDICE

## Resumen

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	
2.1 <i>Rhizophora mangle</i> L. (Familia <i>Rhizophoraceae</i> ).....	2
2.2 Importancia ecológica del mangle rojo ( <i>Rhizophora mangle</i> L).....	4
2.3 Estudios de actividad biológica, uso industrial del mangle rojo.....	9
2.4 Cicatrización.....	10
2.5 Métodos para evaluar actividad cicatrizante.....	12
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. OBJETIVOS.....	17
5. HIPÓTESIS.....	18
6. METODOLOGÍA.....	19
7. RESULTADOS.....	34
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	41
9. CONCLUSIONES.....	45
10. RECOMENDACIONES.....	46
11. REFERENCIAS.....	47
12. ANEXOS.....	54

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Preparación de muestras para cuantificación de taninos.....	23
Tabla 2. Preparación de diluciones para cuantificación de actividad antioxidante.....	25
Tabla 3. Preparación de muestras en placas de lectura de DPPH.....	26
Tabla 4. Preparación de muestras en placa de lectura de fenoles totales.....	29
Tabla 5. Distribución de las bacterias en cada uno de las cajas.....	31
Tabla 6. Cuantificación de metabolitos secundarios en extractos etanólicos de hoja y corteza de <i>Rhizophora mangle</i> L.....	36
Tabla 7. Evaluación de la actividad antioxidante por técnicas micrométricas de extractos etanólicos de hojas y corteza de <i>Rhizophora mangle</i> L.....	37
Tabla 8. Concentración inhibitoria mínima (CIM) de extractos etanólicos de hoja y corteza de <i>Rhizophora mangle</i> L.....	38
Tabla 9. Influencia de los extractos etanólicos en el porcentaje de proliferación de dos líneas diferentes de fibroblastos, mediante ensayo con MTT.....	39
Tabla 10. Determinación del color del gel elaborado en base a etanólicos de hoja y corteza de <i>Rhizophora mangle</i> L.....	40
Figura 1. Determinación de pH en los geles preparados en base a los extractos etanólicos de hoja y corteza de <i>Rhizophora mangle</i> L.....	40
Figura 2. Cuantificación de taninos en los geles preparados en base a los extractos etanólicos de hoja y corteza de <i>Rhizophora mangle</i> L.....	41
Figura 3. Cuantificación de flavonoides en los geles preparados en base a los extractos etanólicos de hoja y corteza de <i>Rhizophora mangle</i> L.....	42

## 1. INTRODUCCIÓN

Guatemala, cuenta con 1% de territorio en condiciones para albergar el bosque de manglar, pues se trata de una especie que solo crece en el límite entre el mar y tierra firme. Estos bosques se encuentran en constante riesgo, ya que los pobladores de la región hacen uso de los árboles de manera descontrolada; debido a que su madera puede servir para hacer adornos, construcción de casas, muebles o como combustible. Además, tiene un uso tradicional terapéutico, donde el órgano más empleado es la corteza, que se considera la droga vegetal; para la obtención de la misma, recurren a la tala del árbol, por lo que se considera una forma de aprovechamiento no sostenible. Esto muestra que el conocimiento del potencial farmacológico de un órgano de una especie vegetal, puede llevar en ocasiones al uso indiscriminado de la especie lo cual suele ocasionar la pérdida de la misma.

Por un lado, la comparación de la actividad farmacológica de los órganos de una misma especie es importante, ya que permite determinar cuál es el órgano que presenta la mejor actividad farmacológica o determinar si son comparables, con el fin de emplear el órgano que menor daño cause a la especie.

Por otro lado, la cicatrización es un proceso biológico, mediante el cual los tejidos vivos reparan sus heridas y dejan, para el caso, de las heridas cutáneas, una cicatriz que puede ser estética o antiestética. Cuando una persona sufre una herida, en el proceso de reparación se llevan a cabo una serie de complejas reacciones bioquímicas para reparar el daño. Estos fenómenos ocurren con cierto solapamiento temporal y pueden ser divididos para su estudio en las siguientes fases: Inflamatoria, Proliferativa y Remodelación (Lara, 2012; Saltar, 2004; Staldemann, 1998).

Varias especies vegetales contienen metabolitos secundarios que presentan un efecto astringente, como los taninos, a los que se atribuye una acción cicatrizante; el mangle contiene una elevada cantidad de taninos. Por ello, al evaluar la cantidad de taninos en los diferentes órganos de la planta, se puede determinar si pueden ser intercambiables en la terapéutica cicatrizante.

En el presente proyecto se evaluó la actividad cicatrizante de los extractos etanólicos de hoja y corteza de mangle, para determinar el posible uso de la hoja en productos fitofarmacéuticos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Rhizophora mangle* L. (Familia *Rhizophoraceae*)

2.1.1 Nombres comunes. Candelón; Mangle; Mangle colorado; Mangle dulce; Mangle rojo; Mangle tinto; Tabché, Tapché, Xtabché.

2.1.2 Sinonimia. *Rhizophora americana* Nutt. ; *Rhizophora mangle* var. *samoensis* Hochr. ; *Rhizophora mangle* var. *racemosa* (G. Mey.) Engl. in C. Martius; *Rhizophora samoensis* (Hochr.) Salvoza.

2.1.3 Descripción Botánica: Árbol o arbusto perennifolio, halófito, de 1.5 a 15 m (hasta 30 m) de altura con un diámetro a la altura del pecho de hasta 50 cm. Copa redondeada. Hojas opuestas, simples, pecioladas, elípticas a oblongas, aglomeradas en las puntas de las ramas, de 8 a 13 cm de largo por 4 a 5.5 cm de ancho, coriáceas, lisas, gruesas; verde oscuras en el haz y amarillentas con puntos negros en el envés. Tronco recto. Ramas apoyadas en numerosas raíces, aéreas de origen adventicio, simples o dicotómicamente ramificadas, con numerosas lenticelas. Flor(es). Inflorescencias simples, con 2 ó 3 flores, pedúnculos de 3 a 5 cm, flores actinomorfas; corola de 1.8 cm de diámetro; cáliz de 1.54 cm de diámetro; sépalos 4, persistentes, amarillos, coriáceos, gruesos, de 4.1 mm de ancho; pétalos 4 no persistentes, blancos o amarillentos en la base y moreno rojizos arriba, de 2.6 mm de ancho. Fruto(s). Baya de color pardo, coriácea, dura, piriforme, farinosa, de 2 a 3 cm de largo por 1.5 cm de ancho en la base, cáliz persistente. Se desarrolla una semilla, rara vez dos, por fruto. Semilla(s). Una sola semilla germina en el interior del fruto (viviparidad). Los propágulos son frecuentemente curvos, de color verde a pardo en la parte inferior y presentan numerosas lenticelas. Miden de 22 a 40 cm de largo por 1 a 2 cm de diámetro en su parte más ancha y pesan aproximadamente 50 g. Raíz. Raíces fulcreas, ramificadas, curvas y arqueadas. Destacan las modificaciones de sus raíces en prolongaciones aéreas del tallo como zancos o prolongaciones cortas que emergen del suelo llamadas neumatóforos (Cruz, 2013).

2.1.4 Hábitat: Especie característica de los litorales donde forma a menudo masas puras en las zonas intermareales de lagunas costeras y esteros con influencia de agua salada. Crece en ambientes de continuo movimiento de agua y salinidad variable, de hipersalino a salobre. Su mejor desarrollo es en litorales someros, con poca pendiente donde la marea entra con mayor facilidad.

Se desarrolla en los sitios protegidos contra la acción del oleaje fuerte. Los manglares más productivos se desarrollan en estuarios con lodo fino, compuesto de cieno, arcilla y alto porcentaje de materia orgánica. Se le encuentra a lo largo de las costas del Golfo, el Pacífico y el Caribe, en latitudes tan extremas como Isla San Esteban en Baja California o Huixtla, en el sur de Chiapas. En la vertiente del Golfo se presenta desde Tamaulipas hasta Yucatán y Quintana Roo y en la vertiente del Pacífico desde Baja California Sur, Sonora hasta Chiapas. Altitud: nivel del mar. En Guatemala se puede encontrar en Petén, Puerto Barrios, Santa Rosa, Escuintla, San Marcos, Suchitepéquez y todas las zonas costeras del país. Altitud: Nivel del Mar (Marchorro, 2007).

2.1.5 Composición química: La corteza y raíz son fuente importante de taninos. Además de grupos aminos primarios y secundarios, alcaloides en pequeña proporción (Fleitas, 2001).

El extracto acuoso de la corteza de *R. mangle* se caracteriza por poseer una composición química compleja, destacándose la presencia de polifenoles (54.78 %), representados en su mayoría por taninos poliméricos (80 %) y taninos hidrolizables (20 %), destacándose la presencia en estos últimos de epicatequina, catequina, ácido clorogénico, ácido gálico y ácido elágico; además, se identificado galotaninos y elagitaninos. De las estructuras no tánicas, hay presencia de 17.5% carbohidratos libres y enlazados; 4.0% ácidos grasos de cadena larga, saturados e insaturados; 0.0285% fitoesteroles; 70 componentes, 0.0205%, volátiles o semivolátiles y aromas o aceites esenciales no volátiles (Sánchez, 1998).

2.1.6 Propiedades Farmacológicas: Se puede usar su corteza, hojas y raíz. Se ha demostrado actividad contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Mycobacterium smegmatis*, *Candida albicans*, *Criptococcus neoformans*. La actividad biológica y farmacológica se atribuye a los taninos presentes en la planta (Fleitas, 2001).

2.1.7 Toxicología: No se ha reportado su toxicidad debido a que casi no se ha utilizado esta planta como medicinal; sin embargo, se sabe que se puede usar jarabes de sus extractos, de raíces y corteza, como antidiarreicos, para el asma y para el envenenamiento con pescados contaminados (Fleitas, 2001).

## 2.2 Importancia ecológica del mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.)

El recurso mangle representa un ecosistema con beneficios directos e indirectos para los pobladores de la costa sur de Guatemala, quienes se dedican en su mayoría a la pesca y a la agricultura. Uno de los beneficios directos de su uso es el corte de madera con fines de construcción de ranchos para vivienda, elaboración de cercos rústicos y como leña.

Por el avance de la frontera agrícola la modificación de las áreas boscosas, generalmente está acompañada por un intenso proceso de extracción de los recursos del bosque. Esta situación se registra en muchas regiones del trópico húmedo y en la actualidad, en muchas de ellas, se ha identificado una pérdida de hábitat de la fauna silvestre y la consecuente disminución de la biodiversidad de la totalidad de la vida animal y vegetal del planeta (Wilson, 1988).

### 2.2.1 Reserva de Monterrico

La reserva de usos múltiples de Monterrico, se localiza al sureste de la República de Guatemala, sobre la franja costera del Pacífico entre los municipios de Taxisco y Chiquimulilla del departamento de Santa Rosa. Está delimitada por las coordenadas cartográficas entre los meridianos 90°26'21" y 90°30'14" longitud Oeste y paralelos 13°58'28" y 14°0'38" latitud Norte. Localizada muy cerca del foco del rango latitudinal de mayor desarrollo de bosques de manglares, dichos bosques constituyen una de las principales formaciones vegetales características y representativas del área (Sigüenza, 1999).

65% del área está formado por cuerpos de agua, formando así el sistema estuarino conocido como Canal de Chiquimulilla, que cuenta con canales anexos y lagunas estuarinas que cambian su salinidad dependiendo de la acción de las mareas. Este sistema estuarino representa un importante hábitat de fauna y flora, que en la mayoría de los casos, se encuentra en vías de extinción como, por ejemplo, la iguana verde, el caimán, tortugas terrestres y tortugas marinas, y acompañada de pérdida significativa de funcionalidad, como en el caso de los ecosistemas de manglar (Sigüenza, 1999). Está situada entre los 0 a 8 msnm. En cuanto a su relieve topográfico pertenece a la planicie de la costa sur ya que su pendiente no sobrepasa el 5%, a excepción del área de mareas (playa).

La franja de playa es de vital importancia ya que el desove o postura de huevos de tortugas marinas se realiza de manera constante durante la temporada que va de julio a diciembre de cada año. El bosque seco, es otra de las importantes asociaciones naturales que posee la reserva ya que

constituye un refugio y sitio de anidamiento, alimentación y reproducción para muchas especies de aves, reptiles, mamíferos e invertebrados (Sigüenza, 1999).

### 2.2.2 Importancia ecológica

Se trata de una especie halófila facultativa. Aun cuando presenta una amplia distribución y abundancia en el país, puede considerarse una especie estenoica rara debido a la distribución restringida de su hábitat. Esta especie, junto con *Avicenia germinans* y *Laguncularia racemosa* como elementos dominantes, forma asociaciones conocidas como manglares. Típicamente, es la especie de mangle ubicada en la parte de mayor influencia salina o frente del manglar, en la que el nivel de inundación es mayor. Aunque se trata de una especie con buenas capacidades para explotar hábitats con condiciones particulares diversas, puede habitar en sitios con baja disponibilidad de nutrientes y baja salinidad. En lo que respecta a su densidad y abundancia de individuos mayores o iguales a 1 cm de diámetro a la altura del pecho, se presenta gran heterogeneidad entre sitios a lo largo de ambas costas. Los sitios de latitudes al norte, como Bahía Kino, Sonora; Tamiahua, Veracruz, presentan una menor abundancia con respecto a sitios más al sur: Chantuto, Chiapas; Centla, Tabasco; 120 a 270 individuos/hectárea versus 4,000 a 5,000 individuos/hectárea (Sigüenza, 1999).

### 2.2.3 Aspectos fisiológicos

2.2.3.1 Adaptación: Especie de fácil adaptación a sitios salinos y anegados. Una característica sobresaliente de la especie es su complejo sistema de raíces aéreas que parten del mismo tronco o de las ramas laterales, raíces pivotantes o zancos, que bajan para anclarse y sostenerse en los suelos anegados y fangosos. Otra característica adaptativa es la presencia de estructuras para eliminar el exceso de sal o estructuras para respirar o neumatóforos. Se adapta a un gradiente de luz que va desde alta insolación a sitios sombreados (Sigüenza, 1999).

2.2.3.2 Competencia: Aunque son muy pocas las especies que pueden sobrevivir en condiciones de salinidad y fangosidad, durante la fase de plántula, el rápido desarrollo representa una fuerte competencia por espacio. Las reservas maternas de los hipocótilos pueden tener un efecto significativo en el crecimiento de la plántula y en su habilidad competitiva. Un incremento en el área basal de *Avicennia* y *Laguncularia* en sitios fértiles, con altos contenidos de nutrientes, puede limitar el desarrollo de *R. mangle* debido a competencia por la luz (Sigüenza, 1999).

2.2.3.3 Producción de hojas, frutos, madera y/o semillas: La producción primaria neta promedio es de 307 a 793g/m<sup>2</sup>/año. Los manglares en el estado de Campeche tienen tasas de producción de follaje de 16 a 24.6 kg/ha/año y una tasa de caída de hojarasca de 8.3 a 12.5 kg/ha/año (Sigüenza, 1999).

2.2.3.4 Regeneración: La regeneración natural aunque ocurre es lenta. A pesar de que varias especies del manglar poseen la capacidad de regenerarse vegetativamente (tocones), la colonización de nuevos hábitats ocurre a través de individuos producidos sexualmente. La densidad de las plántulas de la regeneración potencial, < 1 cm diámetro a la altura del pecho, varía ampliamente entre comunidades: de menos de 400 individuos/hectárea hasta una cifra cercana a los 5,000 individuos/hectárea. Para asegurar una regeneración exitosa no deben talarse áreas mayores a los 20 m de ancho y la tala debe restringirse a bosques con un promedio de 25 cm de diámetro a la altura del pecho. En sitios inundados por mareas que ocurren con una frecuencia de 20 veces por mes, se deben conservar árboles semilleros separados por 20m (Sigüenza, 1999).

#### 2.2.4 Efecto Restaurador del mangle

Entre los principales atributos funcionales que determinan la importancia ecológica de los manglares están los siguientes:

- a) Recuperación de terrenos degradados: los suelos donde se desarrollan han sido considerados muy fértiles, ya que presentan una alta tasa de descomposición, con una relación carbono/nitrógeno muy alta; biológicamente, constituyen reservorios de carbono y sistemas importantes en el flujo de energía, aportan materia orgánica y nutrientes al sistema y retienen sedimentos. El contenido de carbono en el suelo, por lo general, es muy alto y tiene gran capacidad de almacenamiento de carbono en el tejido vegetal.
- b) Conservación de suelo / Control de la erosión: se consideran sistemas formadores y estabilizadores de suelos, controlan la erosión por mareas, representan un papel importante en la protección y estabilización de la línea costera, ante la acción erosiva del mar y fenómenos atmosféricos como huracanes y ciclones. Los manglares ayudan a extender la tierra firme porque sostienen el fango que se deposita desde la tierra, en avance hacia el océano.
- c) Mantienen la calidad del agua: funcionan como filtro de algunos contaminantes. Una de las características más importantes de los elementos arbóreos del mangle es su adaptación a condiciones específicas de periodicidad de inundación y exposición al aire, diferente para

cada especie. Eso determina la distribución y zonación de los manglares e incluso influye en la sucesión, condiciones que resultan de las situaciones hidrológicas netas de la zona en particular y son producto de la combinación de las mareas, aportes fluviales, escurrimientos terrestres, precipitación- evaporación, viento, profundidad y geomorfología del cuerpo de agua adyacente, tasa de sedimentación, hundimiento o subsidencia y extensión del nivel topográfico óptimo. Todos ellos son los factores importantes que determinan el éxito de los programas de reforestación o forestación (CONABIO, 2009).

#### 2.2.5 Usos (Morton, 1965; Rzedowski, 2001)

- a) Adhesivo. Exudado, látex, se ha utilizado como adhesivo en la fabricación de triplay.
- b) Artesanal. Madera en bolas de boliche o de polo y artesanías en general. Artículos torneados.
- c) Colorantes. Corteza produce un tinte azul para teñir tejidos de algodón, la recolección de esta se lleva a cabo de manera primitiva usando solo machete, causando gran daño al árbol al afectarse el cambium vascular, por la herida que le producen.
- d) Combustible. Madera como leña y carbón
- e) Comestible. Fruto, el jugo fermentado produce una bebida embriagante.
- f) Construcción. Madera, hoja construcción rural y marina; en México, un uso extendido es la extracción de árboles juveniles de *R. mangle*, por su resistencia, para ser usados como travesaños en viviendas o la construcción de trampas para el camarón; las hojas son empleadas en los techos rurales, los postes y pilotes por la dureza y resistencia al agua de mar está ampliamente reconocida por los pescadores, la madera tiene gran demanda en construcciones ligeras.
- g) Curtiente. Corteza, raíz, semilla, fuente importante de taninos, con contenidos de 10% a 40 %, se emplean en el curtido de pieles, tinción de cuerdas, redes y sedales; la cosecha de la corteza se realiza usando machetes, lo que causa un gran daño al árbol al afectarse el cambium vascular.
- h) Implementos de trabajo. Madera implementos agrícolas, galeras tabacaleras como en San Andrés Tuxtla, Veracruz, mangos para herramientas.
- i) Maderable. Madera muy dura, se utiliza para hacer puentes, pilotes, postes de casas, vigas, horcones, durmientes, muebles, diques, costillas para embarcaciones, fabricación de barcos y pisos, remos e instrumentos empleados en las artes de pesca.

- j) Medicinal. Corteza: febrífugo, hemostático, antidiarréico, para el asma, hemoptisis, mordedura o picadura de animales marinos venenosos, diversas heridas, tuberculosis, lepra, hemorragias, disentería, elefantiasis. Hoja: escorbuto, dolor de muelas, úlceras leprosas. Raíz: la raspadura de las raíces es usada por los pescadores contra mordeduras de peces y picaduras de insectos venenosos. Los embriones son ricos en taninos y se emplean machacados y cocidos como astringentes. La planta tiene efecto anti-hiperglicémico y podría llegar a usarse clínicamente en el control de la diabetes mellitus. Se utiliza en afecciones gástricas como úlceras, antiséptico y como promotor de cicatrización (Leinmuller, 1991).
- k) Melífera. Flor en apicultura.

#### 2.2.6 Flora y fauna asociada

Además de las especies dominantes de mangles, en este ecosistema vive una gran diversidad de animales, tanto terrestres como acuáticos, y diversas especies de plantas; algunas especies vegetales con menos resistencia a la salinidad pueden ser parte de las comunidades de manglares como el zapote (*Manilkara zapota*), la palma tasiste (*Acoelorrhaphe wrightii*), el chechén negro (*Metopium brownei*), palo de agua (*Pachira aquatica*), cuerno de toro (*Acacia cornígera*) y el tucuy (*Phitecellobium lanceolatum*), entre otros (CONABIO, 2009).

Entre las trepadoras y epífitas se encuentran bejucos (*Rhabdadenia biflora*, *Dalbergia brownei*), pitaya (*Selenicereus testudo*), varias especies de bromelias (*Achmaea bracteata*, *Bromelia pinguin* y *Tillandsia* spp.) y orquídeas (*Encyclia cochleata*, *Epidendrum* spp., *Brassavola nosoda* y *Myrmecophila tibicinis*). En el sotobosque viven los helechos de los manglares (*Acrostichum aureum* y *A. danaeaeifolium*, *Elaphoglossum* sp.) y pastos como el zacate salado (*Distichlis spicata*) y el pasto aguja (*Spartina spartinae*) (CONABIO, 2009).

Las raíces de los mangles proporcionan un sustrato adecuado para muchas de las especies de fauna como caracoles, ostras (*Crassostrea rhizophorae*), percebes, erizos, esponjas y sus estadíos juveniles. Una gran diversidad de especies comerciales como cangrejos (*Callinectes* spp.), jaibas (*Callinectes* spp.), camarones y langostinos (*Macrobrachium* spp.) viven en el agua de los manglares, al igual que las etapas juveniles de una gran cantidad de peces como bagre (*Arius* spp.), lisa (*Mugil* spp.), mojarra (*Eucinostomus* spp. *Diapterus* spp.), pargo (*Lutjanus* spp.), róballo (*Centropomus* spp.) y sábalo (*Megalops atlanticus*) (CONABIO, 2009).

La compleja estructura vertical de los manglares es utilizada para descanso y anidación de diversas especies de aves como la garza azul (*Egretta caerulea*), la garza roja (*Egretta rufescens*), la garza morada (*Egretta tricolor*), la garza gris (*Ardea herodias*), el bobo café (*Sula leucogaster*), el cormorán (*Phalacrocorax auritus*), la fragata (*Fregata magnificens*) y la chocolatera (*Ajaia ajaja*). Algunas especies consideradas Sujetas a Protección Especial como la aguililla negra (*Buteogallus anthracinus*), el gavilán caracolero (*Rostrhamus sociabilis*), la cigüeña o garzón (*Mycteria americana*), el vireo manglero (*Vireo pallens*) y el tecolotito manglero (*Megascops cooperi*) también frecuentan y anidan el manglar. Otras especies de aves migratorias pequeñas como los chipes, habitan el manglar durante su estancia en México en los meses de invierno (CONABIO, 2009).

Además, sobre las ramas de los manglares viven varias especies de iguanas consideradas en la categoría de “Especies Amenazadas” (*Ctenosaura pectinata*, *C. quinquecarinata*, *Ctenosaura similis*) o Sujetas a “Protección Especial” (*C. acanthura*, *C. hemilopha* e *Iguana iguana*) que viven en el suelo acuático y terrestre del manglar, como los cocodrilos de río (*Crocodylus acutus*). En la parte terrestre, varios mamíferos incluyendo mapaches (*Procyon lotor*), coatíes (*Nasua sp.*), y jaguares (*Panthera onca*) utilizan este ecosistema (CONABIO, 2009).

### **2.3 Estudios de actividad biológica, uso industrial del mangle rojo (*Rhizophora mangle*)**

La planta tiene efecto anti-hiperglicémico y podría llegar a usarse clínicamente en el control de la diabetes mellitus; ello se comprobó al suministrar extracto acuoso de los tallos (4 mL/kg) en conejos sometidos a ayuno por 18 horas, y, posteriormente, al aplicarles una solución de glucosa subcutánea, el extracto disminuyó en 16.3 % la curva de tolerancia a la glucosa (Castro, 2014).

El extracto acuoso de la corteza de *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo), posee varias propiedades farmacológicas en el tratamiento de la mastitis bovina, la curación de heridas, las infecciones uterinas y las úlceras gastroduodenales, debido a sus propiedades antiséptica, cicatrizante, antiinflamatoria y antioxidante. El extracto acuoso de la corteza de *R. mangle*, ejerció una acción eliminadora específica de radicales hidroxilo así como la habilidad de quelar iones de hierro; también disminuyó el daño oxidativo en las moléculas de ADN (Sánchez, 2011; Castro, 2014).

En otros estudios, científicos, *Rhizophora mangle* L. se ha demostrado que tiene efectos sobre las úlceras gastroduodenales mediante diversos mecanismos de acción: citoprotección, antisecreción, inhibición de la disminución de prostaglandina PGE<sub>2</sub> y efecto cicatrizante (Berenguer, 2006).

Extractos de *Rhizophora mangle* mostraron actividad contra larvas de 3 estadios de *Trichostrongylus* ssp, en concentraciones de 5mg/mL, 25mg/mL y 50mg/mL (Alemán, 2011).

Sobre la toxicidad de la planta se han realizado estudios preclínicos, mediante la evaluación del efecto del extracto acuoso de *R. mangle* en modelos agudos en dosis única (2 000 mg/kg de masa corporal) y en dosis repetida diaria durante 14 días del extracto, en la dosis terapéutica máxima de 500 mg/kg mc. Se emplearon ratas *Sprague Dawley* hembras y machos, divididas en grupo de 5 animales de cada sexo por cada grupo experimental; se realizaron observaciones sistemáticas y el día 14 del experimento se procedió a la eutanasia de los animales. Se determinó que la dosis tóxica del extracto acuoso seco de *R. mangle* es superior a 2 000 mg/kg en estudio de dosis única y no es tóxico a dosis repetida en la dosis máxima terapéutica, en un período de 14 días, por lo que se garantiza un amplio margen de seguridad (Sánchez, 2008).

Además, se han realizado estudios sobre productos elaborados a partir del mangle, donde se hizo una evaluación de una formulación semisólida de extracto acuso de mangle en el comportamiento reológico y extensión de extracto acuoso y se observó estabilidad de los componentes (Pérez, 2011). Asimismo, se ha empleado el gel de corteza de mangle como control positivo en un estudio de pasta de clorofila-caroteno (Mancebo, 2011).

## **2.4 Cicatrización**

Es un proceso biológico mediante el cual los tejidos vivos reparan sus heridas. En el proceso de reparación se llevan a cabo una serie de complejas reacciones bioquímicas que suceden para reparar el daño. Estos fenómenos ocurren con cierto solapamiento temporal y pueden ser divididos para su estudio en las siguientes fases (Stadelmann, 1998):

- a) Fase inflamatoria: En esta fase se fagocitan y eliminan las bacterias, la suciedad, y se liberan factores que producen la migración y división de las células que toman parte en la fase proliferativa. En la fase inflamatoria se generan los siguientes procesos:

- La cascada de coagulación.

- La generación de plaquetas.
  - La vasoconstricción y vasodilatación.
  - Los leucocitos polimorfonucleares.
  - La presencia de macrófagos.
- b) Fase proliferativa: Se caracteriza por la angiogénesis, el aumento de colágeno, la formación de tejido granular, la epitelización, y la contracción de la herida. En la angiogénesis, nuevos vasos sanguíneos a partir de células endoteliales. En la fibroplasia y formación de tejido granular, los fibroblastos crecen y forman una nueva matriz extracelular provisoria mediante la secreción de colágeno y fibronectina. En la epitelización, las células epiteliales se desplazan sobre la herida y la cubren. En la contracción, los miofibroblastos ayudan a reducir el tamaño de la herida; ellos se adhieren a los bordes de la herida y se contraen utilizando un mecanismo similar al que tienen las células de los músculos lisos. Cuando las células han cumplido con su cometido, las células no utilizadas sufren una apoptosis, de manera que se puede mencionar los siguientes fenómenos:
- Angiogénesis.
  - Fibroplasia.
  - Formación de tejido granular.

De manera simultánea con la angiogénesis comienza la acumulación de fibroblastos en la zona de la herida. Los fibroblastos comienzan a aparecer dos a cinco días después de producida la herida. Cuando la fase inflamatoria está finalizando su número alcanza el máximo entre una a dos semanas después de producida la herida. Hacia el final de la primera semana, los fibroblastos son las células que se presentan con mayor abundancia en la cicatriz; la fibroplasia finaliza después de unas dos a cuatro semanas de ocurrida.

Durante los primeros dos a tres días después de producida la herida, los fibroblastos proliferan y migran, mientras que posteriormente ellos son las principales células responsables de generar la matriz de colágeno en la cicatriz. Los fibroblastos que se encuentran en el tejido normal migran hacia la zona de la herida desde sus márgenes. Inicialmente, los fibroblastos utilizan la fibrina formada en la fase inflamatoria para migrar, adhiriéndose a la fibronectina. Los fibroblastos depositan inicialmente sustancia basal en la

base de la herida y, posteriormente, colágeno al cual se pueden adherir para migrar. El proceso se realiza en tres etapas:

- Disposición de colágeno.
- Epitalización.
- Contracción.

c) Fase de remodelación: En esta fase el colágeno es remodelado y realineado a lo largo de las líneas de tensión y las células que ya no se necesitan son eliminadas mediante una apoptosis.

## **2.5 Métodos para evaluar actividad cicatrizante**

El método que se empleó evidenció la viabilidad de las células fibroblásticas del prepucio humano al entrar en contacto con los extractos etanólicos en estudio; los fibroblastos, al ser células secretoras de colágeno y glucosaminoglucanos para la matriz extracelular ayudan en el proceso de la cicatrización de heridas, por lo que si el extracto aumenta su viabilidad podrá ser considerado un extracto con potencial en la cicatrización. A través de los métodos de viabilidad celular por el rojo neutro, se puede determinar el favorecimiento en viabilidad que un extracto puede tener sobre una línea celular. El presente estudio tuvo como objetivo visualizar cómo los extractos en estudio logran estimular la proliferación y la acción de las células fibroblásticas de líneas celulares en el laboratorio. Entre los métodos para evaluar una actividad cicatrizante están:

2.5.1 Concentración Inhibitoria Mínima: En microbiología es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación. La concentración inhibitoria mínima es importante en diagnósticos de laboratorio para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente antimicrobiano y, además, para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos (Andrews, 2001).

2.5.2 Método del Rojo neutro: Esta prueba es una medida de la toxicidad o estimulación de un compuesto a corto o largo término, determinado por la liberación del colorante rojo neutro debido a la pérdida de la viabilidad celular. El rojo neutro es captado por las células, específicamente por los lisosomas y endosomas, y en la medida que la célula pierde viabilidad por la acción del compuesto que se evalúa se libera el colorante al medio pues solo las células viables son capaces de retener el

colorante en su interior. Seguidamente, se determina la cantidad de rojo neutro que permanece después de la exposición dentro de la célula y se calcula la concentración que produce la inhibición del 50% del crecimiento celular (Arencibia, 2003).

Las células deben ser conservadas en condiciones de esterilidad en N<sub>2</sub> líquido, 190°C; al usarlas, deben ser sembradas en frascos de 75 cm cuadrados y recuperadas de la exposición a la tripsina. En todo el procedimiento, por lo general, se realiza la lectura en la absorbancia de cada pozo a 540 nm. Los valores de absorbancia deben oscilar en un rango de 0.2-0.1 para dar una correlación adecuada entre el número de células presentes y la densidad óptica observada. Se debe evaluar hasta 6 concentraciones del compuesto, alcanzan una concentración de 1000 µg/mL o la máxima concentración soluble del compuesto en el medio. (Arencibia, 2003)

Bajo condiciones controladas debe asumirse que no hay salida de rojo neutro. La densidad óptica (D.O) obtenida se toma como índice de la cantidad original de rojo neutro presente en el cultivo. El cálculo del porcentaje (%) de inhibición del crecimiento celular se realiza utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - (D.O (t) / D.O (C) * 100)$$

Dónde:

D.O (t), es la densidad óptica del cultivo después de la exposición a una concentración de la sustancia que se evalúa.

D.O (c), es la densidad óptica del cultivo control, en el cual no debe haber salida de rojo neutro.

Para presentar los resultados, se realiza por lo general un gráfico donde se exponen las concentraciones evaluadas y el porcentaje de inhibición del crecimiento celular. A partir de esta gráfica serán calculadas las concentraciones que producen el 50% de la inhibición del crecimiento celular CI<sub>50</sub>. Estas concentraciones serán expresadas en µg/mL. Además se debe realizar un análisis estadístico de los resultados y para comparar los resultados con el control de medio (Arencibia, 2003).

Consideraciones a tomar en cuenta:

- a. Cuando se utilizan detergentes en el medio de cultivo, ellos pueden causar interferencias y determinar falsos positivos. Debido a esto, si resulta necesario utilizar estas sustancias deben controlarse las condiciones de su empleo.

- b. Si el compuesto que se evalúa requiere activación metabólica previa para ser tóxico, esta prueba no da la información adecuada.
- c. Cuando se evalúan períodos cortos de exposición, la información que se obtiene resulta en un índice de toxicidad en ojos o piel, por el estado en que se encuentran las células. Por lo que este resultado se debe complementar con períodos largos de exposición.
- d. Células confluentes que han sido abandonadas por varios días no deben utilizarse para realizar la prueba de exposición por un tiempo corto.
- e. El rojo neutro tiende a precipitar irreversiblemente y formar cristales, lo cual podría causar interferencias.
- f. Se debe tener en cuenta la naturaleza del compuesto a probar (Arencibia, 2003).

2.5.3 Método de 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH): Este método sirve para evaluar la actividad antioxidante, a través de la captura de material radicalario, en presencia de una sustancia antioxidante, midiendo el potencial de inactivación de dicho radical en medio acuoso. En la literatura, la actividad antioxidante puede, entre otros factores, depender del tipo o posición y número de hidroxilos en la molécula la concentración de compuestos fenólicos y la presencia de metales de transición. Dada la complejidad de la matriz alimentaria, en algunas ocasiones los investigadores deben realizar adaptaciones y asegurarse que valoran al 100% la capacidad antioxidante del extracto, con lo cual se introducen variables como la utilización de ultrasonidos para homogeneizar mejor la muestra y que las estructuras activas puedan estar accesibles al radical (Yang, 2008).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Guatemala, es un país con una rica biodiversidad; su flora está integrada por una cantidad elevada de especies nativas, que han conferido a los habitantes del país un recurso importante empleado para su alimentación, medicina, vivienda, ropa y otros.

Una de las especies que forma parte de la biodisponibilidad de Guatemala, es el mangle rojo (*Rhizophora mangle*); los manglares han sido definidos como asociaciones vegetales anfíbias, leñosas, perennifolias, presentes en forma discontinua en la zona influenciada por las mareas de las costas tropicales, que producen formaciones pantanosas de agua salada bajo la influencia del agua dulce de los ríos, independientemente del clima de la región. Este es un ecosistema altamente productivo que provee a las comunidades innumerables bienes y servicios. Algunos de estos usos se remontan a la época precolombina. Entre los bienes se puede mencionar: productos maderables, recursos pesqueros de captura directa en el manglar como peces, moluscos y crustáceos; sal, miel, caza deportiva, materiales químicos extraídos del manglar, taninos, alcoholes; fibras de valor comercial y productos medicinales.

El ecosistema de manglar reviste una gran importancia ecológica y económica. Actúa como la primera barrera ecológica en los litorales, además de refugio y/o hábitat idóneo para una gran variedad de especies de fauna tanto terrestres como marinas, de las cuales, muchas constituyen renglones de gran interés económico, amortiguan el efecto de los huracanes y ofrecen atractivos para el desarrollo de la industria turística y la investigación científica. Por otra parte, generan una serie de bienes y servicios de diferente índole, que son la base para la subsistencia de asentamientos humanos ubicados en las zonas costeras. Así el uso indiscriminado del mangle puede llegar a afectar seriamente el ecosistema de la región costera.

Tradicionalmente la corteza de mangle se ha empleado con fines terapéuticos y para la cicatrización. El daño de la integridad de la piel, una herida, pone en riesgo la salud de la persona, debido a que es una entrada directa de microorganismos que puede causar infecciones sistémicas, ya sea por microorganismos oportunistas o patógenos. Fisiológicamente ese daño a la piel es reparado mediante la cicatrización; la cicatrización es un proceso biológico mediante el cual los tejidos vivos reparan sus heridas y dejan, para el caso de las heridas cutáneas, una cicatriz que puede ser estética

o inestética. Cuando una persona sufre una herida, en el proceso de reparación, se lleva a cabo una serie de complejas reacciones bioquímicas que suceden para reparar el daño. Estos fenómenos ocurren con cierto solapamiento temporal y pueden ser divididos en la fase inflamatoria como: proliferativa y de remodelación. El proceso de cicatrización ocurre de forma natural, pero este proceso se puede ver afectado por la presencia de bacterias que causen una infección. Además, las heridas infectadas atraen altos niveles de células fagocíticas que liberan especies reactivas del oxígeno, en un intento de luchar contra la infección; sin embargo, estas moléculas pueden dañar las células huésped y retrasar el proceso de curación. Por ello que una sustancia que presente una actividad antibacteriana y un efecto antioxidante puede influenciar positivamente la curación de heridas y, por ende, al proceso de cicatrización.

Estudios previos documentados han demostrado la actividad cicatrizante que presenta el extracto de corteza de mangle, debido a su elevado contenido de taninos, razón que ha llevado a esta especie a emplearse como control positivo de efecto cicatrizante.

Estudios realizados por Cruz y otros en el 2013, en la reserva de Monterrico, han demostrado que el contenido de taninos en las hojas de *Rhizophora mangle* es muy similar al que se encuentra en la corteza. Por ello se decidió realizar la presente investigación, donde se evaluó el contenido de taninos en hojas, se determinó la presencia de acción cicatrizante y se comparó su posible actividad con la que presenta la corteza.

De esta forma al conocer si las hojas de mangle presentan una actividad biológica similar a la de la corteza, se podrá obtener una recolección de material vegetal más cuidadosa, que no afecte o extinga a la especie.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 General:

- 4.1.1 Evaluar el efecto cicatrizante de los extractos etanólicos de hoja y corteza de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.), y la propuesta de una formulación de aplicación medicinal.

### 4.2 Específico:

- 4.2.1 Valorar la presencia de taninos y flavonoides presente en los extractos etanólicos de hoja y corteza de mangle por métodos espectrofotométricos.
- 4.2.2 Evaluar y comparar la actividad cicatrizante presente en los extractos etanólicos de hoja y corteza de mangle rojo, mediante técnicas *In vitro*.
- 4.2.3 Determinar la viabilidad del uso de los extractos etanólicos de hoja de mangle rojo para la elaboración de productos fitofarmacéuticos con acción cicatrizante.

## 5. HIPÓTESIS

No existe diferencia en la actividad cicatrizante de los extractos etanólicos de la hoja de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.) en comparación con la actividad presentada por los extractos etanólicos de corteza de mangle rojo.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Universo

Los manglares que se encuentran en Guatemala.

#### 6.1.1 Población

Hojas y corteza de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.) recolectadas en la reserva de Monterrico, Chiquimulilla, Santa Rosa. Coordenadas geográficas 13°54'12.2'' N 90°27'12.6'' O, durante los meses de julio a noviembre de 2014.

#### 6.1.2 Muestra

Extractos etanólicos de hoja y corteza de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.).

### 6.2 Materiales

#### 6.2.1 Materiales y Equipo

- Balanza semianalítica y balanza analítica
- Campana de extracción de gases
- Cámaras cromatográficas
- Gradillas para tubo de ensayo
- Refrigeradora
- Estufa eléctrica
- Asperjador de vidrio
- Lámpara de UV/VIS
- Cromatoplaque de Sílicagel 60 F<sub>254</sub>
- Espectrofotómetro UV/VIS
- Papel filtro
- Agitador tipo Vortex
- Sonicator
- Agitador magnético
- Pipetas
- Tubos de ensayo
- Incubadora
- Microplacas estériles

- Cajas de petri estéril
- Lector de microplaca
- Tips azules y amarillos

### 6.2.2 Reactivos

- Rutina
- Quercetina
- Acetato de etilo
- Ácido acético
- Ácido fórmico
- 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)
- Ter- butilhidroxianisol (BHA)
- Ácido Ascórbico
- Ácido gálico
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Carbonato de sodio
- Etanol
- Metanol
- $\beta$ -caroteno
- Ácido tánico
- Agua desmineralizada
- Extractos etanólicos
- Agar Mueller-Hinton
- Agar tripticasa soya
- Caldo tripticasa soya
- Caldo Mueller-Hinton
- Fosfato diácido de potasio
- Fosfato monoácido de potasio
- Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2,11]-2-5-difeniltetrazolium (MTT)
- Tungstato de sodio dihidratado
- Ácido fosfórico

- Ácido fosfomolibdico
- Ácido clorogénico

### 6.3 Métodos

#### 6.3.1. Cuantificación de taninos Tungsto-molibdico-fosfórico (Anexo 13.1)

Se preparó una solución con 0.5 g de extracto con 250 mL de etanol al 50 %, se agitó durante 1 hora, se dejó en reposo 1 hora y se agitó nuevamente por 3 minutos, para filtrar posteriormente. Se transfirieron 3 mL del filtrado a un matraz aforado de 50 mL y se diluyeron con agua destilada hasta enrase (Solución madre) (Cruz, 2013; CYTED, 1993;Gutiérrez, 2000). Finalmente se prepararon matraces aforados de 25 mL, de acuerdo a lo que muestra la tabla 1.

**Tabla 1. Preparación de muestra para cuantificación de taninos**

Reactivos	Blanco	Patrón	Muestra
Sm	-	-	0.5mL
Solución de referencia de ácido tánico	-	1.5mL	-
Agua destilada	2.5mL	1.0mL	2.0mL
Reactivo para taninos	1.0mL	1.0mL	1.0mL
Se agita y se deja en reposo 5 minutos			
Solución de carbonato de sodio al 20%	0.5mL	0.5mL	0.5mL

Se completa con agua destilada hasta enrase, se mezcla bien y se lee cada uno a 700 nm.

Preparación de reactivos:

- *Solución de referencia de ácido tánico:* Se disolvieron 25 mg de ácido tánico en 100 mL de agua destilada, de ahí se tomaron 20 mL y se completó al volumen hasta 100 mL.
- *Reactivo para taninos:* Se preparó pesando 10 g de tungstato de sodio dihidratado, 0,2 g de ácido fosfomolibdico y 5 mL de ácido fosfórico al 85% en 75 mL de agua destilada. Se puso en reflujo por 2 horas y se completó a 100mL con agua destilada.

La expresión para los cálculos se hizo con la siguiente fórmula:

$$X = (A_m * P * 1000 * 100) / (A_p * P_M * (100-p))$$

X: contenido de taninos en la droga (%)

P: masa de la sustancia de referencia (g)

Am: absorbancia de la muestra (nm)

PM: masa de la droga (g)

Ap: absorbancia de la solución de referencia

p: humedad de la droga (%)

(nm)

### **6.3.2. Cuantificación de flavonoides en base a ácido clorogénico**

Se preparó una solución con 0.1 g de extracto de muestra en 50 ml de agua caliente y se calentó en baño maría por 60 min. Se enfrió a temperatura ambiente y aforó con agua destilada. Luego se filtró y se preparó una dilución 1:10 con agua destilada, la cual se leyó a 324 nm.

Se preparó una disolución patrón de ácido clorogénico con peso exacto de 0.1 g de ácido 5-cafeoilquínico y se aforó con agua destilada en un balón de 500 ml. Se prepararon diluciones con las siguientes concentraciones de ácido clorogénico de 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20 mg/L. Se construyó una curva de calibración; en base a la ecuación de la recta, se determinó la concentración de flavonoides expresados como ácido clorogénico (Solis, 2003; Solís, 2005).

### **6.3.3. Evaluación de la Actividad Antioxidante (Anexo 13.2)**

6.3.3.1 Determinación de la actividad antioxidante por cromatografía en capa fina (Caballeros, 2001; Gudiel, 2009; Vogel, 2005):

- a) Preparación de la muestra: Se pesaron 0.1 g de extracto y se disolvieron en 5 mL de metanol, se agitó y sonificó; posteriormente se filtró.
- b) Preparación de la placa: Se aplicó 10  $\mu$ L de muestra y 5  $\mu$ L del estándar antioxidante terc-butyl-hidroquinona (TBHQ), rutina, quercetina, vitamina C, vitamina E y Trolox en la cromatoplaque de silicagel 60F<sub>254</sub>
- c) Se colocó la placa en la cámara de vidrio saturada previamente con la fase móvil: acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (100:11:11:26).
- d) Revelado: Se asperjó con el reactivo de 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) a una concentración de 1mg/mL en metanol, recién preparado protegido de la luz.
- e) Interpretación de los resultados: Los extractos con actividad antioxidante presentan decoloración del DPPH (morado  $\rightarrow$  amarillo) en las bandas respectivas.

### 6.3.3.2 Actividad antioxidante por técnica micrométrica de DPPH

El objetivo de esta técnica es la determinación de la actividad antioxidante, en base al porcentaje de inhibición del DPPH, método micrométrico (Córdova, 2009; Gudiel, 2009, Om, 2008).

Procedimiento:

- a) Se preparó una solución madre de extracto, a una concentración de 20 mg/mL.
- b) De esta solución madre se preparó la siguiente serie de diluciones:

**Tabla 2. Preparación de diluciones para cuantificación de actividad antioxidante**

No.	Muestra ( $\mu\text{L}$ )	Metanol ( $\mu\text{L}$ )	Dilución	Concentración (mg/mL)
D-1	50	200	0.2	4
D-2	100	150	0.4	8
D-3	150	100	0.6	12
D-4	200	50	0.8	16
D-5	250	-----	1	20

- c) Solución de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) 150  $\mu\text{M}$  en metanol: Se pesó 1.7 mg de reactivo de DPPH y disolvió con metanol hasta un volumen de 25 ml en un balón aforado. Se agitó la solución y conservó en un recipiente ámbar. Por ser una solución inestable, se recomienda preparar únicamente lo necesario el mismo día que se va a emplear la solución.
- d) Preparación de los pozos de reacción: Se utilizaron microplacas de 96 pozos de fondo plano. Los pozos fueron nuevos. La preparación de las placas se realizó bajo luz indirecta, para proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar la vitamina C.

Se preparó una serie de pozos que contenían los reactivos que se citan a continuación. Todas las mediciones de volumen se realizaron con pipetas automáticas.

**Tabla 3. Preparación de muestras en placa de lectura de DPPH**

Pozo \ Reactivo	Muestra	Metanol	Solución de DPPH (150µM)
Blanco Control	---	220 µL	---
Control	---	20 µL	200 µL
Blanco de Ensayo	20 µL	200 µL	---
Ensayo	20 µL	---	200 µL

e) Distribución en la placa: En una misma placa se pueden leer cuatro muestras distribuidas adecuadamente. En la fila horizontal se colocan las repeticiones (A-C, F-H) y blanco de cada muestra (Columna D y E); y en la fila vertical se coloca cada dilución de ensayo (1-5, 8-12). En la fila 6A y 6H va el blanco del control; en la fila 7A y 7H va el control. Observar el siguiente esquema de distribución de muestras en una microplaca.

**Esquema 1. Distribución de las muestras en la placa de lectura de DPPH**

		R1	R2	R3		R3	R2	R1			
		H	G	F	E	D	C	B	A		
D-1	1				BM <sub>x</sub>	BM <sub>x</sub>				1	D-1
D-2	2				BM <sub>x</sub>	BM <sub>x</sub>				2	D-2
D-3	3				BM <sub>x</sub>	BM <sub>x</sub>				3	D-3
D-4	4				BM <sub>x</sub>	BM <sub>x</sub>				4	D-4
D-5	5				BM <sub>x</sub>	BM <sub>x</sub>				5	D-5
	6	BC							BC	6	
	7	CC							CC	7	
D-1	8				BM <sub>x</sub>	BM <sub>x</sub>				8	D-1
D-2	9				BM <sub>x</sub>	BM <sub>x</sub>				9	D-2
D-3	10				BM <sub>x</sub>	BM <sub>x</sub>				10	D-3
D-4	11				BM <sub>x</sub>	BM <sub>x</sub>				11	D-4
D-5	12				BM <sub>x</sub>	BM <sub>x</sub>				12	D-5
		H	G	F	E	D	C	B	A		
		R1	R2	R3			R3	R2	R1		

D = Diluciones de muestra, R = Repeticiones, BMx = Blanco de Muestra, BC = Blanco control, CC = Control

Se prepararon los pozos de reacción, según se indica en el inciso “C”; la microplaca se agitó en un vortex para placas durante 30 segundos y luego se incubó a temperatura ambiente protegida de la luz durante 30 minutos. La lectura integral realizada fue a longitud de onda de 490 nm.

- f) Para calcular el porcentaje de inhibición de cada uno de los pozos de reacción se usó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia del ensayo}}{\text{Absorbancia del control}} * 100 = \% \text{ Inhibición}$$

Absorbancia del control = Absorbancia del Control – Absorbancia del Blanco Control

Absorbancia del ensayo = Absorbancia del Ensayo – Absorbancia del Blanco respectivo

Esperando que uno de los valores de porcentaje de inhibición se encuentren entre el 60-70% y empleando la concentración de cada dilución, se elaboró una gráfica lineal. La ecuación de la recta tuvo un  $r^2$  entre 0.97-0.99, por lo que la corrida fue aceptada.

Si no se cumplía con un porcentaje de inhibición ente 60-70% y un  $r^2$  entre 0.97-0.99, se repetirá el ensayo con otras diluciones, en caso la muestra estuviera muy concentrada, y se controló el pipeteo para mejorar el  $r^2$ .

Ya con una ecuación de regresión lineal, se determinó la concentración inhibitoria media, según la siguiente fórmula:

$$CI_{50}: \frac{50\% - \text{pendiente}}{\text{Intersecto}}$$

### 6.3.3.3 Cuantificación de fenoles totales por técnica micrométrica

Los polifenoles son un gran grupo de compuestos presentes en la naturaleza que poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos. Estos compuestos son en su mayoría potentes

antioxidantes, por su estructura química (donador de H<sup>+</sup> o electrones). La cuantificación se basa en una reacción colorimétrica de oxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu (Álvarez, 2008; Córdova, 2009; Vasco, 2008).

Procedimiento:

- a) Preparación de reactivos:
- Carbonato de sodio al 2%: en un beacker se pesó 2 g de carbonato de sodio, en balanza analítica, con 60 mL de agua desmineralizada se disolvió la sal; se puede emplear el sonificador para facilitar el proceso. Ya disuelta la sal se trasvasó cuantitativamente a un balón aforado de 100 mL, con agua desmineralizada.
  - Ácido gálico: para la curva de ácido gálico se utilizaron las siguientes concentraciones: 50, 250, 450, 650, 850, 1050 y 1250  $\mu\text{M}$  en etanol.
  - Extracto: pesar 0.1 g de extracto y disolverlo en 5mL de metanol, de ser necesario emplear 20  $\mu\text{L}$  de dimetil-sulfoxido (DMSO), para extractos apolares. De esa solución madre se preparó una dilución de prueba, la cual se espera tenga una absorbancia que entre dentro de la curva del ácido gálico. Dicha dilución puede ser la que en la determinación de actividad antioxidante por DPPH, brinde un porcentaje de inhibición entre el 60-70%.
- b) Preparación de los pozos de reacción: utilizar microplacas de 96 pozos de fondo plano. Los pozos a utilizar deben ser nuevos. La preparación de las placas se realiza bajo luz indirecta, para proteger de la reacción de la luz, la cual puede degradar la vitamina C.

Se preparó una serie de pozos que contienen los reactivos que se citan a continuación; todas las mediciones de volumen se realizaron con pipetas automáticas:

**Tabla 4. Preparación de muestras en placa de lectura de fenoles totales**

<b>Reactivo</b> <b>Pozo</b>	<b>Muestra /St</b>	<b>Agua</b>	<b>Reactivo de Folin</b>	<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2%</b>
Blanco Control	---	25 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
Ensayo	25 $\mu\text{L}$	---	50 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$

- c) Distribución en la placa: en una misma placa se puede leer la curva de ácido gálico y varias muestras. Observar el siguiente esquema de distribución de muestras en una microplaca.

**Esquema 2. Distribución de las muestras en la placa de lectura de fenoles totales**

Diferentes diluciones de estándar

		H	G	F	E	D	C	B	A	
Curva Ác. Gálico, repeticiones	1									1
	2									2
	3									3
	4									4
	5									5
	6									6
Repeticiones de Muestra	7	BC							BC	7
	8									8
	9									9
	10									10
	11									11
	12									12

Dilución de cada muestra a ensayar

BC = Blanco control

Se agitó en un vortex para placas durante 30 segundos y luego se incubó a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 2 horas. Se lee en lector de microplacas de 96 pozos a una longitud de onda de 630 nm.

- d) Cálculo de fenoles totales

Concentración base curva (CBC)= Abs – Intercepto/pendiente.

$$\mu\text{g equivalentes Ác. Gálico/g de extracto} = \frac{[(\text{CBC}/0.025) * (\text{Peso alícuota}/\text{Vol. Reconstitución}) * 1000]}{\text{Dilución}}$$

### 6.3.4. Evaluación de Actividad Antimicrobiana (Anexo 13.3)

#### 6.3.4.1 Tamizaje antimicrobiano mediante técnica de agar planta

Las bacterias son organismos de vida libre que tienen curvas de crecimiento máximo de 24 a 48 horas en medios artificiales específicamente diseñados. El antibiograma es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad o sea, sensibilidad o resistencia, de una bacteria a un grupo de antibióticos. Las técnicas de antibiograma son las utilizadas en el laboratorio de microbiología para estudiar la actividad de los antimicrobianos frente a los microorganismos responsables de las infecciones (Cáceres, 1998; Castro, 2009; Mitscher, 1972).

Procedimiento:

- a) Disolución del extracto
  - En la balanza analítica se pesaron 100 mg de extracto y se disolvieron en 10 mL de etanol al 50%.
  - Se agitó en un vortex hasta que estuviera bien disuelto.
  - La concentración del extracto fue de 10 mg/mL
  
- b) Preparación de Agar-planta
  - Se prepararon tubos con 9.0 mL de agar Mueller Hinton (dos tubos por cada extracto). Se esterilizaron en autoclave.
  - Se trabajó en una campana de flujo laminar
  - Se prepararon 2 cajas de agar-planta por cada extracto. En una caja de petri simple se agregó 1.0 mL de la solución de extracto preparado y los 9 mL de agar Mueller Hinton. Se tapó la caja y se homogenizó con movimientos circulares. La concentración final que se obtuvo fue de 1 mg/mL.
  - Se hicieron dos cajas control con un 1mL de etanol al 50% y 9 mL de agar Mueller Hinton.
  - Se dejó solidificar e incubó a 36°C por 24 horas, para comprobar esterilidad.
  - Se guardaron en refrigeración hasta el momento de usar.
  
- c) Preparación del inóculo
  - Se purificó el microorganismo a ensayar se inoculó en una caja de petri con agar tripticasa soya, se incubó a 36°C durante 24 horas.

- Se inoculó una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 mL de caldo Tripticasa soya, y se incubó a 36°C durante 24 horas.
- Se diluyó 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de solución salina estéril al 0.85% (dilución 1:100).

d) Demostración de la actividad antibacteriana

- Se inocularon en las cajas con agar-planta una asada de cada uno de los microorganismos según el patrón de la plantilla. Se hicieron seis repeticiones por microorganismo. Se dejó reposar durante 5-10 minutos y, posteriormente, se incubaron a 36°C durante 24 horas.
- Se utilizó como control negativo una caja de agar petri con 1 mL de etanol al 50% y 9 mL de agar Müller Hinton
- Cuadro del patrón de inoculación:

**Tabla 5. Distribución de las bacterias en cada una de las cajas**

	<b>Bacterias</b>	<b>Caja A</b>	<b>Caja B</b>
A	<i>E. coli</i> ATCC 8739	1, 8, 12	2, 6, 13
B	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	4, 10, 14	5, 8, 11
C	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	13, 2, 9	1, 3, 14
D	<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	3, 6, 7	15, 7, 12
E	<i>S. epidermidis</i> aislada de herida	5, 11, 15	4, 9, 10,

e) Interpretación de resultados

- Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo
- Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

6.3.4.2 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la actividad antimicrobiana por técnica de microdilución (Castro, 2009; Machado, 2005).

a) Preparación de extracto:

Se pesó 0.1 g de extracto y se disolvieron en 10 mL de buffer de fosfato (PBS).

b) Realización de suspensión de bacterias

- Se utilizaron cepas con 24 horas de incubación para la realización del estándar de MacFarlan 0.5
- Se tomaron de 2 a 3 colonias de la bacteria y se suspendieron en tubos con caldo Müller Hinton.
- Se ajustó la turbidez a un estándar de MacFarlan 0.5 por medio de un turbidímetro (rango de turbidez 0.09-0.10).
- Utilizar inmediatamente después de preparado para evitar proliferación bacteriana.

c) Preparación de revelador

- Se preparó una solución de 0.4 mg/mL de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium) en buffer de fosfato y se utilizó inmediatamente después de preparado para evitar que reaccionara con la luz.

d) Inoculación en la placa:

- Se inoculó según se muestra en el esquema, con un control de crecimiento bacteriano, un control de esterilidad del caldo Mueller Hinton y un control de esterilidad de extracto, en placas con fondo plano.
- Se añadieron 200  $\mu$ L de caldo Mueller Hinton en la columna 1 (de la 1A a la 1H).
- Se agregó en todos los pozos 100  $\mu$ L de caldo Mueller Hinton, con excepción en la columna 4 (de la 4A a la 4H).
- Se agregó en la columna 4, 200  $\mu$ L de la dilución madre de extracto.
- Se transfirieron de los pozos de la columna 4 (posición 4A a la 4H) 100  $\mu$ L a los pozos de la columna 5 (posiciones 5A a la 5H) y así sucesivamente, hasta llegar a los pozos de la fila 12. NOTA: no cambiar punta de pipeta entre cada una de las diluciones.
- Finalmente se tomaron 100  $\mu$ L de los pozos de la fila 12 y se descartaron. De esta forma se obtuvieron diluciones seriadas del extracto con un volumen total de 100  $\mu$ L.
- Se añadió 100  $\mu$ L de la suspensión de bacterias a todos los pozos de las filas 3 a 12.
- Se incubó a 35°C por 16-18 horas.
- Se agregaron 50  $\mu$ L de la solución de MTT a todos los pozos de la placa.
- Se incubó por 2 horas a 35°C en cámara húmeda y se leyó la absorbancia a 492 nm.

**Esquema 3. Distribución de las muestras en la placa para determinación de CIM antibacteriana**

Reactivo		A	B	C	D	E	F	G	H	Cantidad	
Ctl. Neg	Esterilidad del medio	○	○	○	○	○	○	○	○	200 $\mu$ L medio	
Ctl. pos	Bacteria	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L medio	+100 $\mu$ L bacteria
ATB	Dilución 1	○	○	○	○	○	○	○	○	200 $\mu$ L D1	100 $\mu$ L bacteria
	Dilución 2	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L D2	
	Dilución 3	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L D3	
	Dilución 4	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L D4	
	Dilución 5	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L D5	
	Dilución 6	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L D6	
	Dilución 7	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L D7	
	Dilución 8	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L D8	
	Dilución 9	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L D9	
	Dilución 10	○	○	○	○	○	○	○	○	100 $\mu$ L D10	
		50 $\mu$ L MTT								100 $\mu$ L descartar	

### 6.3.5 Elaboración de gel cicatrizante en base a extracto etanólico de hoja y corteza de *Rhizophora mangle* L. (Anexo 13.4)

En base a los resultados de cantidad de metabolitos secundarios, actividad antioxidante y antibacteriana se realizó un gel cicatrizante de extracto etanólico de hoja o corteza de mangle. Se preparó el gel a una concentración de extracto de 0.5% (5 mg/mL); con la finalidad de tener un producto que presentara la acción cicatrizante deseada.

#### 6.3.5.1 Fórmula de gel de extracto etanólico de hoja o corteza de mangle (Remintong, 2000)

Carbapol.....	5.0 g.
Alcohol 50%.....	395 ml
Extracto de mangle disuelto al 5% en etanol al 50%.....	50 ml
Metilparabenos.....	720 mg
Propilparabenos.....	80 mg
Trietanolamina.....	0.6 ml

Glicerina..... 6 mL

#### 6.3.5.2 Procedimiento de elaboración:

- Medir 395 mL de alcohol al 50%, 6 mL de glicerina y agregar el carbopol tamizado, se mezcló y eliminó los grumos.
- Dejar de agitar hasta obtener una solución transparente.
- Pesar los preservantes y disolverlos en agua caliente; ya disueltos, agregar al carbopol y mezclar.
- Agregar 50 mL de la solución del extracto etanólico de mangle a una concentración determinada.
- Agregar la trietanolamina, mezclar hasta tener viscosidad deseada.
- Embasar, rotular y almacenar las muestras.

### 6.3.6 Estudio de estabilidad del gel

#### 6.3.6.2 Evaluación de color

El análisis se realizó una vez por semana, durante 6 semanas, desde el primer día de elaboración. Para la evaluación del color se tomó una muestra del gel en medio de dos portaobjetos, limpios y secos. Se determinó el color por comparación con el pantone. Se empleó un panel de observadores para la determinación del color.

#### 6.3.6.3 Cuantificación de metabolitos marcadores: taninos y flavonoides

El análisis se realizó una vez por semana, durante 4 semanas, iniciando desde el primer día de elaboración. Como método de cuantificación de los metabolitos, se utilizaron las técnicas descritas anteriormente para cuantificación en base a extracto.

### 6.3.6 Proliferación de fibroblastos (Anexo 13.5)

Se utilizaron fibroblastos de pulmón de hámster chino (QC) y fibroblastos de murino (L-929), se sembraron tomando 1 mL de células triptinizadas y 10 mL de medio de cultivo (medio Sigma: minimum essential medio eagle, suplementado con suero fetal bovino), de dicha mezcla se colocaron 100  $\mu$ L en cada pozo de una placa de 96 pocillos, se incubaron a 37°C en una incubadora humidificada de CO<sub>2</sub> al 5%: 95% atmósfera de aire. El médium fue reemplazado después de 24 horas con 50  $\mu$ L del medio de cultivo. Los extractos se disolvieron en etanol al 50% con solución madre de 20 mg/mL de la cual se prepararon varias diluciones: 62.5, 31.25, 15.6, 7.8 y 3.9  $\mu$ g/mL,

se empleó el medio de cultivo para diluir; a la placa se le agregó 50  $\mu\text{L}$  de cada dilución en sus respectivos pozos y se agregaron en el pozo control otros 50  $\mu\text{L}$  de medio, para un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  en cada pozo. Las células se incubaron por 48 horas en la incubadora con  $\text{CO}_2$  al 5% y el crecimiento celular se determinó al utilizar el ensayo de la oxidación del reactivo MTT. Después de la incubar las células se les agregó 10  $\mu\text{L}$  de solución de MTT a concentración de 5 mg/mL, se volvió incubar a  $37^\circ\text{C}$  por 2 horas; se visualizó en el microscopio la formación de cristales. Se descartó el medio, se agregó 100  $\mu\text{L}$  de etanol al 95% a cada pozo de la placa, para disolver los cristales y se realizó la lectura a 570 nm en lector de placa. Se calculó el porcentaje de proliferación en base a la absorbancia de los pozos del control y la absorbancia de cada pozo, según la dilución del extracto probado (Adetutu, 2011; Vile, 1995; Wang, 2011).

#### **6.4 Diseño Estadístico**

Se realizó un muestreo aleatorizado a conveniencia de las muestras, se colectaron 5 muestras de hojas y 5 de corteza de mangle rojo. Para la evaluación de la actividad antioxidante se realizó un análisis de varianza con cinco repeticiones de cada una de las muestras.

La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó de forma descriptiva.

Para la cuantificación de flavonoides y taninos, se tomaron tres muestras al azar de los extractos etanólicos de hoja y tres de corteza de mangle; se realizó el análisis estadístico por medio de la prueba de T de Student, con un intervalo de confianza de 95%.

Para el análisis estadístico de la estabilidad del gel, se empleó el análisis de varianza y se eligieron los extractos etanólicos de hoja y corteza de mangle que mejores resultados presentaron.

## 7. RESULTADOS

En la tabla 6 se presenta la cuantificación de los compuestos químicos presentes en los extractos. Se observan los promedios generales de la cantidad de taninos y flavonoides y su respectiva desviación estándar, se observa una diferencia entre la cantidad de metabolitos en cada órgano así como por el punto de colecta.

**Tabla 6** Cuantificación de metabolitos secundarios en extractos etanólicos de hoja y corteza de *Rhizophora mangle* L.

Muestra	Lugar de muestreo	Porcentaje de Taninos (%)	ppm de flavonoides expresados como ácido clorogénico
Hoja	1	17.17 ± 1.27	407.74 ± 2.72
	2	29.28 ± 2.79	153.10 ± 2.64
	3	16.14 ± 1.04	515.03 ± 2.23
	4	13.12 ± 1.20	333.44 ± 2.48
	5	3.85 ± 0.44	166.82 ± 1.03
Corteza	1	23.19 ± 0.88	412.07 ± 3.66
	2	26.83 ± 0.45	196.87 ± 3.46
	3	25.51 ± 1.08	181.44 ± 2.69
	4	31.57 ± 2.56	215.84 ± 3.35
	5	25.99 ± 4.71	179.15 ± 4.02

Fuente: Propia a partir de datos experimentales

Se presenta la cuantificación de los metabolitos secundarios, flavonoides y taninos, sobre el extracto.

El análisis de varianza demuestra que existe diferencia significativa entre los taninos de cada sitio de colecta y flavonoides de sitio de colecta; tanto de hoja como de corteza, con un valor  $p < 0.05$ .

En la tabla 7 se presentan los datos de la evaluación de la actividad antioxidante, se compararon los resultados de actividad antioxidante de los extractos etanólicos de hoja y corteza de mangle rojo y se observan medias muy similares de actividad antioxidante entre los extractos de hoja y corteza.

**Tabla 7:** Evaluación de la actividad antioxidante por técnicas micrométricas de extractos etanólicos de hojas y corteza de *Rhizophora mangle* L.

Muestra	Lugar de muestreo	Cromatografía en capa fina DPPH	CI <sub>50</sub> DPPH (mg/mL)	Fenoles Totales (µg ácido gálico/g extracto)
Hoja	1	++++ <sup>(**)</sup>	0.22 ± 0.01	134.97 ± 3.92
	2	++++	0.18 ± 0.01	227.76 ± 6.36
	3	++++	0.29 ± 0.02	134.49 ± 3.45
	4	+++	0.43 ± 0.01	98.87 ± 2.53
	5	++	1.03 ± 0.07	31.09 ± 0.80
Corteza	1	++++	0.27 ± 0.01	134.53 ± 3.76
	2	++++	0.25 ± 0.01	165.94 ± 4.59
	3	++++	0.32 ± 0.02	113.25 ± 2.89
	4	++++	0.25 ± 0.03	150.43 ± 3.85
	5	++++	0.36 ± 0.03	110.08 ± 2.81
Vitamina C	Estándares	++++	0.09 ± 0.01	-----
Rutina		++++	0.17 ± 0.01	-----
Quercetina		++++	0.0749 ± 0.0004	-----
TBHQ*		++++	0.11 ± 0.01	-----
Trolox		++++	0.118 ± 0.001	-----

Fuentes Propia a partir de datos experimentales

\* Ter-butyl hidroxil quinona. \*\* (- : ausencia de actividad, ++ moderada actividad, +++ buena actividad).

La determinación de la actividad antioxidante mediante pruebas cualitativas (CCF) mostró actividad en cada uno de los puntos. Se observan valores de CI<sub>50</sub> bajos, especialmente en el punto 2 de la hoja, así como el valor más alto de compuestos fenólicos; no supera los valores reportados a los estándares pero están muy cercanos. Los dos métodos cuantitativos de actividad antioxidante presentan correlación estadísticamente significativa con un valor de p<0.0001.

En la tabla 8 se presenta los resultados de la evaluación biológica antibacteriana de los extractos; la evaluación inicial se realizó con seis repeticiones con prueba de hipótesis binomial, la cual mostró actividad significativa ( $p=0.0156$ )

**Tabla 8:** Concentración inhibitoria mínima (CIM) de extractos etanólicos de hoja y corteza de *Rhizophora mangle* L.

Muestra	Lugar de muestreo	<i>Escherichia coli</i> 8739	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027	<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 14990	<i>Staphylococcus epidermidis</i> salvaje
Hoja	1	> 1mg/mL	> 1mg/mL	> 1mg/mL	1mg/mL	1mg/mL
	2	> 1mg/mL	> 1mg/mL	1mg/mL	1mg/mL	1mg/mL
	3	> 1mg/mL	> 1mg/mL	> 1mg/mL	1mg/mL	1mg/mL
	4	> 1mg/mL	> 1mg/mL	> 1mg/mL	1mg/mL	1mg/mL
	5	> 1mg/mL	> 1mg/mL	> 1mg/mL	> 1mg/mL	> 1mg/mL
Corteza	1	> 1mg/mL	> 1mg/mL	1mg/mL	1mg/mL	1mg/mL
	2	> 1mg/mL	> 1mg/mL	> 1mg/mL	1mg/mL	1mg/mL
	3	> 1mg/mL	> 1mg/mL	1mg/mL	1mg/mL	1mg/mL
	4	> 1mg/mL	> 1mg/mL	1mg/mL	1mg/mL	1mg/mL
	5	> 1mg/mL	> 1mg/mL	> 1mg/mL	1mg/mL	1mg/mL

Fuentes Propia a partir de datos experimentales

Para la inhibición del crecimiento de *E. coli* 8739 y *P. aeruginosa* 9027, se requiere concentraciones de extracto por arriba de 1 mg/mL; mientras que la mayoría de las muestras inhibieron el crecimiento de *S. aureus* 6538, *S. epidermidis* 14990 y *S. epidermidis* salvaje a una concentración de 1 mg/mL.

En la tabla 9 se presenta los resultados de la evaluación de la estimulación en la proliferación de dos líneas de fibroblastos; por los extractos etanólicos analizados, se observa que los extractos de hoja presentan mayor estimulación de la proliferación que los de la corteza.

**Tabla 9:** Influencia de los extractos etanólicos en el porcentaje de proliferación de dos líneas diferentes de fibroblastos, mediante ensayo con MTT

Muestra	Lugar de muestreo	Fibroblastos de Pulmón de Hámster Chino (DQ)					Fibroblasto de Murino L-929				
		62.5	31.25	15.6	7.8	3.9	62.5	31.25 µg/mL	15.6 µg/mL	7.8 µg/mL	3.9 µg/mL
		µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL				
Hoja	2	36.78 ±0.41	67.84 ±5.91	97.65 ±11.28	100.30 ±2.51	128.3 ±2.95	65.13 ±7.03	122.09 ±12.91	113.08 ± 11.0	110.72 ±4.97	114.72 ±2.18
	4	43.03 ±7.15	104.66 ±4.44	110.98 ±10.02	111.97 ±9.21	110.39 ±3.57	125.83 ±8.65	112.31 ±3.67	109.14 ±1.57	109.54 ±2.64	105.38 ±1.83
Corteza	1	27.28 ±0.76	56.26 ±11.90	83.95 ±3.15	84.77 ±5.29	91.25 ±13.33	50.75 ±3.98	117.94 ±0.43	113.67 ±1.31	111.01 ±1.48	101.67 ±6.38
	2	30.72 ±3.91	60.03 ±3.63	90.01 ±4.94	110.26 ±7.18	101.76 ±3.06	67.18 ±3.63	116.79 ±1.82	114.66 ±2.79	108.05 ± 3.36	107.90 ±7.20

Fuentes Propia a partir de datos experimentales

Se realizó el experimento con los extractos etanólicos de los puntos de muestreo que presentaron los mejores resultados en las pruebas anteriores, con células de 48 horas de crecimiento. Se observa que los extractos de hojas generan un porcentaje de proliferación mayor, por arriba de 100, en ambas líneas celulares de fibroblastos estudiadas, en comparación con los extractos de corteza; se observó mayor estimulación en los fibroblastos de murino L-929, se generó la mayor proliferación con concentraciones de 31.25 µg/mL para el punto 2 y de 62.5 µg/mL para el punto 4. Mientras, la corteza presentó muy poca estimulación de proliferación en ambas líneas celulares. Resultados por debajo de 100, se pueden visualizar como citotoxicidad, ya que interfiere con el crecimiento normal de los fibroblastos.

En la tabla 10 se indica el color que presentó el gel que se elaboró en base a extracto etanólico de hoja y corteza de mangle rojo, con concentración del 0.5% de extracto.

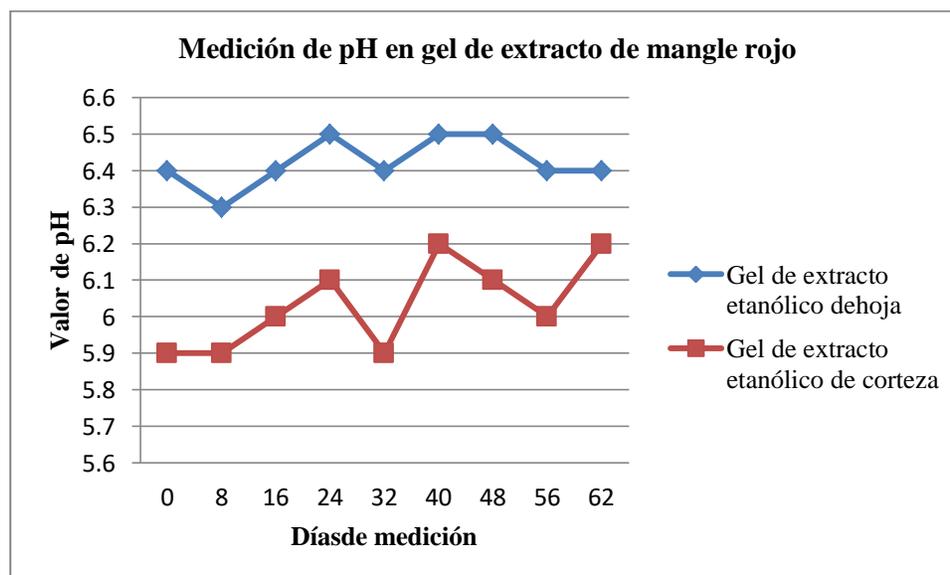
**Tabla 10.** Determinación del color del gel elaborado en base a etanólicos de hoja y corteza de *Rhizophora mangle* L.

Gel	Color Pantone COMEX	Foto
Extracto etanólico de hoja	Ámbar I2-09	
Extracto etanólico de corteza	San miguel de allende I2-12	

Fuentes Propia a partir de datos experimentales

Ambos geles elaborados en base al extracto etanólico de hoja o corteza de mangle rojo, presentaron una coloración naranja, que se mantuvo constante durante el tiempo del análisis.

En la figura 1 se observa el resultado del estudio de estabilidad del gel elaborado en base a extracto etanólico de mangle rojo, se tomó como parámetro de medición el pH del producto terminado

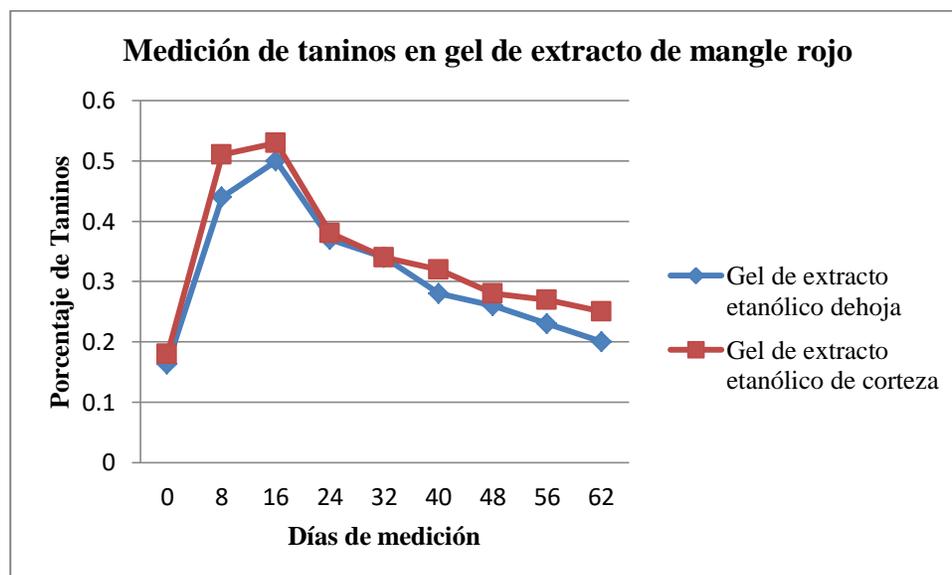


Fuentes Propia a partir de datos experimentales

**Figura 1** Determinación de pH en los geles preparados en base a los extractos etanólicos de hoja y corteza de *Rhizophora mangle* L.

Se observa que el valor de pH se mantuvo constante, tanto en el gel de extracto de hoja como en la corteza de mangle rojo, durante las ocho mediciones que se realizaron cada 8 días; esto indica que el producto formulado fue estable durante el tiempo de estudio.

En la figura 2 se observa el estudio de estabilidad del gel elaborado en base a extracto etanólico de mangle rojo. Se tomó como parámetro de medición la cantidad de taninos, en base a la concentración de extracto en el producto terminado

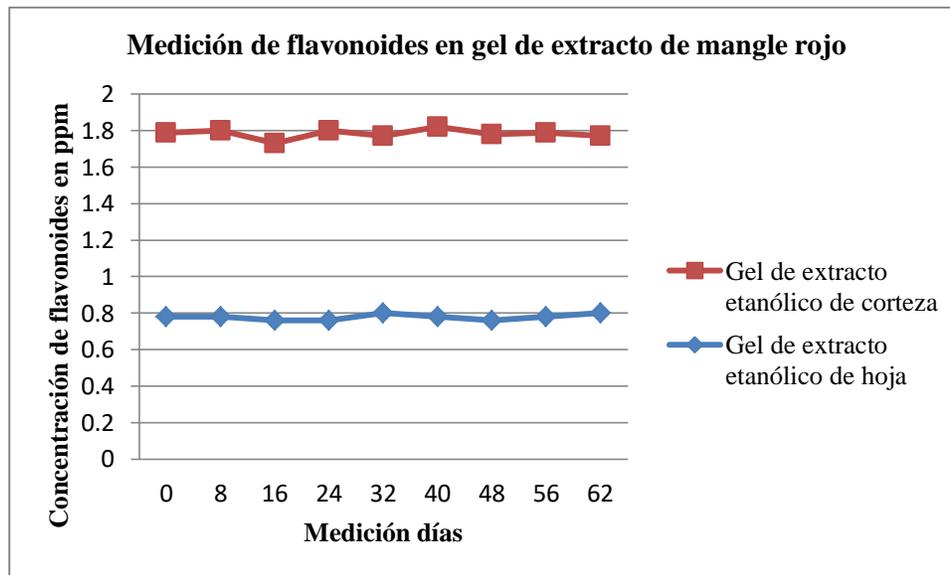


Fuentes Propia a partir de datos experimentales

**Figura 2** Cuantificación de taninos en los gels preparados en base a los extractos etanólicos de hoja y corteza de *Rhizophora mangle* L.

Se observa que el porcentaje de taninos presentó aumento y posterior descenso durante el tiempo de medición, tanto en el gel de extracto de hoja como en la corteza de mangle rojo, durante las ocho mediciones que se realizaron cada 8 días.

En la figura 3, se observan los resultados del estudio de estabilidad del gel, elaborado en base a extracto etanólico de mangle rojo; se tomó como parámetro de medición, la cantidad de flavonoides en la concentración del extracto en el producto terminado.



Fuentes Propia a partir de datos experimentales

**Figura 3** Cuantificación de flavonoides en los geles preparados en base a los extractos etanólicos de hoja y corteza de *Rhizophora mangle* L.

Se observa que la concentración de flavonoides, expresados como ppm, se mantuvo constante, tanto en el gel de extracto de hoja como en la corteza de mangle rojo, durante las ocho mediciones que se realizaron cada 8 días; eso indica que el producto formulado fue estable durante el tiempo de estudio.

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El mangle *Rhizophora mangle* L. de la reserva de Monterrico, se ha investigado farmacológicamente desde hace varios años, Cruz y otros (2013), mostraron que el contenido de taninos en las hojas es similar al de la corteza, lo cual fue una base importante para el presente estudio, junto con la información del efecto cicatrizante de los taninos (Melchor, 1999), que ha permitido comparar si los taninos de mangle tienen esa acción y si hay diferencia entre hojas y corteza.

Desde hace algunos años se investiga la actividad farmacológica y el desarrollo de formulaciones del *R. mangle* para uso animal y humano, con resultados preclínicos y clínicos que han demostrado su actividad y eficacia como cicatrizante, antiséptico y antioxidante, debido mayoritariamente a la presencia de taninos (Sánchez, 1998; Melchor, 1999; Sánchez, 2007). Como se observa en la Tabla 6, los extractos etanólicos de hoja y corteza de mangle presentan elevada cantidad de taninos, con porcentaje por arriba del 10% en la mayoría de las muestras estudiadas (Sánchez, 2005). El extracto etanólico de corteza del punto de muestreo 4 y hoja del punto 2 fueron las que estadísticamente tuvieron mayor cantidad de taninos con 31.57% y 29.28%, respectivamente, acorde con los resultados del estudio de Travieso y otros (2011), realizado en Cuba.

La cantidad de flavonoides fue variada en cada uno de los puntos; se encontró mayor cantidad en las muestras de hojas que en la corteza. El análisis estadístico indicó que no existe correlación entre la cantidad de taninos y de flavonoides, a pesar de que ambos metabolitos son compuestos con características fenólicas, con rutas de biosíntesis similares (Sánchez, 1998).

Los taninos y flavonoides son compuestos fenólicos, a los que se les atribuye actividad antioxidante; desde el punto de vista cualitativo, todos los extractos presentaron actividad antioxidante evidenciándose por medio de cromatografía en capa fina por inhibición del radical de DPPH; al determinar la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ), se evidencia que la mejor actividad, está en el extracto de hoja del punto 2 con un valor de  $CI_{50}$  de 0.18mg/mL; da el valor más alto de compuestos fenólicos, lo que muestra correlación entre los valores reportados por DPPH y la cuantificación de fenoles totales. Ambas pruebas presentan significancia estadística con un valor de

$p < 0.0001$ . Ninguno de los resultados de los extractos presenta mejor actividad que los estándares, pero son muy cercanos y se pueden visualizar como una alternativa a nivel industrial.

El análisis de varianza realizado a los datos de la cantidad de taninos, flavonoides y actividad antioxidante de los extractos etanólicos de hoja y corteza de mangle rojo, presentan diferencia significativa con un valor de  $p < 0.05$ ; por lo que es importante tomar en cuenta la época de colecta para obtener la droga vegetal que presente la mayor cantidad de metabolitos secundarios y actividad biológica significativa (Sánchez, 2005; Sánchez, 2012).

Por sus propiedades astringentes a los taninos se les atribuye actividad cicatrizante. En los estudios realizados sobre la actividad cicatrizante de la corteza de mangle (Sánchez, 2009; Faure y Rojas, 2015), propiedades atribuidas a los taninos; los extractos de hojas presentan cantidad de taninos muy similar a la de la corteza. El estudio realizado por Sánchez y otros (2009), demostró que las propiedades antioxidantes de *R. mangle* tienen una relación con el proceso de cicatrización en ratas; los autores demostraron que el extracto con mayor cantidad de compuestos fenólicos, que son los que tienen la actividad antioxidante, favorecen el proceso de cicatrización ya que se observó una disminución del tamaño de la herida, después del tratamiento con los extractos etanólicos de mangle rojo; con actividad cicatrizante similar a la vitamina C usada como control.

En base a la cantidad de metabolitos secundarios y la actividad antioxidante, se observa que los extractos etanólicos de hoja presentan un comportamiento muy parecido a los de la corteza, los cuales tienen actividad cicatrizante comprobada. La prueba estadística de t-student para la cantidad de taninos, flavonoides y actividad antioxidante indica que no existe diferencia entre los extractos etanólicos de hoja y corteza de *R. mangle*, por lo que con base a la cantidad de taninos y actividad antioxidante se puede determinar que la hoja de mangle presenta la misma actividad cicatrizante que la reportada para la corteza, como lo comprobó Faure y Rojas (2015), quienes demostraron que los extractos de corteza favorecían el proceso de cicatrización en heridas de bovinos.

La actividad antibacteriana, no es significativa contra *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; por otra parte, el extracto etanólico de hoja del punto 2 y casi todos los de la corteza mostraron actividad mínima inhibitoria en concentración de 1mg/mL contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* de tipo ATCC como cepa salvaje, lo que es importante ya que estas son bacterias que se encuentran por lo general en la piel y pueden ocasionar infecciones en las

heridas, lo que afecta o retrasa el proceso de cicatrización (Stadelmann, 1998; Faure y Rojas, 2015; Montes de Oca, 2001). La actividad antibacteriana determinada sobre *S. aureus* coincide con lo reportado por Sánchez y otros en 2005, en que se comprobó la inhibición del crecimiento de dicha especie producida por la corteza de mangle rojo, de una región de Cuba; también el estudio realizado por Faune y otros en 2015 mostró que los extractos de mangle rojo tenían un efecto bacteriostático o bactericida sobre las heridas en las patas de bovinos y ello favorecía el proceso de cicatrización, en comparación con los que no recibían tratamiento con mangle rojo.

En la regeneración de los tejidos, los fibroblastos juegan un papel muy importante, ya que ellos están involucrados en la migración, proliferaciones, contracciones y producción de colágeno (Woodley, 1985). La capacidad para estimular el crecimiento celular de fibroblastos es un modelo útil para las pruebas de la herida, actividad cicatrizante *in vitro* (Adetutu, 2011; Wang, 2011). En la tabla 9, se observan los resultados de la evaluación de fibroblastos en dos líneas diferentes; los extractos de hoja del punto 2 de muestreo presentan una mejor actividad, ya que con mejor concentración se obtuvo una mayor estimulación en la proliferación en ambas líneas celulares superando el 100% de proliferación, mientras que los extractos de corteza no presentaron una actividad notoria. No se encontraron estudios sobre los extractos de mangle en la proliferación celular, pero los resultados son muy similares a los reportados por Adetutu (2011), sobre especies africanas empleadas como cicatrizante; por lo que se puede establecer que los extractos etanólicos de mangle presentan un efecto favorable para la cicatrización.

Existen estudios que establecen que el proceso de cicatrización se ve favorecido por la ausencia de infección bacteriana y de radicales libres durante las diferentes fases de la cicatrización, así como la estimulación de los fibroblastos (Adetutu, 2011; Wang, 2011). En base a esto, se puede establecer que los extractos etanólicos de hojas de mangle rojo pueden tener buena actividad cicatrizante, ya que presentaron una actividad antioxidante importante, una actividad antibacteriana moderada y una estimulación de fibroblastos en las dos líneas celulares investigadas. Es importante realizar estudios posteriores sobre estimulación de proliferación de fibroblastos de piel humana; con eso, se respaldaría toda la evidencia *In vitro* sobre la actividad cicatrizante que presentan las hojas de mangle rojo.

Los parámetros analizados en el producto fueron el color, el comportamiento del pH, la cantidad de taninos y flavonoides durante un tiempo aproximado de dos meses. Como se observa

en la tabla 10, el color que se reportó para los extractos son tonos muy similares en el rango del color rojizo pardo; dicho color coincide con el reportado por Pérez y otros (2011), en su estudio de estabilidad de dos años de un gel en base a *R. mangle*.

En las figuras 1 a 3, se puede observar el comportamiento de parámetros como: pH, cantidad de taninos y flavonoides durante los periodos de medición. Tanto el pH como la cantidad de flavonoides se mantuvieron constantes durante el tiempo, tanto en el gel de hoja como en el de corteza; los taninos presentaron un incremento durante el tiempo; el incremento en la concentración de taninos totales pudo estar relacionado con una polimerización espontánea de los polifenoles en el tiempo, similar a lo que le ocurre a la planta *R. mangle* durante su envejecimiento, donde se desaparecen las estructuras de bajo peso molecular y se favorece la polimerización. Este aspecto provoca un aumento en los valores de taninos cuantificados por la técnica colorimétrica empleada, debido al principio del método. Por otra parte, la tendencia a la disminución de la concentración de taninos con el paso del tiempo puede relacionarse con procesos de oxidación de los grupos fenólicos (Kandil, 2004).

Este comportamiento de la cantidad de taninos en los geles de extracto etanólico de hoja y corteza de mangle fue el mismo observado por Pérez y otros en el 2012, donde ellos comprobaron que el producto es estable durante un estudio de dos años. Se observan que los parámetros monitoreados en esta investigación presentan un comportamiento muy similar a los resultados reportados por esos autores, ello indica que los geles preparados en el presente estudio presentan una estabilidad adecuada. Es indispensable hacer notar que se requiere un estudio de estabilidad de mayor tiempo, así como monitorear otros parámetros de calidad como: viscosidad, extensibilidad y calidad microbiana del producto; asimismo hacer lotes más grandes para monitorear la reproducibilidad de la fórmula y el proceso de fabricación.

La actividad biológica reportada por los extractos etanólicos de hoja de *R. mangle* y la estabilidad del gel elaborado en base al extracto, determinó que la hoja de mangle rojo es una droga vegetal adecuada para favorecer el proceso de cicatrización, la cual tiene potencial para ser utilizada por la industria fitofarmacéutica.

## 9. CONCLUSIONES

- 9.1. Los resultados obtenidos en el análisis químico realizado para determinar la cantidad de flavonoides y taninos, en los extractos etanólicos de hojas de *R. mangle*, muestran estadísticamente que es similar a la que se encuentra en los extractos etanólicos de corteza.
- 9.2. Las hojas provenientes del punto 2 de muestreo presentan mejores resultados, respecto al porcentaje de taninos, mejor actividad antioxidante y una actividad antibacteriana moderada contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.
- 9.3. No se encontró diferencia estadísticamente significativa para la cantidad de taninos, flavonoides y actividad antioxidante entre los extractos etanólicos de hoja y corteza de *R. mangle*, por lo que las hojas de mangle rojo son una alternativa para ayudar en el proceso de cicatrización.
- 9.4. La mayor cantidad de taninos se encuentra en el extracto de hoja punto 2 y de corteza punto 4 con un valor de 29.28% y 31.57%, respectivamente; mientras que la mayor cantidad de flavonoides se encontraron en el punto 1 de colecta para el extracto de hoja y corteza con 407.74 ppm y 412.07 ppm, respectivamente. Con ello se determina que la expresión de dichos metabolitos es independiente uno del otro.
- 9.5. La mejor actividad antioxidante y cantidad de fenoles totales la presentó el extracto de hoja del punto 2, con un valor de  $CI_{50}$  de 0.18 mg/mL y 227.76  $\mu$ g ácido gálico/g de extracto.
- 9.6. Los extractos que provocaron una mayor estimulación fueron los de la hoja; el del punto 2 es el más potente, con una concentración de 3.9  $\mu$ g/mL, el cual brindó mayor estimulación en las dos líneas de células de fibroblastos analizadas.
- 9.7. El gel presentó estabilidad respecto a los parámetros evaluados; los valores de pH, cantidad de flavonoides y el color del gel no variaron con el tiempo, a lo largo de dos meses de evaluación, por lo que puede resultar promisorio para su desarrollo.

## 10. RECOMENDACIONES

- 10.1. Realizar estudios histológicos para evaluar cómo los extractos etanólicos de mangle rojo pueden favorecer a la regeneración adecuada de la piel en humanos.
- 10.2. Comprobar que los geles elaborados en base a extractos etanólicos de hoja de mangle, presentan actividad cicatrizante, mediante métodos *In vitro* como *In vivo*.
- 10.3. Realizar un estudio de estabilidad, con un lote mayor de productos, por un periodo de tiempo más prolongado.
- 10.4. Evaluar la estabilidad, viscosidad, extensibilidad y calidad microbiana, con la finalidad de ir establecer los parámetros de calidad del producto fitofarmacéutico.
- 10.5. Realizar capacitaciones con las personas de la comunidad de la reserva de Monterrico, sobre el potencial de la hoja de mangle rojo, como coadyuvante en el proceso de cicatrización con la finalidad de ampliar el conocimiento popular de esta especie.

## 11. REFERENCIAS

- Adetutu, A. Morgan, W. Corcoran, O. (2011). Ethnopharmacological survey and in vitro evaluation of wound-healing plants used in South-western Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology*, 137,50-56.
- Alemán, Y., Sánchez, L., Pérez, T., Rodríguez, Y., Olivares, J., Rodríguez, J. (2011). Actividad larvicida de extractos de *Rhizophora mangle* L. contra estronquídeos gastrointestinales de ovinos. *Rev. Salud. Amin*, 33(2), 111-115.
- Álvarez, E., Jiménez, O., Posada, C., Rojano, B., Gil, J., García, C., Durando, R. (2008). Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del género *Vismia* (Guttiferae). Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. *Revista de la facultad de química farmacéutica*, 15(1), 165-171.
- Andrews, J.M. (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 4,5-16
- Arencibia, D. F. (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. Cuba. Centro de Química Farmacéutica.
- Berenguer, B., Sánchez, L.M., Quílez, A., López-Barreiro, M., de Haro, O., Gálvez, J., Martín, M.J. (2006). Protective and antioxidant of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers. *Journal of Ethnopharmacology*, 103 (2), 194-200.
- Caballeros, K. (2001). *Optimización de dos métodos para el tamizaje de la actividad antioxidante de extractos vegetales* (Tesis). Guatemala, Fac. CCQQ y Farmacia, USAC.
- Cáceres, A. López, B. Gónzales, S. Berger, I. Tada, I. Maki, J. (1998). Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *J. Ethnopharmacol*, 62,195-202.
- Castro, C., Villa, N., Ramírez, S., Mosso, C. (2014). Uso medicinal de plantas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño. Universidad de la Sierra Sur. Oaxaca, México. *Rev. Cubana de Plantas Medicinales*, 19(1), 101-120.
- Castro, L. (2009). *Actividad antibacteriana de plantas medicinales en cepas clínicas de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Tesis de maestría, Maestría en Uso y Producción de Plantas Medicinales (MUPLAM). Guatemala.

- CONABIO (Comisión Nacional para Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). (2009). *Manglares de México: Extensión y Distribución*. Gobierno Federal, México Distrito Federal.
- Córdova D., Menéndez C. Dardón R. (2009). *Determinación y Cuantificación de la actividad antioxidante de especies nativas y su posible fuente para el desarrollo de nutracéuticos*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Licenciatura de Química Farmacéutica. Guatemala
- Cruz, S. (2013). Proyecto *Evaluación del potencial agroindustrial de Mangle (Rhizophora mangle L.) como colorante, antioxidante y biocida distribuidos en la reserva Monterrico para su aprovechamiento sostenible y conservación*. PROYECTO FODECYT No. 24-2011, Guatemala.
- CYTED. (1993). *Manual de Técnica de Investigación*. Bogotá.
- Faure, Y. Rojas, I. (2015). El uso terapéutico del mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.) en la pododermatitis ovina en Guantánamo, Cuba. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 16(5), 1-3.
- Fleitas, G. (2001). *Obtención de formas farmacéuticas sólidas preliminares de extracto de Rhizophora mangle L.* M.Sc. Cu. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Facultad de Ingeniería.
- Gudiel L. (2009). *Evaluación Fitoquímica y actividad antioxidante de Polypodium triseriale SW. (calahuala)*. Tesis de licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Gutiérrez, Y., Miranda, M., Varona, N., Rodríguez, A. (2000) Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (Quercetina) en *Psidium guajaba* L. *Rev. Cubana Farma*, 34(1), 50-55
- Kandil F, Grace M, Seigler D, Cheeseman J. (2004). Polyphenolics in *Rhizophora mangle* L. leaves and their changes during leaf development and senescence. *Trees-Structure and Function*, 18(5), 518-528.
- Lara T (2012). *Cicatrización de heridas cutáneas*. *Asociación de Clínica Estética*. Asociación Médica Argentina.
- Leinmuller, E. (1991). Tannins in Ruminant Feedstuffs. *German Universities*, 33,9- 62.
- Machado E. (2005). Integron Content of Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains over 12 Years in a Single Hospital in Madrid, Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 1823-1829.

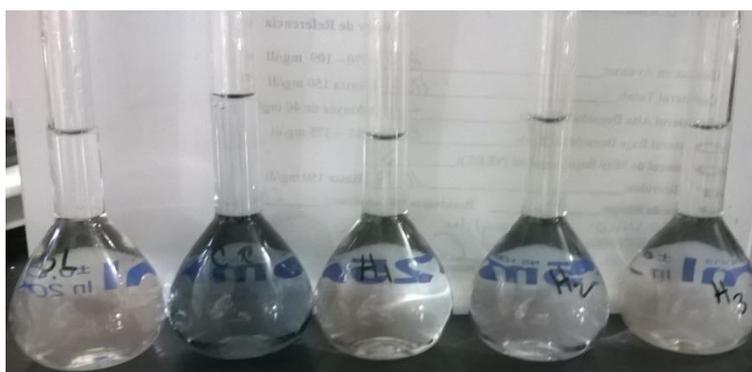
- Mancebo, B., Sánchez, L., Díaz, S. (2011). Efecto cicatrizante de la pasta de clorofila-caroteno de *Pinus caribaea* var. *Caribaea* sobre heridas abiertas asépticas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(1), 24-33.
- Marchorro, S. (2007). *Detección de la actividad inhibitoria de extractos etanólicos de seis plantas contra Sporothrix schenckii y Fonsecaea pedrosoi* Guatemala. Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Melchor, G. (1999) Efectos cicatrizante y antiséptico del extracto y de una forma farmacéutica obtenida a partir de *Rhizophora mangle* L. Tesis doctoral. La Habana: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria-Universidad Agraria de La Habana.
- Mitscher LA, Lev, R. Bathala, M. Wu, W, Beal, J. (1972). Antimicrobial agents from higher plants. 1. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia*, 35, 157-166.
- Montes de Oca N, Riverón Y, González R. (2001). Evaluation of antimicrobial activity of different extracts of *Rhizophora mangle* L using five methods. *Rev Salud Anim*, 23,1-11.
- Morton, J.E (1965): Can The Red Mangrove Provide Food, Feed, And Fertilizer. *Economic Botany*, 19,113-123.
- Om P. Sharma. (2008). Revisión de ensayo antioxidante de DPPH. *International Journal of PharmTech Rsearch*, 1 (4), 1317-1321.
- Pérez-Bueno, T., Rodríguez, Y., Morales, I., Soler, D., Martín, N. (2011). Comportamiento reológico y extensibilidad de una formulación semisólida a partir de extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. *Tecnol. Ciencia Ed*, (MIQ) 26(2), 75-79.
- Remington. (2000). *Farmacología práctica; farmacia industrial, soluciones, emulsiones y extractos*. 20ª Ed. Editorial Panamericana. México. Pp- 864-867.
- Rzedowski, G. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2a ed. Michoacán, Mx. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Saltar Y., Shibata A., Kato M., and Masukawa T. (2004). Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. *International Immunopharmacology*, 4 (14), 1873-1880.
- Sánchez LM, Melchor G, Alvarez S, Bulnes C. (1998). Caracterización química y toxicológica de una formulación cicatrizante de *Rhizophora mangle* L. *Rev Salud Anim*, 20(2), 69-72.
- Sánchez J. (2007). Propiedades antioxidantes del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y de su fracción polifenólica mayoritaria evaluadas en sistemas *in vitro* e *in vivo*. (Tesis doctoral). La Habana: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria- Universidad Agraria de La Habana.

- Sánchez, J., Faure, R., Martínez, G., Vega, E., Fernández, O. (2009). Propiedades antioxidantes de *Rhizophora mangle* (L.) y su relación con el proceso de curación de heridas de ratas. *Rev. Salud Anim*, 31(3), 170-179.
- Sánchez, J., Faure, R., Mitjavila, M. (2012). Efecto de *Rhizophora mangle* L. sobre la producción de anión superóxido en macrófagos murinos RAW 264.7. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(3), 223-232.
- Sánchez, J., Martínez, G., Faure, R. (2011). Efecto protector de los polifenoles de *Rhizophora mangle* L. sobre el daño oxidativo a proteínas y ADN. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(1), 1-12.
- Sánchez, L., Escobar, A., Valcárcer, L. (2005). Caracterización preliminar de la materia prima de *Rhizophora mangle* L. en la obtención de productos farmacéuticos procedentes de tres zonas geográficas de Cuba. *Rev. Salud Anim*, 27(2), 115-123.
- Sánchez, L., Chávez, I., Macebo, B., Lorenzo, R. (2008). Toxicidad aguda y subaguda oral del extracto acuoso liofilizado de *Rhizophora mangle* L. en ratas. *Rev. Cubana de Plantas Medicinales*, 19(1).
- Sánchez, M. (1998) *Caracterización química y actividad biológica de un extracto acuoso de la corteza de Rhizophora mangle L.* Tesis doctoral. La Habana: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria-Universidad Agraria de La Habana.
- Sigüenza de Micheo R. y Ruíz-Ordoñez J. (1999). Plan Maestro de la Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico. Centro de Estudios Conservacionistas, Consejo Nacional de Áreas Protegidas, Proyecto “Aprovechamiento sostenible de los recursos asociados a los manglares del Pacífico de Guatemala” (INAB-UICN-UE). Guatemala.
- Solís L.D. (2003). *Desarrollo de un método de análisis de ácido clorogénicos en café.* Tesis de Licenciatura, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Solís L.D. (2005). Desarrollo de un método de análisis de cuantificación ácido clorogénicos en café. *Agronomía Costarricense*, 29(2), 99-107.
- Stadelmann W.K., Digenis A.G. and Tobin G.R. (1998). Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *The American Journal of Surgery*, 176(2), 26S-38S. PMI
- Travieso, M., Betancourt, A., Escobar, A., Linares, A., Rodríguez, Y., Pérez, T. (2011). Validación del método de cuantificación de taninos totales en formulaciones semisólidas de *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(1), 82-93.
- Vasco Catalina. (2008) “El total de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de los frutos importantes de Ecuador”. *Food Chemistry*, 111(4), 816-823

- Vile GF, Turell R.M. (1995) UVA radiation induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in humanskin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. *Free radicBiol Med*, 18(4), 721-730.
- Vogel H, Gonzalez M, Faini F. (2005). Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean Haplopappus-spices known as bailahuén. *J Ethnopharmacol*, 97,97-100
- Wang, J. Ruan, J. Cai, Y. Luo, Q. Xu, H. Wu, Y. (2011). In vitro and in vivo evaluation of the wound healing properties of *Siegesbeckia pubescens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 1033-1038.
- Wilson, E. (1988) National Research Council. *Biodiversity*. Washington, DC: The National Academies. Harvard University.
- Woodley, D., O'Keefe, E, Prunerias, M. (1985). Cutaneous wound healing: a model for cell–matrix interaction. *Journal of American Academy of Dermatology*, 12,420–433.
- Yang, B. Zhao, M. Shi, J. (2008). Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from Logan fruit pericarp. *Food Chem*, 106,658-690.

## 13. Anexos

### 13.1 Fotos de la cuantificación de metabolitos secundarios

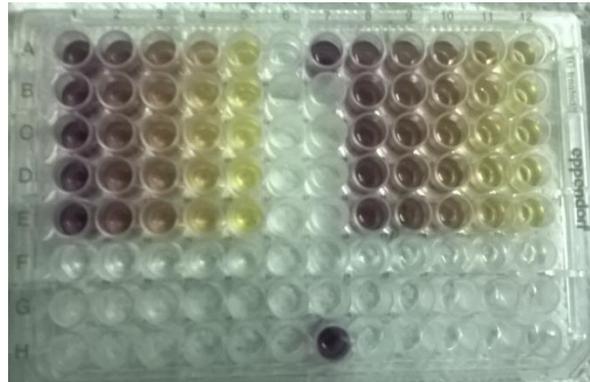


Cuantificación de taninos en extractos etanólicos de hoja y corteza de *Rhizophora mangle* L.

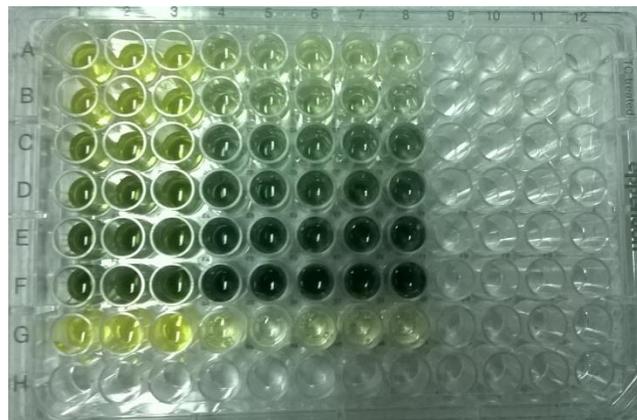


Cuantificación de flavonoides en extractos etanólicos de hoja y corteza de *Rhizophora mangle* L.

### 13.2 Fotos de la actividad antioxidante

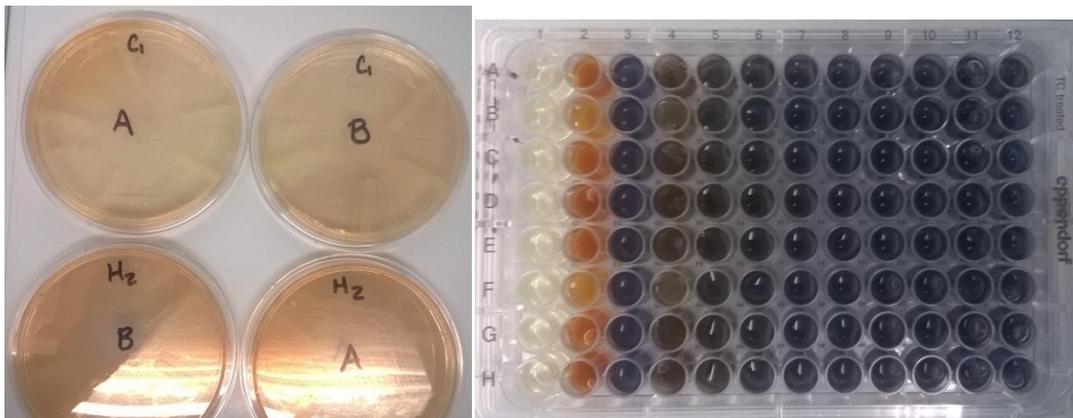


Cuantificación de la actividad antioxidante por DPPH técnica micrométrica.



Cuantificación de fenoles totales por técnica micrométrica

### 13.3 Fotos de la actividad antibacteriana



Evaluación de la actividad antibacteriana tamizaje en placa y microdilución

13.4 Fotos de elaboración de Gel en base a extracto etanólico de hoja y corteza de *Rhizophora mangle* L.

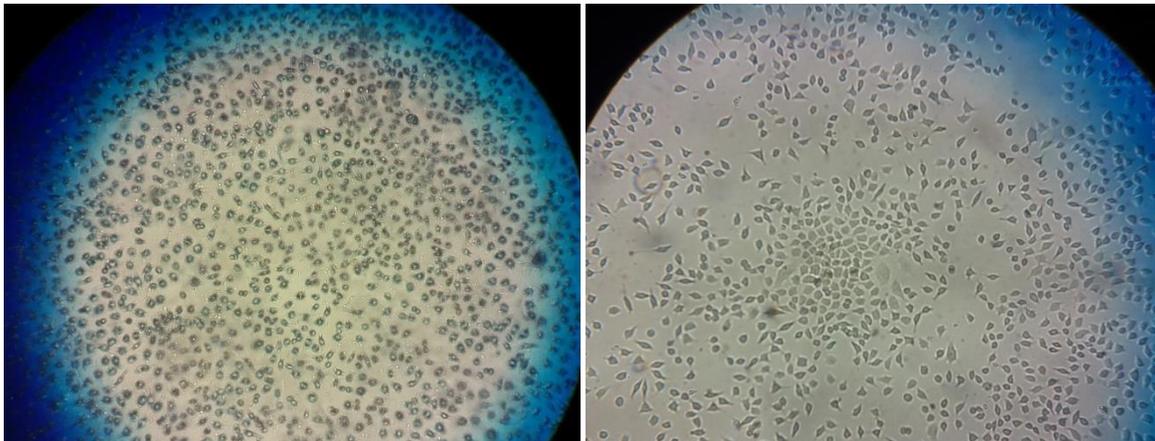


Procedimiento de elaboración de gel en base a extracto de *Rhizophora mangle* L.

13.5 Fotos de la evaluación de proliferación celular en el Instituto Clodomiro Picado (ICP),  
Universidad de Costa Rica



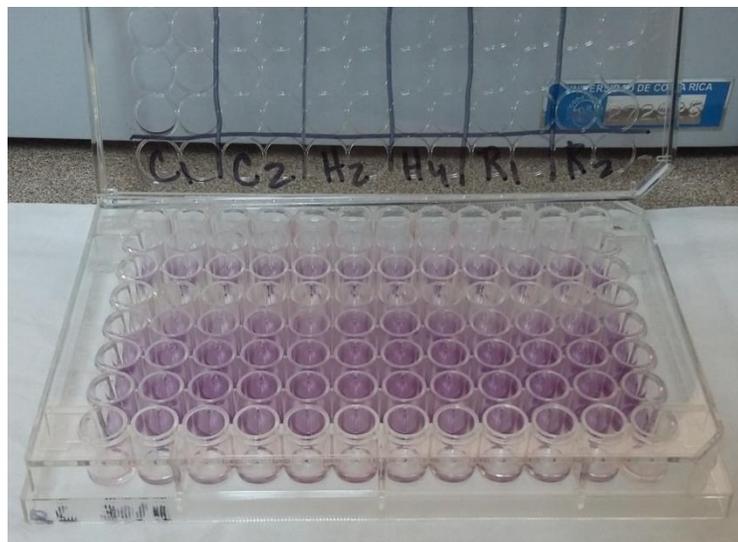
Equipo empleado



Células en el proceso de triptinizado



Montaje y visualización en el microscopio



Placa con reactivo revelador

---

María Nereida Marroquín Tintí

AUTOR

---

Dra. Sully Margot Cruz Velásquez

ASESORA

---

MSc. María Ernestina Ardón Quezada

DIRECTORA

---

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda

DECANO