

Toxicidad aguda y efecto cicatrizante de una crema a base del extracto hidroalcohólico del fruto de *Corryocactus brevistylus* en roedores

Acute toxicity and healing effect of a cream based on the hydroalcoholic extract of *Corryocactus brevistylus*

Nesquen Tasayco Yataco ^{1,2,a,b}, Fidel Acaro Chuquicaña ^{1,2,b}, Quevin Barrientos Medina ^{1,c}, Charito Cabrera Marín ^{1,c}, Milagros Beltrán Nicolás ^{1,c}, Noemí Beltrán Nicolás ^{1,c}

¹ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Interamericana para el Desarrollo. Lima, Perú

² Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Privada Norbert Wiener. Lima, Perú

^a Doctor en Salud

^b Maestro en Farmacología Experimental

^c Estudiantes de Farmacia y Bioquímica

Correspondencia:

Dr. Nesquen José Tasayco Yataco

nesquenty4@hotmail.com

Teléfono: 944900095

Av. Bolivia 626 Breña – Lima

Centro de Investigación de la Universidad Interamericana para el Desarrollo

El contenido del manuscrito no ha sido publicado previamente

Ningún conflicto de interés

Fuente de financiamiento: Financiado por la Universidad Interamericana para el Desarrollo

Resumen

Introducción: *Corryocactus brevistylus*, planta usado como hepatoprotector y antioxidante en la medicina tradicional. **Objetivo:** Determinar la toxicidad aguda y efecto cicatrizante de una crema a base del extracto hidroalcohólico del fruto de *Corryocactus brevistylus* (EHFCB) en roedores. **Diseño:** Experimental, Pre-clínico, “*In vivo*”. **Lugar:** Laboratorio de Investigación de la Universidad Interamericana para el Desarrollo (UNID), Lima, Perú. **Material biológico:** Frutos de *Corryocactus brevistylus*, ratones de 2 meses, de 24 ± 2 g de peso corporal, **Intervenciones:** La planta se recolectó en la provincia de Huamanga departamento de Ayacucho; 40 ratones divididos al azar en 5 grupos recibieron el EHFCB: 500, 1000, 2000, 5000 y 7500 mg/Kg. Además 40 ratones divididos al azar recibió: 1) Control negativo sin tratamiento; 2) Control positivo crema Cicatricure®; 3) Crema al 1 % del EHFCB; 4) Crema al 2 % del EHFCB; 5) Crema al 3 % del EHFCB. **Principales medidas de resultado:** Dosis letal media y el efecto cicatrizante a nivel dérmico. **Resultados:** Por análisis cualitativo se identificó, alcaloides, flavonoides, glicósidos y taninos; la dosis letal media estimada fue de 5000 mg/kg de peso, el EHFCB en crema al 3% presentó mayor efecto cicatrizante que los otros grupos tratados. **Conclusiones:** Se demostró que el EHFCB es una sustancia no tóxica y la crema al 3% del extracto evidenció tener efecto cicatrizante a nivel dérmico en ratones y pueden desempeñar un papel importante en el proceso epitelización de heridas.

Palabras clave: *Corryocactus brevistylus*, Sanky, Cicatrizante, Dosis letal media, metabolitos secundarios

ABSTRACT

Introduction: *Corryocactus brevistylus*, a plant used as a hepatoprotective and antioxidant in traditional medicine. **Objective:** To determine the acute toxicity and healing effect of a cream based on the hydroalcoholic extract of the fruit of *Corryocactus brevistylus* (EHFCB) in rodents. **Design:** Experimental, Pre-clinical, "In vivo". **Place:** Research Laboratory of the Inter-American University for Development (UNID), Lima, Peru. **Biological material:** Fruits of *Corryocactus brevistylus*, 2-month-old mice, 24 ± 2 g body weight, **Interventions:** The plant was collected in the province of Huamanga department of Ayacucho; 40 mice randomly divided into 5 groups received the EHFCB: 500, 1000, 2000, 5000 and 7500 mg / Kg. In addition 40 randomly divided mice received: 1) Negative control without treatment; 2) Cicatricure® cream positive control; 3) 1% EHFCB cream; 4) 2% EHFCB cream; 5) 3% EHFCB cream. **Main outcome measures:** Mean lethal dose and the healing effect at the dermal level. **Results:** By qualitative analysis, alkaloids, flavonoids, glycosides and tannins were identified, the estimated average lethal dose was 5000 mg / kg, the 3% cream EHFCB had a greater healing effect than the other treated groups. **Conclusions:** It was shown that EHFCB is a non-toxic substance and the 3% cream of the extract was shown to have a dermal healing effect in mice and can play an important role in the epithelialization of wounds.

Keywords: *Corryocactus brevistylus*, Sanky, Healing, Mean lethal dose, secondary metabolites

INTRODUCCIÓN

Las heridas, especialmente de naturaleza crónica, causan grave problema de salud, afectan negativamente el estado psicológico, social y económico de las personas⁽¹⁾. Cuando no se tratan adecuadamente, suelen aumentar de tamaño y perder función en las áreas afectadas⁽²⁾. Los mecanismos involucrados en la cicatrización se asocian con trastornos en la producción de colágeno, en consecuencia, retrasan la reepitelización en heridas y comprometen la migración y proliferación de queratinocitos y fibroblastos⁽³⁾. El tratamiento de heridas es complejo, puede no ser siempre eficiente y por lo general presentan altos costos y efectos secundarios⁽⁴⁾. Las preparaciones farmacéuticas tópicas ofrecen ventajas sobre otras vías, porque evita el metabolismo de primer paso, riesgos e inconvenientes de la terapia parenteral y problemas relacionados con la absorción, como el pH, las enzimas y tiempo de vaciado gástrico⁽⁵⁾. Los extractos de plantas han mostrado eficacia en la aceleración de cicatrización de heridas^(6,7), los componentes bioactivos con propiedad antimicrobiana, antiinflamatorio y antioxidante son claves en el tratamiento de heridas⁽⁸⁾.

Corryocactus brevistylus (Sanky), es nativa del sur de Perú, se ha evidenciado que el jugo del fruto tiene propiedades antioxidantes, laxantes y tenso-reguladores, gastroprotector y hepatoprotector⁽⁹⁾. La presente investigación tuvo como objetivo determinar la toxicidad aguda y efecto cicatrizante de una crema a base del EHFCB en roedores.

MÉTODOS

El fruto maduro de *Corryocactus brevistylus* (Sanky) fue recolectada en la provincia de Huamanga departamento de Ayacucho. La identificación taxonómica se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Luego de la recolección, limpieza y desinfección por prensado se obtuvo la pulpa, se pesó 220 g y se maceró en etanol 70% por 10 días en frasco color ámbar con agitación diaria cada 12 horas, luego se filtró con papel de filtro N° 40, el líquido filtrado se colocó a la estufa a 40 °C hasta obtención de un extracto seco, se obtuvo el EHFCB, se pesó y colocó en frasco ámbar, se almacenó en refrigeración hasta su uso. Este proceso se desarrolló en el Laboratorio de Investigación de la UNID.

Se usó 80 ratones albinos de 24 ± 2 g de peso, procedentes del Bioterio del Instituto Nacional de Salud del Ministerio de Salud. Se mantuvo en el bioterio de la UNID a temperatura de 22°C, humedad (60-75%), ciclo de luz/oscuridad (12/12 horas), con dieta balanceada y agua a libertad.

Se realizó marcha fitoquímica según Bhandari *et al.*, (2017), se pesó 5 mg de EHFCB y se aplicó reactivos de identificación, reacción de color y/o precipitación⁽¹⁰⁾.

Se evaluó la toxicidad aguda, según método modificado de Saleem *et al.*, (2017), los animales se distribuyeron aleatoriamente en 5 grupos (n=8), se administró el EHFCB en las siguientes dosis: I): 500 mg/Kg; II): 1000 mg/Kg; III): 2000 mg/Kg; IV): 5000 mg/Kg y V): 7500 mg/Kg. Luego se observó a cada animal con atención especial en las 4 primeras horas, hasta un total de 14 días. Las observaciones

de signos tóxicos incluyeron cambios en la piel y pelaje, ojos y membranas mucosas, convulsiones, salivación, diarrea, letargia, sueño, coma y muerte. Se registró el número de animales muertos a las 24 horas en cada grupo y se calculó la dosis letal media (DL₅₀)⁽¹¹⁾.

Para el ensayo del efecto cicatrizante, se aplicó el método de Maan *et al.*, (2017). En la superficie dorsal de cada animal se depiló con crema comercial depilatoria, después de 24 h, se anestesió con ketamina-xilazina (intraperitoneal, 90:10 mg/kg) antes de la creación de la herida. Previa desinfección con etanol 70%, la piel se cortó con cuchilla quirúrgica estéril hasta la formación de herida. La hemostasia se logró con algodón empapado en solución salina normal. Los animales se dividieron al azar en cinco grupos (n=8) y recibieron el siguiente tratamiento: I) base de crema (control negativo); II) crema dérmica Cicatricure® (control positivo); III) crema al 1% del EHFCB; IV) crema al 2% del EHFCB y V) crema al 3% EHFCB. Los tratamientos fueron por vía tópica (30 mg)

cada 12 horas (mañana y noche) durante 7 días⁽¹²⁾, luego, cada animal se sacrificó por sobredosis de pentobarbital sódico. Se realizó la prueba de tensión de apertura de herida con un dinamómetro, los datos se registraron en forma individual para cada animal. El manejo de animales se realizó de acuerdo con las líneas de guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio y se cumplió con las directrices establecidas en la Declaración de Basilea sobre el Uso de Animales en la Investigación Biomédica⁽¹³⁾. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples de Tukey, se trabajó con nivel de significancia del 95% (p<0.05).

RESULTADOS

En la marcha fitoquímica del EHFCB se identificó alcaloides, taninos, glicósidos y flavonoides (Tabla 1). En la Tabla 2 se aprecia que la dosis letal media (DL₅₀) estimada fue de 5000 mg/kg de peso.

Tabla 1. Metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico del fruto de *Corryocactus brevistylus*

Reactivo	Constituyentes químicos	Resultado
Ninhidrina	Aminoácidos	--
Mayer	Alcaloides	+
Dragendorff	Alcaloides	+
Popoff	Alcaloides	+
Wagner	Alcaloides	+
Lieberman – Burchard	Esteroides y/o triterpenoides	--
Gelatina	Taninos	+
Tricloruro férrico	Compuestos fenólicos	--
Molisch	Glicósidos	+
Shinoda	Flavonoides	+

(+) = Presencia (-) = Ausencia

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad del extracto hidroalcohólico del fruto de *Corryocactus brevistylus*

Animales	Dosis del extracto hidroalcohólico del fruto de <i>Corryocactus brevistylus</i>				
	500	1000	2000	5000	7500
Vivos	100% (8)	75% (6)	63% (5)	50% (4)	25% (2)
Muertos	0% (0)	25% (2)	37% (3)	50% (4)	75% (6)

Valores entre paréntesis indica el número de animales

A partir de la dosis de 2000 mg/kg se observó inmovilización de la pata izquierda delantera, los mismos que se recuperaron durante las primeras 3 horas. Con las dosis de 1000 mg/kg en adelante se observó cambios en el color del pelaje, salivación y sueño durante las primeras 4 horas, se observó convulsiones con la dosis de 5000 mg/kg y 7500 mg/kg. A los animales fenecidos se les practicó una laparotomía por la línea media abdominal, se observó estómago e intestinos inflamados, hemorragia interna y presencia de coágulos.

En la Tabla 3 se observa que el grupo tratado con crema del EHFCB al 3% presentó efecto cicatrizante mayor a los otros grupos de tratamiento ($p < 0.05$).

En la Tabla 4 se aprecia el análisis de Tukey, el grupo de EHFCB crema 2% comparado con el control positivo no tienen diferencias significativas en su efecto cicatrizante ($p > 0.05$).

Tabla 3. Porcentaje del efecto cicatrizante según grupos de tratamiento

Grupos de Tratamiento	Promedio de tensión de apertura de herida (g)	Efecto cicatrizante (%)
Control crema base	63,5 ± 11,5	0,0
Control Cicatricure®	108,4 ± 1,2	70,7
EHFCB crema 1%	68,0 ± 5,8	7,1
EHFCB crema 2%	100,5 ± 5,5	58,3
EHFCB crema 3%	124,4 ± 9,7	95,9

EHFCB=Extracto hidroalcohólico del fruto de *Corryocactus brevistylus*

Tabla 4. Análisis de Tukey según grupos de tratamientos

Grupos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Control crema base	8	63.50		
EHFCB crema 1%	8	68.00		
EHFCB crema 2%	8		100.50	
Control Cicatricure®	8		108.38	
EHFCB crema 3%	8			124.38
Sig.		.762	.258	1.000

EHFCB=Extracto hidroalcohólico del fruto de *Corryocactus brevistylus*

Sig.=Significancia

El efecto cicatrizante del EHFCB crema 1% fue similar al grupo control crema base ($p > 0.05$). El grupo de EHFCB crema 3%

presenta mayor efecto cicatrizante que los otros grupos de tratamiento ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

A lo largo de los años, las plantas medicinales y los compuestos naturales han desempeñado un papel integral en el tratamiento de heridas⁽¹⁴⁾.

En la Tabla 1, se identificó metabolitos secundarios que tendrían la propiedad cicatrizante. Rajkumar *et al.*, (2018), identificó taninos, flavonoides y alcaloides en el extracto de hojas de *Morinda tinctoria* y relacionaron con la curación de heridas en ratas⁽¹⁵⁾.

Mohammadi *et al.*, (2019), en extracto del exocarpio de granada halló taninos y flavonoides; refieren que los taninos contraen la herida, aumentan la epitelización, fibroblastos y formación de conductos capilares, los flavonoides disminuyen la inflamación sobre la lesión dérmica ⁽¹⁶⁾. Begashaw *et al.*, (2017), en extracto metanólico de hojas de *Hibiscus micranthus* demostró la curación de heridas en un estudio experimental *in vivo* ⁽¹⁷⁾. Su *et al.*, (2017), estudió el extracto *Entada phaseoloides* con un contenido total de taninos (76,18%) el cual mostró cicatrización de heridas en rata, favoreció significativamente el cierre de heridas, muy probable por efecto proliferativo de las células fibroblásticas NIH3T3 capaces de sintetizar y secretar colágenos en la piel ⁽¹⁸⁾. Yin *et al.*, (2018), aplicó quercetina (flavonoide) vía tópica en ratones, observó significativamente el cierre de la herida, redujo la infiltración y producción de citocinas proinflamatorias, disminuyó la acumulación de neutrófilos y macrófagos en sitio de la herida ⁽¹⁹⁾. Tuhin *et al.*, (2017), en extracto etanólico de *Euphorbia hirta* identificó alcaloides y flavonoides, con importante efecto en la curación de heridas por aumento de la viabilidad y fuerza de las fibrillas de colágeno, aumento de la circulación y disminución del daño celular ⁽²⁰⁾. Mahibalan *et al.*, (2016), demostró cicatrización de herida dérmica del ungüento enriquecido con alcaloides ácidos y básicos (1% y 2%) de las partes aéreas de *Evolvulus alsinoides* versus alcaloide puro (betaína 0,5% y 1%), observó aumento en la contracción de la herida, vascularización y epitelización ⁽²¹⁾.

En la toxicidad aguda oral (Tabla 2), observamos que la dosis letal media (DL₅₀) superó los 2000 mg/kg, los animales fenecidos previamente convulsionaron, luego se observó coágulos en su anatomía interna, en dosis menor a 2000 mg/kg no se observó alteración en su comportamiento, peso ni signos neurológicos. Estudio similar de Parmar *et al.*, (2018), sobre toxicidad oral demostró que los animales no experimentaron signo de toxicidad neurológica o de comportamiento hasta con dosis de 2000 mg/kg, además, no hubo diferencias significativas en el peso corporal y peso de los órganos de los animales tratados y el control ⁽²²⁾. Zeng *et al.*, (2016), sobre toxicidad oral aguda del extracto de *Abrus cantoniensis*, los ratones no murieron ni mostraron reacciones adversas, como piloerección, dificultad respiratoria, convulsiones, parálisis muscular, balanceo, coma o incontinencia, la DL₅₀ observada fue 5000 mg/kg, e indicaron el uso seguro en

ratones y aplicación potencial para problemas clínicos ⁽²³⁾.

En la Tabla 3 y Tabla 4, la crema del EHFCB al 3% presentó mayor efecto cicatrizante que los otros grupos de tratamiento ($p < 0.05$), y la crema del EHFCB al 2% fue similar al grupo control Cicatricure® ($p > 0.05$). Souza *et al.*, (2019), evaluó la crema al 10% del extracto hidroalcohólico *Ximenia americana* en heridas por escisión en ratas, evidenció aumento significativo de fibroblastos y vasos sanguíneos, disposición de las fibras de colágeno del grupo tratado en relación con los grupos estándar y de control ⁽²⁴⁾. Zhang *et al.*, (2019), usó ungüento al 10% y 20% de *Callicarpa nudiflora* en roedores con heridas, una vez al día durante 21 días, el análisis macroscópico evidenció curación de la herida y redujo áreas de la herida en los días 15, 18 y 21, especialmente al 20% comparado con el control y sulfadiazina de plata, se atribuyó el efecto a la regulación positiva del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) ⁽²⁵⁾. Bahramsoltani *et al.*, (2017), usó crema base de eucerina al 10% y 20% del extracto de *Cucurbita moschata*, la crema al 20% vía tópica mostró mejor resultado *in vivo*, observó aumento significativo en cierre de la herida, el cual mostró mayor epitelización que representa la proliferación y migración celular ⁽²⁶⁾. Kittana *et al.*, (2017), preparó un ungüento a base del extracto de *Ephedra alata*, observó cicatrización de heridas en roedores por mejor deposición de colágeno, mejor proceso de reparación celular, mayor producción de factores pro-fibróticos como el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) y el VEGF en el sitio de aplicación ⁽²⁷⁾. Dos Santos Gramma *et al.*, (2016), observó cierre de la herida significativa con el ungüento al 5% de *Struthanthus vulgaris*, en el análisis histológico y bioquímico de biopsias de piel mostró aumento de granulación en el tejido, disminución de la respuesta inflamatoria mediante modulación de la liberación de citoquinas antiinflamatorias como la IL-1 α , TNF- α e IL-10, óxido nítrico y factores de crecimiento como el TGF- β , además, aumentó la organización de las fibras de colágeno en las heridas ⁽²⁸⁾. Pandurangan *et al.*, (2015), investigaron durante 14 días en ratas la actividad en la curación de heridas al 2,5%, 7,5% y 10% de hojas de *Chromolaena odorata*, formulados en ungüentos, hallaron efectos favorables al inducir la contracción de la herida y el tiempo de cierre de la misma ⁽²⁹⁾.

En conclusión, se demostró que el EHFCB es una sustancia no tóxica y la crema al 3% del EHFCB evidenció tener efecto cicatrizante a

nivel dérmico en ratones y pueden desempeñar un papel importante en el proceso epitelización de heridas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carvalho A, Diniz R, Suarez M, Figueiredo C, Zagnignan A, Grisotto M, *et al.* Use of Some Asteraceae Plants for the Treatment of Wounds: From Ethnopharmacological Studies to Scientific Evidences. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 784. doi: 10.3389/fphar.2018.00784
2. Derakhshanfar A, Moayedi J, Derakhshanfar G, Fard A. The role of Iranian medicinal plants in experimental surgical skin wound healing: An integrative review. *Iran J Basic Med Sci.* 2019 Jun; 22(6): 590–600. doi: 10.22038/ijbms.2019.32963.7873.
3. Sanaei N, Mohammadi R, Raisi A, Zarei L. Extract of *Berula angustifolia* (L.) Mertens Enhances Wound Healing in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Wounds.* 2018 Aug;30 (8):242-48.
4. Yuan YF, Das SK, Li MQ. Vitamin D Ameliorates Impaired Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice by Suppressing Endoplasmic Reticulum Stress. *J Diabetes Res.* 2018; 2018:1757925. doi: 10.1155/2018/1757925
5. Ayla S, Okur ME, Günel MY, Özdemir EM, Çiçek Polat D, Yoltaş A, *et al.* Wound healing effects of methanol extract of *Laurocerasus officinalis* roem. *Biotech Histochem.* 2019 Apr; 94(3):180-188. doi: 10.1080/10520295.2018.1539242.
6. Bolla S, Al-Subaie A, Al-Jindan R, Balakrishna J, Ravi P, Veeraraghavan V, *et al.* *In vitro* wound healing potency of methanolic leaf extract of *Aristolochia saccata* is possibly mediated by its stimulatory effect on collagen-1 expression. *Heliyon.* 2019; 5(5):e01648. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01648
7. Barreto R, Albuquerque-Júnior R, Araújo A, Almeida J, Santos M, Barreto A, *et al.* A Systematic Review of the Wound-Healing Effects of Monoterpenes and Iridoid Derivatives. *Molecules.* 2014 Jan; 19(1): 846–862. doi: 10.3390/molecules19010846
8. Marume A, Matope G, Katsande S, Khoza S, Mutingwende I, Mduluzi T, *et al.* Wound Healing Properties of Selected Plants Used in Ethnoveterinary Medicine. *Front Pharmacol.* 2017; 8: 544. doi: 10.3389/fphar.2017.00544.
9. Lipe C. Efecto hepatoprotector del zumo del fruto de *Corryocactus brevistylus* (sanky) en ratones con daño hepático inducido por etanol [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2016.
10. Bhandari J, Muhammad B, Thapa P, Shrestha B. Study of phytochemical, antimicrobial, anti-oxidant, and anti-cancer properties of *Allium wallichii*. *BMC Complement Altern Med.* 2017; 17: 102. doi: 10.1186/s12906-017-1622-6.
11. Saleem U, Amin S, Ahmad B, Azeem H, Anwar F, Mary S. Acute oral toxicity evaluation of aqueous ethanolic extract of *Saccharum munja* Roxb. roots in albino mice as per OECD 425 TG. *Toxicol Rep.* 2017; 4: 580–585. doi: 10.1016/j.toxrep.2017.10.005.}
12. Maan P, Yadav K, Yadav N. Wound Healing Activity of *Azadirachta indica* A. Juss Stem Bark in Mice. *Pharmacogn Mag.* 2017 Jul; 13 (Suppl 2): S316–S320. doi: 10.4103/0973-1296.210163.
13. McGrath J, McLachlan E, Zeller R. Transparency in Research involving Animals: The Basel Declaration and new principles for reporting research in BJP manuscripts. *Br J Pharmacol.* 2015; 172 (10): 2427–2432. doi: 10.1111/bph.12956.
14. Komakech R, Matsabisa M, Kang Y. The Wound Healing Potential of *Aspilia africana* (Pers.) C. D. Adams (Asteraceae). *Evid Based Complement Alternat Med.* 2019; 2019: 7957860. doi: 10.1155 / 2019/7957860.
15. Rajkumar R, Gnanavel G, Nadar M, Sankaranarayanan R. wound healing activity of *Morinda tinctoria* Roxb aqueous leaf extract. *3 Biotech.* 2018 Aug;8(8):343. doi: 10.1007/s13205-018-1361-5.
16. Mohammadi M, Mirghazanfari S. Investigation of Iranian pomegranate cultivars for wound healing components. *Eur J Transl Myol.* 2019; 29(1): 7995. doi: 10.4081/ejtm.2019.7995.
17. Begashaw B, Mishra B, Tsegaw A, Shewamene Z. Methanol leaves extract *Hibiscus micranthus* Linn exhibited antibacterial and wound healing activities. *BMC Complement Altern Med.* 2017; 17: 337. doi: 10.1186/s12906-017-1841-x.
18. Su X, Liu X, Wang S, Li B, Pan T, Liu D, *et al.* Wound-healing promoting effect of total tannins from *Entada phaseoloides* (L.) Merr. in rats. *Burns.* 2017 Jun; 43(4):830-838. doi: 10.1016/j.burns.2016.10.010.

19. Yin G, Wang Z, Wang Z, Wang X. Topical application of quercetin improves wound healing in pressure ulcer lesions. *Exp Dermatol.* 2018 Jul; 27(7):779-786. doi: 10.1111/exd.13679.
20. Tuhin R, Begum M, Rahman S, Karim R, Begum T, Ahmed S, et al. Wound healing effect of *Euphorbia hirta* linn. (Euphorbiaceae) in alloxan induced diabetic rats. *BMC Complement Altern Med.* 2017; 17: 423. doi: 10.1186/s12906-017-1930-x.
21. Mahibalan S, Stephen M, Nethran RT, Khan R, Begum S. Dermal wound healing potency of single alkaloid (betaine) versus standardized crude alkaloid enriched-ointment of *Evolvulus alsinoides*. *Pharm Biol.* 2016 Dec;54(12):2851-2856. doi: 10.1080/13880209.2016.1185636
22. Parmar K, Shende P, Katare N, Dhobi M, Prasad S. Wound healing potential of *Solanum xanthocarpum* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharm Pharmacol.* 2018 Oct; 70(10):1389-1400. doi: 10.1111/jphp.12975.
23. Zeng Q, Xie H, Song H, Nie F, Wang J, Chen D, et al. In Vivo Wound Healing Activity of *Abrus cantoniensis* Extract. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016; 2016: 6568528. doi: 10.1155/2016/6568528
24. Souza J, Júnior N, Estevão L, Ferraz A, Simões R, Vieira M, et al. Ointment of *Ximenes americana* promotes acceleration of wound healing in rats. *Acta Cir Bras.* 2019; 34(3). doi: 10.1590/s0102-865020190030000007.
25. Zhang X, Li X, Zhou X, Wang Y, Lai W, Liu Y, et al. The Wound Healing Effect of *Callicarpa nudiflora* in Scalded Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2019; 2019: 1860680. doi: 10.1155/2019/1860680.
26. Bahramsoltani R, Farzaei M, Abdolghaffari A, Rahimi R, Samadi N, Heidari M, et al. Evaluation of phytochemicals, antioxidant and burn wound healing activities of *Cucurbita moschata* Duchesne fruit peel. *Iran J Basic Med Sci.* 2017 Jul; 20(7): 798–805. doi: 10.22038/IJBMS.2017.9015.
27. Kittana N, Abu-Rass H, Sabra R, Manasra L, Hanany H, Jaradat N, et al. Topical aqueous extract of *Ephedra alata* can improve wound healing in an animal model. *Chin J Traumatol.* 2017; 20(2):108-113. doi: 10.1016/j.cjtee.2016.10.004.
28. Dos Santos Gramma LS, Marques FM, Vittorazzi C, de Andrade TA, Frade MA, de Andrade TU, et al. *Struthanthus vulgaris* ointment prevents an over expression of inflammatory response and accelerates the cutaneous wound healing. *J Ethnopharmacol.* 2016;190:319-27. doi: 10.1016/j.jep.2016.06.050.
29. Pandurangan A, Rana K, Singh A. Evaluation wound healing activity of leaves of *Chromolaena odorata* Linn. *Int J Pharm Sci Lett.* 2015;5:555–7.