



Formulación de un gel a base del extracto etanólico de *Verbesina persicifolia* y *Calendula officinalis* para su evaluación antimicrobiana y cicatrizante

Formulation of a gel based on the ethanolic extract of *Verbesina persicifolia* and *Calendula officinalis* for its antimicrobial and healing evaluation

Gabriel Arturo Soto-Ojeda¹, Paola del Carmen Cortés-Pomares^{1*}, Mauro Antonio Villanueva-Lendecky¹

¹Universidad Veracruzana, Facultad de Química Farmacéutica Biológica, Circuito Aguirre Beltrán, S/N, Zona Universitaria, Xalapa-Enríquez, Ver.¹.

*Autor de correspondencia: paolacortes27@hotmail.com

Recibido 11 de octubre 2020; recibido en forma revisada 16 de enero de 2021; aceptado 12 de marzo de 2021

RESUMEN

El pie diabético es un padecimiento que causa infección, ulceración y destrucción de los tejidos de las extremidades inferiores, se producen heridas que pueden volverse profundas y provocar amputación del miembro y en los casos más severos la muerte del paciente. Por lo cual, es importante buscar alternativas que coadyuven al tratamiento de heridas del pie diabético. Por otra parte, el empleo de plantas medicinales ofrece una posibilidad para el tratamiento de diversos padecimientos. El objetivo de este trabajo fue formular un gel a base del extracto etanólico de *Verbesina persicifolia* y *Calendula officinalis* para su evaluación antimicrobiana y cicatrizante. En una primera etapa se caracterizaron de manera preliminar parámetros fisicoquímicos y organolépticos de los geles a las concentraciones (C1, C2, C3 y C4) usando como medicamento control KitosCell- Q®. Para la actividad antimicrobiana se realizaron ensayos en *S. aureus* ATCC 6538, *S. spp.*, *S. saprophyticus* y *P. aeruginosa*. Finalmente, la actividad cicatrizante se realizó en ratas macho de la cepa

Wistar normo e hiperglicémicas mediante el modelo de escisión. Los resultados mostraron que los geles presentaron apariencia semisólida de color verde, olor herbal con textura untuosa, los valores de pH tuvieron un rango de 6.5- 7.4 y la viscosidad entre 4480-22160 cp con una buena capacidad de extensibilidad. No se presentó actividad antimicrobiana en las cepas probadas. La actividad cicatrizante fue mayor en el gel C4 mostrando un mayor porcentaje de contracción en las heridas en ratas normo e hiperglicémicas. En conclusión, se obtuvo un gel elaborado con extractos etanólicos de *C. officinalis* y *V. persicifolia* y fue caracterizado de acuerdo con parámetros indicativos de calidad farmacéutica para formulaciones de uso tópico, los geles no mostraron actividad antimicrobiana pero sí un efecto cicatrizante que fue mejor en el gel más concentrado.

Palabras Clave: Pie diabético, heridas crónicas, cicatrización, *Calendula officinalis*, *Verbesina persicifolia*, forma farmacéutica, gel.

ABSTRACT

Diabetic foot is a condition that causes infection, ulceration and destruction of the tissues of the lower limbs, resulting in wounds that can become deep and lead to amputation of the limb and, in the most severe cases, death of the patient. Therefore, it is important to look for alternatives to help in the treatment of diabetic foot wounds. On the other hand, the use of medicinal plants offers a possibility for the treatment of various ailments. The aim of this work was to formulate a gel based on the ethanolic extract of *Verbesina persicifolia* and *Calendula officinalis* for its antimicrobial and healing evaluation. In a first stage, physicochemical and organoleptic parameters of the gels at the concentrations (C1, C2, C3 and C4) were preliminarily characterised using KitosCell- Q® as a control drug. For antimicrobial activity, assays were performed on *S. aureus* ATCC 6538, *S. spp.*, *S. saprophyticus* and *P. aeruginosa*. Finally, the wound-healing activity was performed on normo- and hyperglycaemic male Wistar rats using the excision model. The results showed that the gels presented a green semi-solid appearance, herbal odor with an unctuous texture, pH values ranged from 6.5- 7.4 and viscosity between 4480-22160 cp with good extensibility. No antimicrobial activity was present in the tested strains. The

healing activity was higher in the C4 gel showing a higher percentage of wound contraction in normo and hyperglycaemic rats. In conclusion, a gel made from ethanolic extracts of *C. officinalis* and *V. persicifolia* was obtained and characterised according to parameters indicative of pharmaceutical quality for topical formulations, the gels did not show antimicrobial activity but did show a healing effect that was better in the more concentrated gel.

Keywords: Diabetic foot, chronic wounds, healing, *Calendula officinalis*, *Verbesina persicifolia*, pharmaceutical form, gel.

INTRODUCCIÓN

El pie diabético es definido una alteración neuropática causada por hiperglucemia, generando infección, ulceración y destrucción de tejidos profundos de las extremidades inferiores, asociado en ocasiones con enfermedades vasculares (Ortega, 2021). Esto ocurre porque la cicatrización en las heridas se ve influenciada por las condiciones de hiperglucemia. En este sentido, las heridas agudas suelen tener un periodo de cicatrización entre 4-6 semanas en comparación con las heridas crónicas, caracterizadas por un retraso en la cicatrización mayor a 6 semanas desde la generación de la herida y con un aumento en la fase inflamatoria (Singh *et al.*, 2017; Larouche *et al.*, 2018).

La disfunción de las células del sistema inmune causa infección, que conlleva al deterioro curativo, hospitalización y pérdida de la pierna del paciente (Falanga, 2005).

Dentro del tratamiento de las heridas crónicas se encuentra el uso de hidrogeles que generan un adecuado balance de humedad en las heridas promoviendo su cicatrización y, al mismo tiempo, funcionan como una barrera contra patógenos (Murray *et al.*, 2019; Suhail *et al.*, 2020). Dentro de la

medicina tradicional también se han buscado alternativas terapéuticas que coadyuven en el tratamiento de heridas, tal es el caso de las plantas medicinales, un ejemplo de ello es el uso de caléndula y huichín.

Calendula officinalis (caléndula) (**Figura 1**) es usada en piel y mucosas para el tratamiento de heridas o procesos de cicatrización a manera de infusiones, tinturas y pomadas (Centeno, 2004).

De ella, se han reportado estudios sobre su actividad antimicrobiana y antifúngica en los extractos metanólicos y etanólicos contra *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, y hongos patógenos incluyendo: *Candida albicans*.



Figura 1. *Calendula officinalis*. Tomada de Especies de la familia Asteraceae exóticas a la flora de México (p. 25), por JL. Villaseñor *et al.*, 2012. DF, México: SAGARPA.

Estudios realizados sobre caléndula muestran que posee actividad cicatrizante y que puede ser atribuida a la familia de metabolitos secundarios que posee

como: flavonoides, triterpenoides y polifenoles (Givol *et al.*, 2019).

Verbesina persicifolia, mejor conocida como huichín (**Figura 2**) es una planta que tradicionalmente se le han atribuido diversas propiedades medicinales, dentro de ellas se encuentra el uso como infusión para el tratamiento de heridas difíciles de cicatrizar (Dalla *et al.*, 2015).



Figura 2. *Verbesina persicifolia*. Tomada de Irekani, por GB. Hinton, 2010

Verbesina persicifolia contiene metabolitos secundarios como los sesquiterpenos de tipo eudesmanos que exhiben variedad de actividades biológicas incluyendo actividad antifúngica, antibacteriana y tumoricida (Mora *et al.*, 2013). Otro grupo de metabolitos son los germacrenos, generalmente el germacreno D, del cual ha sido comprobada su actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,

Staphylococcus aureus y *Enterococcus faecalis* (Mora *et al.*, 2013).

En la actualidad, se sigue haciendo uso de las plantas medicinales, gracias a la ciencia y tecnología se ha permitido el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos con principios activos de origen natural (Jiménez, 2013).

Por lo anterior, el presente trabajo se encaminó a la formulación de un gel con extractos etanólicos de *Calendula officinalis* y *Verbesina persicifolia* como principios activos, para el desarrollo de un nuevo producto tópico para coadyuvar en el tratamiento de heridas del pie diabético.

METODOLOGÍA

Obtención de los extractos etanólicos de V. persicifolia y C. officinalis

Verbesina persicifolia se colectó en la región de Arroyo del Potrero, municipio de Martínez de la Torre, Veracruz. Por su parte, *Calendula officinalis* se adquirió en el municipio de Coatepec, Veracruz.

El material vegetal se lavó con agua y se secó a temperatura ambiente, una vez seco se maceró con etanol durante 2 semanas, posteriormente se filtró y concentró en rotavapor a 65°C.

Formulación del gel de *V. persicifolia* y *C. officinalis*

Este experimento tuvo como objetivo formular el gel en 4 concentraciones distintas de los extractos de las plantas las cuales fueron C1 (*V. persicifolia* 7% y *C. officinalis* 5%), C2 (*V. persicifolia* 9% y *C. officinalis* 7%), C3 (*V. persicifolia* 12% y *C. officinalis* 10%) y C4 (*V. persicifolia* 16% y *C. officinalis* 14%).

Para ello, se mezcló uniformemente el extracto de *V. persicifolia* junto con propilenglicol y tween 80. *C. officinalis* se disolvió completamente en agua bidestilada. Ambas disoluciones de las plantas se sonicaron durante 5 minutos a 40°C, posteriormente fueron incorporados en el carbopol hidratado en agua bidestilada y benzoato de sodio al 0.2%; en seguida, se adicionaron gotas de trietanolamina para ajustar el pH entre un rango de 6.5- 7.0 (El-Kased *et al.*, 2017).

Evaluación de las características fisicoquímicas y organolépticas del producto terminado

Se evaluó el pH con un potenciómetro digital HANNA HI 9812-5; para ello, se disolvió 0.5 g de cada uno de los geles en 5 mL de agua bidestilada, las evaluaciones fueron realizadas por triplicado.

La viscosidad se determinó utilizando un viscosímetro rotacional de Brookfield RVT

empleando una aguja del número 7, la medición fue realizada por triplicado a 100 rpm durante 1 minuto.

La capacidad de extensibilidad se realizó de acuerdo con el método de Pérez en 2019, colocando 25 mg del gel entre dos portaobjetos y colocando distintos pesos (1, 2, 5 y 10 g).

Para las características organolépticas, se determinaron: color, olor, apariencia y textura.

Evaluación de la actividad antimicobiana del gel formulado con extractos de las plantas

Esta evaluación fue realizada de acuerdo con el método de difusión por pozo, para ello se emplearon las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus spp.*, *Pseudomona aeruginosa* y *S. saprophyticus*

Fueron evaluados las diferentes concentraciones de los geles de *V. persicifolia* y *C. officinalis* (C1, C2, C3 y C4), el gel VEH y como medicamento control Kitocell- Q®, se tomaron 100 µL de cada gel y se colocaron en un pozo.

Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 18 horas sin invertir para evitar que las sustancias se cayeran, se midieron los diámetros de los halos de inhibición.

Evaluación de la actividad cicatrizante en ratas normo e hiperglicémicas

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de 3 a 4 meses de edad, con un peso entre 250- 400 g al inicio del experimento. Los experimentos se realizaron de acuerdo con la Guía para Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (National Research Council, 2011) y la NOM-062-ZOO-1999. Al finalizar el estudio, los animales fueron eutanizados con una sobredosis de pentobarbital sódico.

Para la inducción de hiperglicemia, los animales de experimentación fueron administrados con aloxano monohidratado en dosis de 150 mg/kg de peso vía intraperitoneal (Sheriff *et al.*, 2019). Se consideraron hiperglucémicos los sujetos con valores de glucosa superiores a 200 mg/dL (Herrera *et al.*, 2015).

Para el modelo de escisión el dorso de los animales fue rasurado para delimitar el área de la herida. Se generaron 3 heridas, después de 24 h de haber rasurado a los animales, con remoción completa de la epidermis y la dermis de una profundidad de 2 mm aproximadamente (Zuluaga, 2013; García-Bores *et al.*, 2020).

En las heridas de cada sujeto experimental se aplicó el gel experimental de los extractos, el medicamento control y el gel VEH. Los tratamientos fueron aplicados uniformemente en cada herida cada 24

horas. Se midieron los diámetros de las heridas con ayuda de un vernier los días 0, 2, 4, 8, 12, 14 y 16 y fue calculado el porcentaje de contracción de la herida mediante la siguiente fórmula (Dev *et al.*, 2019):

$$\% C = \frac{MI - ME}{MI} \times 100$$

%C: Porcentaje de contracción

MI: Medida inicial de la herida

ME: Medida en el día específico

También fueron evaluadas de manera cualitativa las heridas a lo largo de los días del experimento.

Efecto cicatrizante en ratas normoglicémicas

Los animales experimentales normoglicémicos fueron divididos en 4 grupos cada uno con n=6, divididos en los siguientes grupos:

- Grupo 1 (n=6). Geles de referencia y Gel C1.
- Grupo 2 (n=6). Geles de referencia y Gel C2.
- Grupo 3 (n=6). Geles de referencia y Gel C3.
- Grupo 4 (n=6). Geles de referencia y Gel C4.

Efecto cicatrizante en ratas hiperglicémicas

Los animales experimentales hiperglicémicos fueron divididos en 2 grupos cada uno con n=6 en los siguientes grupos:

- Grupo 1 (n=6). Geles de referencia y Gel C3.
- Grupo 2 (n=6). Geles de referencia y Gel C4.

Los resultados fueron analizados mediante la prueba ANOVA de dos vías para los factores tratamientos y días de tratamientos en la variable de porcentaje de cicatrización. Los resultados se presentan como la media +/- error estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al realizar la evaluación preliminar de los parámetros fisicoquímicos y organolépticos se encontró que los valores de pH de los geles formulados tuvieron estuvieron entre 6.5- 7.4. El pH en formulaciones tópicas juega un rol muy importante para evitar irritaciones en la piel al ser aplicado sobre las heridas. Existen estudios de geles donde se reportan valores de pH entre el 4.0 -7.0 (El-Kased *et al.*, 2017; Baca-Delgado *et al.*, 2018). Es importante destacar que al elaborar productos tópicos se busca tener un rango de pH que no afecte la piel; por lo que, son preferidos valores cercanos al neutro, para evitar inducir algún daño tras la administración de un producto.

Por otra parte, en cuanto a la viscosidad y capacidad de extensibilidad, los resultados indicaron lo siguiente:

El parámetro de viscosidad (**Tabla 1**) incrementó al aumentar la concentración de extractos mostrando el siguiente orden: **C1 < C2 < C3 < C4 < VEH**

Tabla 1. Valores de viscosidad de los diferentes geles

	VEH	C1	C2	C3	C4
Viscosidad (cPs)	25760	4480	6160	7280	22160

Nota. Se muestran valores promedio de 5 determinaciones realizadas a cada formulación.

La extensibilidad proporciona un parámetro que sirve de indicativo para ver la facilidad que puede presentar un producto para aplicarse sobre una superficie como puede ser la piel (Kumar y Verma, 2010; El-Kased *et al.*, 2017).

Nuestros resultados mostraron que el gel KitosCell-Q® presentó una menor área de extensibilidad comparada con todos los geles experimentales y el VEH.

Los resultados revelaron que conforme aumentaba la concentración de los extractos en los geles el área de extensibilidad era menor. Todos los geles experimentales tuvieron un área de extensibilidad mayor con respecto al medicamento control y al vehículo, como se observa en la siguiente expresión:

C1 > C2 > C3 > C4 > VEH > KitosCell- Q®

La medición de estos parámetros es importante ya que muestra indicios sobre la facilidad en la aplicación de los geles sobre la herida. De acuerdo con las

características organolépticas, los geles estuvieron libres de partículas extrañas y mostraron una adecuada untuosidad en la piel, lo que facilitó su aplicación en las heridas de los sujetos experimentales; en consistencia, tuvieron un aroma herbal, no se observaron signos de descomposición y el color fue verde, característico al de los extractos.

Evaluación de la actividad antimicrobiana de los geles formulados.

Los geles no lograron inhibir el crecimiento de las cepas; por lo que, no presentaron un efecto antimicrobiano (**Figura 3**).

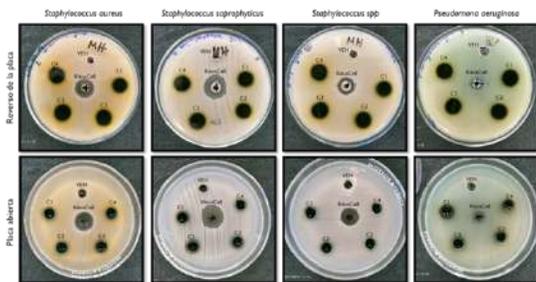


Figura 3. Placas de cultivo *in vitro* (método de difusión por pozo) con los diferentes tratamientos VEH, medicamento control en el centro y geles C1, C2, C3 y C4, mostrando la zona de inhibición y las de no inhibición (NI) contra *S. aureus*, *S. spp*, *S. saprophyticus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Evaluación del efecto cicatrizante de los geles formulados con *V. persicifolia* y *C. officinalis*

La contracción de la herida indica el aumento en la tasa de cicatrización; por lo tanto, cuanto más rápido sea el cierre de la herida, los tratamientos serán más eficaces. Con la finalidad de observar de manera

cualitativa el proceso de cicatrización, a todos los sujetos experimentales se les tomaron fotos y se comparó el proceso de contracción de la herida, los días 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16.

Evaluación cualitativa de la actividad cicatrizante del Gel C1.

En la **Figura 4** se muestran imágenes del proceso de cicatrización de forma cualitativa por el Gel C1 de *V. persicifolia* (7%) y *C. officinalis* (5%), así como los geles de referencia. Como puede apreciarse en el día cero se encuentran las heridas en fase inflamatoria, posteriormente en los días 2 y 4 la formación del tejido de granulación y en el día 6 la formación completa de las costras; al desprenderse en el día 8 comenzó la contracción de las heridas, mostrando una contracción completa por parte del Gel C1 desde el día 12 en comparación con los geles de referencia cuyas heridas tuvieron una contracción completa en el día 14. Cabe destacar que la última fase del proceso de cicatrización es la regeneración del tejido, con un cambio de coloración de la cicatriz de una tonalidad roja a otra más grisácea, mostrando este proceso por parte del gel C1 en el día 14 y por los geles de referencia hasta el día 16.

Un aspecto importante fue que la costra generada por el Gel C1 en el día 6 fue más gruesa y de difícil desprendimiento en comparación con las costras generadas por los geles de referencia, las cuales fueron más delgadas.

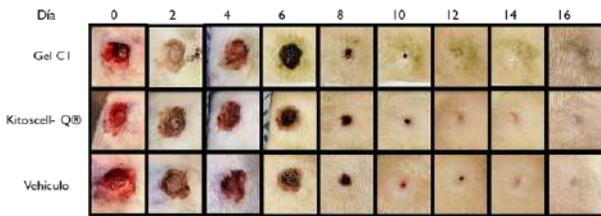


Figura 4. Modelo de herida por escisión en ratas normoglicémicas para probar el efecto cicatrizante del gel de *V. persicifolia* y *C. officinalis* (C1).

Evaluación cualitativa del progreso de contracción

del Gel C2. Así mismo, en la **Figura 5**, se muestra la evolución de la contracción de las heridas generadas a los sujetos experimentales normoglicémicos tratados con el Gel C2 de *V. persicifolia* (9%) y *C. officinalis* (7%).

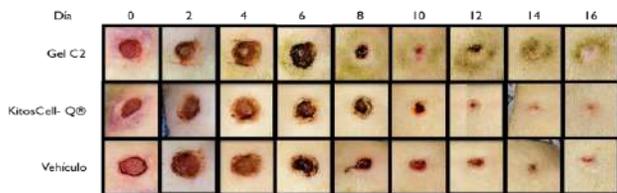


Figura 5. Modelo de herida por escisión en ratas normoglicémicas para probar el efecto cicatrizante del gel de *V. persicifolia* y *C. officinalis* (C2).

Como se aprecia, de manera cualitativa, el Gel C2 generó el cierre de la herida desde el día 14, en comparación con los geles de referencia que no

lograron una completa contracción en los días que duró el experimento.

Evaluación cualitativa del progreso de contracción

del Gel C3. De manera similar, en la **Figura 6** se

presenta lo correspondiente al Gel C3 de *V. persicifolia* (12%) y *C. officinalis* (10%), éste mostró un comportamiento de cicatrización similar al medicamento control, promoviendo en un mismo tiempo el cierre de la herida, en el día 16 se observó para todos los casos la herida ya regenerada.

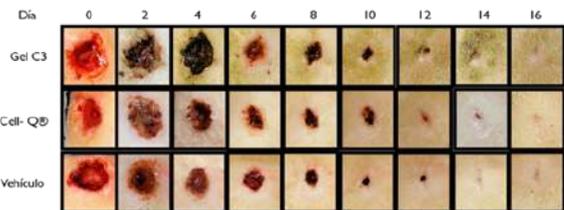


Figura 6. Modelo de herida por escisión en ratas normoglicémicas para probar el efecto cicatrizante del gel de *V. persicifolia* y *C. officinalis* (C3).

Evaluación cualitativa del progreso de contracción

del Gel C4. Finalmente, en cuanto al proceso de

contracción de las heridas tratadas con el Gel C4 de *V. persicifolia* (16%) y *C. officinalis* (14%), se muestran

las fotografías en la **Figura 7**. Se puede observar que,

hasta el día 6, la costra producida por el Gel C4 fue

gruesa en comparación con las costras generadas por

el medicamento control y el VEH. Como puede verse,

el Gel C4 y el KitosCell-Q® promovieron la

contracción total de la herida en el día 14; mientras

que el vehículo el día 16 aún mostraba una pequeña herida.

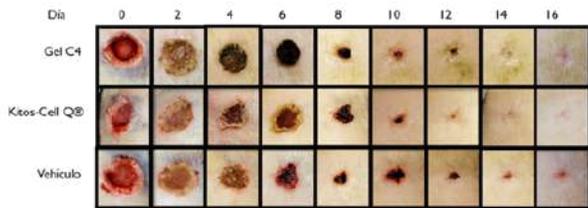
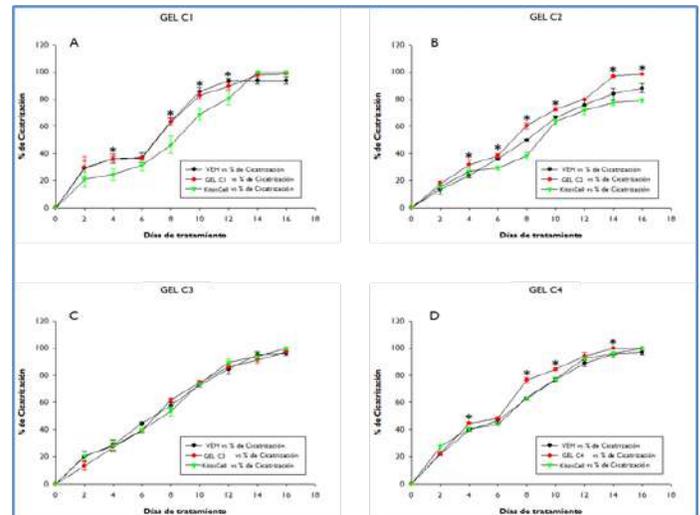


Figura 7. Modelo de herida por escisión en ratas normoglicémicas para probar el efecto cicatrizante del gel de *V. persicifolia* y *C. officinalis* (C4).

Análisis estadístico del proceso de cicatrización de los tratamientos aplicados a ratas normoglicémicas

Al evaluar la variable de porcentaje de cicatrización, los resultados mostraron que, en el caso del Gel C1, se observó que el % de cicatrización incrementó de manera similar al VEH [$F_{(2,15)} = 1.856$; $p < 0.030$]. La prueba *post-hoc* indicó que a partir del día 4 y hasta el último día de la prueba, los Geles C1 y VEH aumentaron el porcentaje de cicatrización en comparación con el grupo de KitosCell- Q® que tuvo los valores más bajos de esta variable, sin embargo

en el día 14 este logró tener un 100% de cicatrización (* $p < 0.001$; **gráfica 1A**).

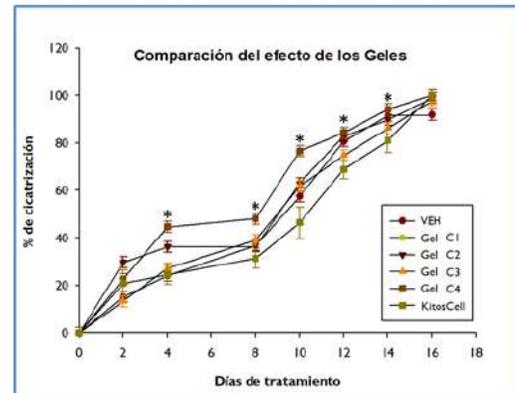


Gráfica 1. Muestra la interacción de los factores tratamientos y días de tratamientos para la variable de porcentaje de cicatrización. A) Muestra los resultados del gel C1 [$F_{(2,15)} = 1.856$; $p < 0.030$]; B) Muestra los resultados del gel C2 [$F_{(2,15)} = 3.856$; $p < 0.001$]; C) Muestra los resultados del gel C3 [$F_{(2,15)} = 1.198$; $p < 0.278$]; D) Muestra los resultados del gel C4 [$F_{(2,15)} = 4.458$; $p < 0.001$].

En consistencia el Gel C2, mostró valores más altos de la variable de porcentaje de cicatrización [$F_{(2,15)} = 3.856$; $p < 0.001$] con respecto al VEH a partir del día 4 y al medicamento control a partir del día 8 de la prueba, manteniendo dicho incremento hasta el último día de experimentación (* $p < 0.001$; **gráfica 1B**).

Para el Gel C3 no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos respecto al los días en que fue realizada la prueba [$F_{(2,15)}=1.198$; $p<0.278$, N/S; **gráfica 1C**]. Finalmente, en el caso del Gel C4 existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos [$F_{(2,15)}= 4.458$; $p<0.001$], la prueba *post-hoc* mostró que a partir del día 3 el Gel C4 incrementó esta variable en comparación con el KitosCell- Q® y el VEH, cuyos valores fueron similares durante toda la prueba (* $p<0.001$; **gráfica 1D**).

En consistencia, se realizó el análisis del efecto de las diferentes concentraciones del gel de *V. persicifolia* y *C. officinalis*. El ANOVA de dos vías indicó que se encontraron diferencias estadísticamente significativas [$F_{(5,30)} =3.198$; $p<0.001$]. La *post-hoc* mostró que el Gel C4 incrementó esta variable respecto a las demás concentraciones ensayadas y a los geles de referencia empleados en esta prueba (* $p<0.001$; **gráfica 2**).



Gráfica 2. Muestra la gráfica de la comparación entre los diferentes geles para la interacción de factores tratamientos y días de tratamiento para la variable de porcentaje de cicatrización. Como puede observarse C4 tuvo el mayor % de cicatrización con respecto a las otras concentraciones [$F_{(5,30)} =3.198$; $p<0.001$].

Evaluación del efecto cicatrizante del gel de *V. persicifolia* y *C. officinalis* en sujetos experimentales hiperglicémicos

Para este experimento se utilizaron las concentraciones más altas del gel, las cuales fueron C3 (*V. persicifolia* con 12% y *C. officinalis* con 10%) y C4 (*V. persicifolia* con 16% y *C. officinalis* con 14%).

Evaluación cualitativa del proceso de cicatrización

En la **Figura 8** se muestra la evolución de la contracción de forma cualitativa de las heridas generadas a los sujetos experimentales del grupo 1 hiperglicémico con tratamiento de Gel C3, así como los geles de referencia.

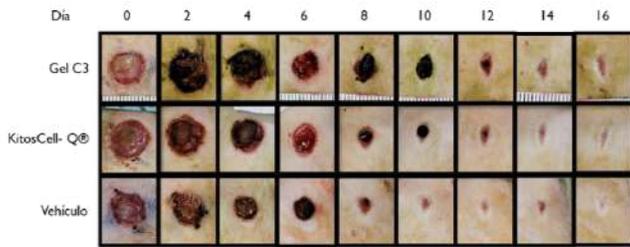


Figura 8. Modelo de herida por escisión en ratas hiperglicémicas para probar el efecto cicatrizante del gel de *V. persicifolia* y *C. officinalis* (C3).

Se observa en el día 2 y 4 la formación de las costras, que al desprenderse en el día 6 mostraron heridas expuestas y de nuevo en fase inflamatoria. Para el caso del Gel C3, este formó nuevamente costras gruesas en los días 8 y 10, al desprenderse en el día 12 comenzó la contracción de la herida, se puede observar que en el día 16 aún presentaba pigmentación roja lo que fue indicativo de que el tejido no logró una completa regeneración.

De igual forma, para los sujetos experimentales hiperglicémicos tratados con el gel de *V. persicifolia* y *C. officinalis* en concentración 4, en la **Figura 9** se puede observar que de manera cualitativa, el Gel C4 presentó un comportamiento similar a los controles.

Durante la aplicación de los tratamientos de Gel C3 y C4 se observó que incrementaron el crecimiento de pelo de las ratas de manera más rápida respecto al VEH y el medicamento control.

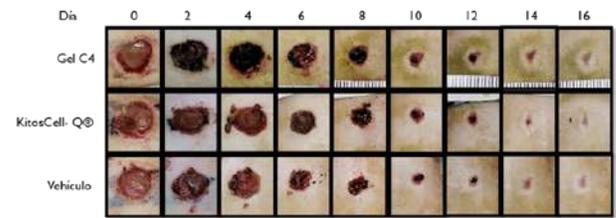
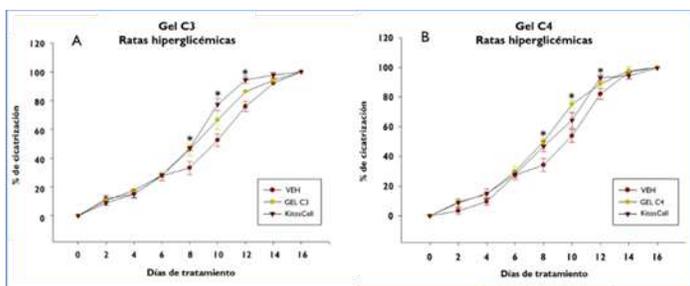


Figura 9. Modelo de herida por escisión en ratas hiperglicémicas para probar el efecto cicatrizante del gel de *V. persicifolia* y *C. officinalis* (C4).

Análisis estadístico del proceso de cicatrización de los tratamientos aplicados a ratas hiperglicémicas

Al evaluar el porcentaje de cicatrización, se encontró que el Gel C3, mostró valores más altos del porcentaje de cicatrización los días 8, 10 y 12 [$F_{(2,15)} = 5.203$; $p < 0.001$] con respecto al VEH ($*p < 0.001$; **gráfica 3A**). Se observó que a partir del día 14 y 16 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y se alcanzó el 100% de contracción de las heridas el día 16.

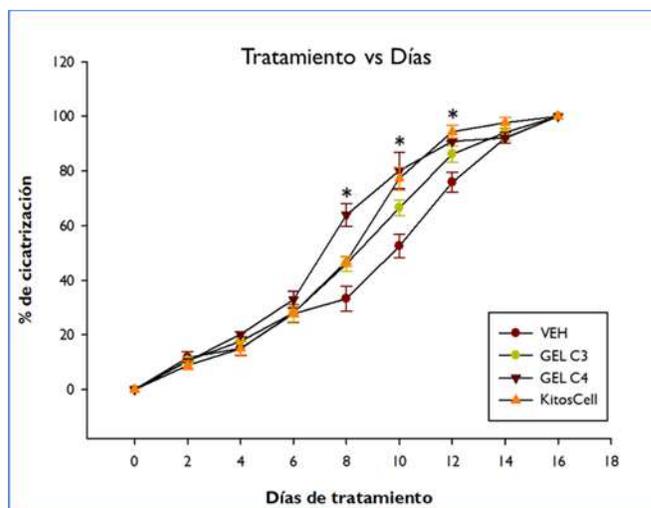
Para el Gel C4, se observó que mostro los valores más altos de porcentaje de cicatrización [$F_{(2,15)} = 3.043$; $p < 0.001$] en los días 8 y 10 respecto al VEH. Al comparar con el KitosCell-Q® y VEH se observó un mayor porcentaje de cicatrización en el día 10 ($*p < 0.001$; **gráfica 3B**).



Gráfica 3. Muestra la interacción de los factores tratamientos y días de tratamiento para la variable de porcentaje de en ratas hiperglicémicas. A) Muestra los resultados del gel C3 [$F_{(2,15)}= 5.203$; $p<0.001$], B) Muestra los resultados del gel C4 [$F_{(2,15)}= 3.043$; $p<0.001$].

Del mismo modo, al comparar todos los tratamientos, el ANOVA de dos vías indicó que se encontraron diferencias significativas [$F_{(3, 20)}= 5.888$; $p<0.001$]. La *post-hoc* mostró que el Gel C4 incrementó esta variable respecto a las demás concentraciones ensayadas, así como los controles positivo y negativo.

Al observar la evolución de la contracción de herida inducida por el Gel C4, se determinó que presentó un aumento significativo en el porcentaje de cicatrización a partir del día 8 de experimentación frente a todos los demás tratamientos que se mantuvo hasta el día 10. El Gel C4 mostró un comportamiento similar al medicamento control partir del día 10 de experimentación y hasta el final de la prueba (* $p<0.001$; gráfica 4).



Gráfica 4. Muestra la interacción de los factores tratamientos y días de tratamiento para la variable de porcentaje de cicatrización. Se observa la comparación del efecto de los gels en cuanto al porcentaje de cicatrización para ratas hiperglicémicas [$F_{(3, 20)}= 5.888$; $p<0.001$].

CONCLUSIONES

Se lograron formular 4 concentraciones de un gel a base de extractos etanólicos de las plantas *C. officinalis* y *V. persicifolia*, las cuales presentaron un pH aceptable para la aplicación tópica (6.5- 7.4), así como una buena capacidad de extensibilidad lo que se traduce en una buena aplicación en el sitio afectado. La concentración que presentó mejor capacidad para aumentar el porcentaje de contracción de las heridas fue la C4, en condiciones de normoglicemia e hiperglicemia; sin embargo, no presentaron actividad antibacteriana *in vitro* contra cepas de interés clínico. Lo anterior ofrece la posibilidad de seguir trabajando con estas plantas medicinales las cuales reportan en la bibliografía actividad antibacteriana y cicatrizante; así

encontrar una concentración y forma farmacéutica adecuada que permita coadyuvar en el tratamiento de heridas, especialmente las del pie diabético.

BIBLIOGRAFÍA

- Baca Delgao, W. U., Carmona, S. V., & Chévez Arbizú, L. Y. (2018). *Diseño y formulación de gel cicatrizante conteniendo extracto fluido de aloe vera, plantago major y calendula officinalis, marzo-diciembre 2017* (Doctoral dissertation).
- Centeno, L. M. M. (2004). Plantas medicinales españolas *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Medicina naturista*, (5), 37-41.
- Dalla Via, L., Mejia, M., García-Argáez, A. N., Braga, A., Toninello, A., & Martínez-Vázquez, M. (2015). Anti-inflammatory and antiproliferative evaluation of 4 β -cinnamoyloxy,1 β ,3 α -dihydroxyeudesm-7,8-ene from *Verbesina persicifolia* and derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(17), 5816–5828.
- Dev, S. K., Choudhury, P. K., Srivastava, R., & Sharma, M. (2019). Antimicrobial, anti-inflammatory and wound healing activity of polyherbal formulation. *Biomedecine & Pharmacotherapie [Biomedicine & Pharmacotherapy]*, 111, 555–567.
- El-Kased, R. F., Amer, R. I., Attia, D., & Elmazar, M. M. (2017). Honey-based hydrogel: In vitro and comparative In vivo evaluation for burn wound healing. *Scientific Reports*, 7(1), 9692.
- Falanga, V. (2005). Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*, 366(9498), 1736–1743.
- García-Bores, A. M., Álvarez-Santos, N., López-Villafranco, M. E., Jácquez-Ríos, M. P., Aguilar-Rodríguez, S., Grego-Valencia, D., ... Benítez-Flores, J. D. C. (2020). *Verbesina crocata*: A pharmacognostic study for the treatment of wound healing. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(11), 3113–3124.
- Givol, O., Kornhaber, R., Visentin, D., Cleary, M., Haik, J., & Harats, M. (2019). A systematic review of *Calendula officinalis* extract for wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 27(5), 548–561.
- Herrera Calderón, O., Chinchay Salazar, R., Palomino Ormeño, E., Arango Valencia, E., & Arroyo, J. (2015). Efecto hipoglucemiante del extracto etanólico de *Geranium ruizii* Hieron.

- (pasuchaca) en la hiperglucemia inducida por aloxano en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina (Lima, Peru : 1990)*, 76(2), 117.
- Hinton, G. B. (2010). *Verbesina persicifolia* DC. Recuperado de <http://unibio.unam.mx/irekani/handle/123456789/20494?mode=full&proyecto=Irekani>
- Jiménez, C. (2013). El papel de los productos naturales en el mercado farmacéutico actual. *An. Quím*, 109(2).
- Kumar, L., & Verma, R. (2010). In vitro evaluation of topical gel prepared using natural polymer. *International journal of drug delivery*, 2(1), 58–63.
- Larouche, J., Sheoran, S., Maruyama, K. y Martino, MM (2018). Regulación inmunológica de la cicatrización de heridas cutáneas: mecanismos y dianas terapéuticas novedosas. *Advances in Wound Care*, 7 (7), 209-231.
- Mora, F. D., Alpan, L., McCracken, V. J., & Nieto, M. (2013). Chemical and biological aspects of the genus *Verbesina*. *The natural products journal*, 3(2), 140–150.
- Murray, R. Z., West, Z. E., Cowin, A. J., & Farrugia, B. L. (2019). Development and use of biomaterials as wound healing therapies. *Burns & Trauma*, 7, 2
- National Research Council. (2011). *Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*. Ediciones UC.
- NOM-062-ZOO-1999, N. O. M., & LA PRODUCCION, E. T. P. (1999). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Ortega, D. B. (2021). Pie Diabético. Apuntes de patología cardiovascular. Volumen II. *Angiología y cirugía vascular*, 21, 59.
- Pérez Zamora, C. M. (2019). Desarrollo, caracterización y evaluación de formas farmacéuticas de uso en piel y mucosas que vehiculicen extractos vegetales con actividad antimicrobiana.
- Singh, S., Young, A. y McNaught, C.-E. (2017). La fisiología de la cicatrización de heridas. *Cirugía*, 35 (9), 473–477.
- Sheriff, O. L., Olayemi, O., Taofeeq, A. O., Riskat, K. E., Ojochebo, D. E., & Ibukunoluwa, A. O. (2019). A New model for Alloxan-induced diabetes mellitus in rats. *Journal of*

Bangladesh Society of Physiologist, 14(2), 56-62.

Suhail, M., Wu, P.-C., & Minhas, M. U. (2020). Using carbomer-based hydrogels for control the release rate of diclofenac sodium: Preparation and in vitro evaluation. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 13(11), 399.

Villaseñor, J. L., Ortiz, E., Hinojosa-Espinosa, O., & Segura-Hernández, G. (2012). Especies de la familia Asteraceae exóticas a la flora de México. *DF, México: SAGARPA, SENASICA, CONACOFI, IBUNAM y ASOMECEMA*.

Zuluaga Villegas, M. J. Evaluación de la actividad cicatrizante de *Critoniella acuminata* en pequeños roedores. *Departamento de Farmacia*.