

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
Ciencias de la Vida con orientación
en Biomedicina y Bionanotecnología**

**Desarrollo y evaluación *in vitro* de andamios a base de
colágeno y compuestos fitoquímicos para cicatrización**

Tesis

Para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Angélica Alejandra Cárdenas Carreón

Ensenada, Baja California, México

2019

Tesis defendida por

Angélica Alejandra Cárdenas Carreón

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Johanna Bernáldez Sarabia
Codirectora de tesis

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña
Codirectora de tesis

Dr. Manuel Herrera Saldívar

Dra. María del Carmen Maya Sánchez

Dra. Ceres Anabel Molina Cárdenas

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida.

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Angélica Alejandra Cárdenas Carreón © 2019

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Angélica Alejandra Cárdenas Carreón** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en ciencias de la vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

Desarrollo y evaluación *in vitro* de andamios a base de colágeno y compuestos fitoquímicos para cicatrización

Resumen aprobado por:

Dra. Johanna Bernáldez Sarabia
Codirectora de tesis

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña
Codirectora de tesis

Un andamio es una estructura tridimensional con poros interconectados que, además de facilitar el crecimiento y proliferación de células, protege una herida contra bacterias y otros organismos que pudiesen colonizar la lesión. Además de porosos, biocompatibles y biodegradables, los andamios para cicatrización de heridas necesitan tener la suficiente estabilidad estructural para permitir su manipulación y colocación en la herida. Los biomateriales a base de colágeno son intrínsecamente biocompatibles y pueden formar estructuras altamente porosas. Sin embargo, tienen una integridad estructural pobre y se degradan rápidamente. Una alternativa es incorporar otros polímeros que modifiquen la estabilidad estructural de los materiales compuestos. En el presente trabajo de tesis, se prepararon andamios a base de colágeno modificados con 2-hidroxietilo de metacrilato (HEMA) y metil éter metacrilato de polietilenglicol (PEGMA) como plastificantes para modificar las propiedades estructurales de los andamios a base de colágeno. Si bien, la utilización de un andamio biocompatible y poroso puede facilitar la regeneración de un tejido lesionado, la incorporación de extractos naturales con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas puede producir un material avanzado para promover la cicatrización de un tejido. Por lo que en este trabajo, también se evaluaron los efectos de diferentes concentraciones (0.5, 1 y 2% m/v) de extractos acuosos de *Moringa oleifera*, *Hammamelis virginiana*, *Aloe vera* y *Calendula officinalis* sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, bacterias asociadas a infecciones de heridas. El extracto de *M. oleifera* fue el único que tuvo actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *K. pneumoniae*, bajo las condiciones aquí utilizadas. Por lo tanto, se desarrollaron andamios a base de colágeno-HEMA-PEGMA-*M. oleifera* 2% (m/v). En este trabajo, se optimizaron las condiciones de fabricación de los andamios al punto en que se obtuvieron materiales con estabilidad estructural modificada, sin afectar las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, ni antimicrobianas contra *S. aureus* y *K. pneumoniae*, del extracto de *M. oleifera* contenido en los andamios. Por lo tanto, los materiales fabricados son una excelente opción para continuar su evaluación para su aplicación en la cicatrización de heridas.

Palabras clave: Andamio, colágeno, *Moringa oleifera*, 2-hidroxietilo de metacrilato, metil éter metacrilato de polietilenglicol, cicatrización

Abstract of the thesis presented by **Angélica Alejandra Cárdenas Carreón** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation Biomedical Innovation.

Development and *in vitro* evaluation of collagen scaffolds with phytochemical compounds for wound healing

Abstract approved by:

Dra. Johanna Bernáldez Sarabia
Thesis co-director

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña
Thesis co-director

A scaffold is a three-dimensional structure with interconnected pores that, in addition to facilitating the growth and proliferation of cells, protects a wound against bacteria and other organisms that could colonize the lesion. In addition to porous, biocompatible and biodegradable, scaffolds for wound healing need to have structural stability to allow manipulation and placement in the wound. Collagen-based biomaterials are intrinsically biocompatible and can form highly porous structures. However, they have poor structural integrity and high degradation rate. An alternative is to incorporate other polymers that modify the structural stability of composite material. In this thesis project, collagen-based scaffolds modified with 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and polyethylene glycol methyl methacrylate (PEGMA) were added as plasticizers to modify the structural properties of collagen-based scaffolds. Although the use of a biocompatible and porous scaffold can facilitate the regeneration of an injured tissue, the incorporation of natural extracts with antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial properties can produce an advanced material to promote wound healing. In this project, we also evaluated the effects of different concentrations (0.5, 1 and 2% w/v) of aqueous extracts of *Moringa oleifera*, *Hammamelis virginiana*, *Aloe vera* and *Calendula officinalis* on the growth of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria associated with wound infections. The extract of *M. oleifera* was the only one that had antimicrobial activity against *S. aureus* and *K. pneumoniae*, under the conditions used here. Therefore, collagen-based scaffolds-HEMA-PEGMA-*M. oleifera* 2% (m / v) were developed. In summary, the scaffold manufacturing conditions were optimized to the point where materials with modified structural stability were obtained, without affecting the antioxidant, anti-inflammatory, or antimicrobial properties against *S. aureus* and *K. pneumoniae*, from the extract of *M. oleifera* contained in scaffolds. Therefore, these materials are an excellent option to continue evaluating for application in wound healing.

Key words: Scaffold, collagen, *Moringa oleifera*, 2-hydroxyethyl methacrylate, polyethylene glycol methyl methacrylate , wound healing

Dedicatoria

A mi madre, Angélica por quererme, cuidarme y amarme tal y como soy. Gracias por estar siempre conmigo y ser mi mejor amiga, cómplice y nunca dejarme caer.

A mi padre, Sergio quien con su apoyo y ejemplo me ha guiado. Por brindarme las herramientas y educación para lograr llegar hasta este momento.

A mi Nana Lupe, por quererme, criarme y estar desde el inicio de mi vida. Siempre te llevo conmigo, porque eres parte de mí.

Por ser mi fuerza y los pilares de mi vida, les dedico este trabajo con todo mi corazón.

Alex

*“Los años no dicen nada...son un mero número,
Lo que sí dice mucho de nosotros son las obras que creamos,
Los recuerdos que edificamos, las relaciones que forjamos”
I.A.*

Agradecimientos

Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)**, por permitirme realizar mis estudios de maestría y desarrollar el presente proyecto de investigación.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca brindada, y al programa complementario de financiamiento de **Cátedras-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Cátedras-CONACYT) (No. 266145; 2015)**.

Agradezco sinceramente a mis directoras de tesis, **Dra. Johanna Bernáldez Sarabia** y **Dra. Ana Bertha Castro Ceseña** por darme la oportunidad de desarrollar mi trabajo de maestría. Sus conocimientos, motivación, orientación y persistencia han sido fundamentales para mi formación, y el enriquecimiento de este trabajo. Agradezco de corazón su comprensión en los momentos más difíciles.

Dra. Ana Bertha, gracias por aceptarme en su grupo de investigación. Por su paciencia, tiempo y disposición para realizar los experimentos. Gracias por ser un ejemplo de entrega y perseverancia, y ayudarme a culminar esta etapa que significa mucho para mí.

Dra. Johanna, gracias por aceptar ser mi directora. En verdad agradezco su ayuda y capacitación brindada en el área de cultivo celular. Gracias por sus consejos, por ayudarme a no flaquear en el momento más difícil y motivarme a seguir en este camino.

Agradezco a mi comité de tesis, **Dra. Ceres Anabel Molina Cardenas**, **Dra. María del Carmen Maya Sánchez**, **Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra** y **Dr. Manuel Herrera Saldívar** por sus aportaciones, disposición e interés en este proyecto. Muchas gracias.

Al ingeniero **Luis Gradilla** de Ciencias de la Tierra, CICESE por su ayuda con las imágenes de SEM.

Al **personal académico y administrativo del Posgrado en Ciencias de la Vida**, **Linda Lomelí**, **Gaby Altamirano**, **Adriana Mejía**, **Anabel Domínguez** por el apoyo brindado a lo largo de mi estadía en el posgrado. En especial al **Dr. Alexei F. Licea Navarro**, por la guía brindada al inicio de este camino.

Al personal de biblioteca, en especial a **Elizabeth Avilés**, por su disposición y ayuda en la revisión del formato de esta tesis.

A **mi madre Angélica Carreón** y **mi padre Sergio Cárdenas**, por el amor, motivación y el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida. Agradezco a mi familia, en especial a mi **Nana Guadalupe Sandoval**, por estar siempre al pendiente de mi e interesarse como me iba en la escuela.

A mis amigas, **Sigrid**, **Karla**, **Yeraldly**, **Liz**, **Mayra** y **Erica**, por estar conmigo, apoyarme y hacerme reír con sus múltiples mensajes...las quiero mucho chiquitas. A **Alejandra**, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas a lo largo de este tiempo, apoyarme, motivarme y desvelarse conmigo cuando estaba en el laboratorio, gracias infinitas...te quiero mucho P. A **Isaí**, por estar presente en los momentos de crisis y darme ánimos con sus abrazos y buenas vibras, y ayudarme cuando no entendía algo...Miwwhy!

A mis amigos del laboratorio y posgrado, **Lesly**, **Daniela**, **Erick**, **Joaquín**, **Edith**, **Zoila**, **Sharlin**... por brindarme su amistad, apoyarme y estar conmigo cuando más lo necesitaba, muchas gracias. A mis bebés y amores divinos gatunos por hacerme compañía en las noches de desvelos y al escribir esta tesis. ♥

Agradezco a Dios y a la vida por permitirme lograr esta meta.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1. Proceso de cicatrización.....	3
1.1.2. Cicatrización en heridas crónicas.....	4
1.1.3. Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	6
1.1.4. Compuestos fitoquímicos.....	8
1.1.5. Andamios.....	10
1.1.6 Andamios de colágeno.....	12
1.1.7 Compuestos fitoquímicos en andamios.....	13
1.2 Justificación	14
1.3 Hipótesis.....	15
1.4 Objetivos.....	15
1.4.1 Objetivo general	15
1.4.2 Objetivos específico.....	15
Capítulo 2. Metodología.....	17
2.1 Materiales.....	17
2.2 Preparación de extractos acuosos.....	17
2.3 Caracterización de extractos.....	18

2.3.1	Actividad antimicrobiana.....	18
2.3.2	Actividad antiinflamatoria.....	20
2.3.3	Actividad antioxidante.....	20
2.4	Fabricación de andamios Colágeno-HEMA/PEGMA-Compuestos fitoquímicos.....	22
2.4.1	Preparación de solución de colágeno.....	22
2.4.2	Preparación de andamios.....	22
2.5	Caracterización de los andamios Colágeno-HEMA/PEGMA-Compuestos fitoquímicos.....	24
2.5.1	Actividad antimicrobiana.....	24
2.5.2	Actividad antiinflamatoria relativa a remoción de NO.....	24
2.5.3	Actividad antioxidante.....	25
2.6	Microestructura de andamios.....	25
2.7	Caracterización biológica y fisicoquímica de andamios Colágeno-HEMA/PEGMA-Compuestos fitoquímicos.....	25
2.7.1	Inhibición de la actividad de elastasa.....	25
2.7.2	Viabilidad celular.....	26
2.7.3	Capacidad de absorción de agua.....	27
2.7.4	Estabilidad en medio acuoso.....	27
2.8	Análisis estadístico de los datos.....	27
Capítulo 3. Resultados.....		29
3.1	Evaluación in vitro de extractos acuosos.....	29
3.1.1	Actividad antimicrobiana.....	29
3.1.2	Actividad antiinflamatoria.....	33
3.1.3	Actividad antioxidante.....	34
3.2	Elaboración de andamios.....	37
3.3	Evaluación de la microestructura de andamios por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM).....	37
3.4	Evaluación fisicoquímica de andamios Colágeno-HEMA/PEGMA-Compuestos fitoquímicos.....	38
3.4.1	Capacidad de absorción de agua.....	38

3.4.2 Estabilidad en medio acuoso.....	39
3.5.Caracterización biológica de andamios Colágeno-HEMA/PEGMA-Compuestos fitoquímicos.....	40
3.5.1 Actividad antimicrobiana.....	40
3.5.2 Actividad antiinflamatoria.....	50
3.5.3 Actividad antioxidante.....	51
3.5.4 Inhibición de la actividad de elastasa.....	52
3.5.5 Viabilidad celular.....	52
Capítulo 4. Discusión.....	54
Capítulo 5. Conclusiones.....	63
Literatura citada.....	65
Anexos.....	76

Lista de figuras

Figura	Pagina
1. Fases de la cicatrización, principales tipos de células involucradas en cada fase, y eventos acontecidos en ellas. Modificado de Falanga et al. (2005).....	4
2. Proceso de cicatrización de heridas y especies reactivas de oxígeno. En este diagrama se muestra al compuesto peróxido de hidrogeno (H ₂ O ₂) para explicar los múltiples roles en los que ROS se involucran durante la cicatrización de heridas agudas. (nota: se hace referencia a niveles homeostáticos). Modificado de Dunhill et al. (2017).....	7
3. Proceso de elaboración de andamios constituidos colágeno/H.P. 2%/M.O. 2%. Colágeno (10 mg/ml); H.P. (HEMA-PEGMA); M.O. (<i>Moringa oleifera</i>).....	23
4. Actividad antimicrobiana de extractos acuosos de plantas, a concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0% (m/v), después de 12 h de incubación 37 °C, frente a <i>S. aureus</i> . Ensayo realizado por el método de difusión de disco en agar. Control positivo (C+) carbenicilina (100 µg). M.O. (<i>Moringa oleifera</i>), H.V. (<i>Hamamelis virginiana</i>), C.O. (<i>Calendula officinalis</i>), A.V. (<i>Aloe vera</i>). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3).....	29
5. Actividad antimicrobiana de extractos acuosos de plantas, a concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0% (m/v) después de 10 h de incubación a 37 °C, frente a <i>Klebsiella pneumoniae</i> . a) Fotografía donde se observan las zonas de inhibición mostradas por el extracto de <i>M. oleifera</i> ; b) Gráfica donde se muestran los resultados de dicho ensayo, realizado por el método de difusión de disco en agar. Control positivo tetraciclina (30 µg) así como también carbenicilina (100 µg). M.O. (<i>Moringa oleifera</i>), T+ (Tetraciclina), C+ (Carbenicilina), C- (control negativo). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Los niveles de significancia están dados como ** (p < 0.01) y *** (p < 0.001).....	30
6. Actividad antimicrobiana de extractos acuosos de plantas, frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Los extractos a) M.O. (<i>Moringa oleifera</i>), b) H.V. (<i>Hamamelis virginiana</i>), c) C.O. (<i>Calendula officinalis</i>), d) A.V. (<i>Aloe vera</i>), no mostraron actividad antimicrobiana contra esta bacteria, a concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0% (m/v) después de 12 h de incubación a 37 °C. e) Gráfica donde se muestran los resultados de dicho ensayo, realizado por el método de difusión de disco en agar. Control positivo carbenicilina (100 µg) así como también tetraciclina (30 µg). C+ (Carbenicilina), T+ (Tetraciclina), C- (control negativo). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3).....	31

7. Actividad antimicrobiana de extractos acuosos de plantas, frente a *E. coli*. Los extractos a) M.O. (*Moringa oleifera*), b) H.V. (*Hamamelis virginiana*), c) C.O. (*Calendula officinalis*), d) A.V. (*Aloe vera*), no mostraron actividad antimicrobiana contra esta bacteria, a concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0% (m/v) después de 12 h de incubación a 37 °C. e) Gráfica donde se muestran los resultados de dicho ensayo, realizado por el método de difusión de disco en agar. Control positivo carbenicilina (100 µg) así como también tetraciclina (30 µg). C+ (Carbenicilina), T+ (Tetraciclina), C- (control negativo). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3)..... 32
8. Comparación de remoción de NO de extractos acuosos de plantas, a concentraciones de 2.0% (m/v). M.O. (*Moringa oleifera*), H.V. (*Hamamelis virginiana*), C.O. (*Calendula officinalis*), A.V. (*Aloe vera*). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=4). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Los niveles de significancia están dados como * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001)..... 33
9. Actividad antioxidante de extractos de plantas, concentración 0.5% (m/v), expresado en nmol Trolox equivalentes a capacidad antioxidante (TEAC) por 1 mg de extracto. M.O. (*Moringa oleifera*), H.V. (*Hamamelis virginiana*), C.O. (*Calendula officinalis*), A.V. (*Aloe vera*). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=4). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Los niveles de significancia están dados como *** (p < 0.001)..... 35
10. Efecto del pH en la actividad antioxidante de extractos de plantas, a concentración de 0.5% (m/v), expresado en nmol Trolox equivalentes a capacidad antioxidante (TEAC) por 1 mg de extracto. M.O. (*Moringa oleifera*), H.V. (*Hamamelis virginiana*), C.O. (*Calendula officinalis*), A.V. (*Aloe vera*). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=4) 36
11. Fotografías de los andamios obtenidos (A-D). Las fotografías de SEM muestran la microestructura de la superficie de los materiales (A'-D'). Colágeno 10 mg/ml (Col.) (A, A'), Colágeno/*Moringa oleifera* 2% (Col./M.O. 2%) (B,B'), Colágeno/HEMA-PEGMA 2% (Col./H.P. 2%) (C,C') y Colágeno/HEMA-PEGMA 2% /*Moringa oleifera* 2% (Col./H.P. 2%/M.O. 2%) (D,D')..... 38
12. Capacidad de absorción de agua de andamios compuestos. Col. (Colágeno), Col./M.O. 2% (Colágeno/*Moringa oleifera* 2%), Col./H.P. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%), Col./H.P. 2% /M.O. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%/ *Moringa oleifera* 2%). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3)..... 39

13. Estabilidad en medio acuoso de andamios compuestos. Col. (Colágeno), Col./M.O. 2% (Colágeno/*Moringa oleifera* 2%), Col./H.P. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%), Col./H.P. 2% /M.O. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%/Moringa oleifera 2%). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3)..... 40
14. Efecto del entrecruzamiento por calor a 140 °C, durante 24 h, en actividad antimicrobiana de andamios de Col. y Col./M.O. 2%, frente a *S. aureus*. Ensayo realizado con el método de difusión de disco en agar. Se utilizó un apósito comercial como control positivo (C). M.O. (*Moringa oleifera*), Col. t= 0 h (andamio de colágeno sin entrecruzar), Col. t= 24 h (andamio de colágeno entrecruzado 24 h), Col./M.O. 2% t=0 (andamio de colágeno/M.O. 2% sin entrecruzar), Col./M.O. t= 24h (andamio de colágeno/M.O. 2% entrecruzado 24 h) (n=3)..... 41
15. Efecto del tiempo de entrecruzamiento por calor a 140 °C, en actividad antimicrobiana de andamios de Col./M.O. 2%, frente a *S. aureus*. Ensayo realizado con el método de difusión de disco en agar. Se utilizó un apósito comercial como control positivo (C). M.O. (*Moringa oleifera*), Col./M.O. 2% t=0 (andamio de colágeno/M.O. 2% sin entrecruzar), Col./M.O. t= 1-20 h (andamios de colágeno/M.O. 2% entrecruzados a diferentes tiempos) (n=3)..... 42
16. Efecto de la temperatura de entrecruzamiento por calor, durante 1 h, en actividad antimicrobiana de andamios de Col./M.O. 2%, frente a *S. aureus*. Ensayo realizado con el método de difusión de disco en agar. M.O. (*Moringa oleifera*), Col./M.O. 2% (andamio de colágeno/M.O. 2%). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Los niveles de significancia están dados como *** (p < 0.001)..... 43
17. Efecto del tiempo de entrecruzamiento por calor a 100 °C, en actividad antimicrobiana de andamios de Col./M.O. 2%, frente a *S. aureus*. Ensayo realizado con el método de difusión de disco en agar. M.O. (*Moringa oleifera*), Col./M.O. 2% (andamio de colágeno/M.O. 2%). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía..... 44
18. Efecto del tiempo de entrecruzamiento por calor a 100 °C, de andamios de Col. y Col./M.O. 2% en actividad antimicrobiana, frente a *S. aureus*. Ensayo realizado con el método de difusión de disco en agar. Se utilizó un apósito comercial como control positivo (C). M.O. (*Moringa oleifera*), Col. t=0 (andamio de colágeno sin entrecruzar), Col. t= 1-3 h (andamios de colágeno entrecruzado a diferentes tiempos), Col./M.O. 2% t=0 (andamio de colágeno/M.O. 2% sin entrecruzar), Col./M.O. t= 1-3 h (andamios de colágeno/M.O. 2% entrecruzado a diferentes tiempos). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Los niveles de significancia están dados como * (p < 0.05)..... 45

19. Efecto del tiempo de entrecruzamiento por calor a 100 °C , de andamios de Col. y Col./M.O. 2% en actividad antimicrobiana, frente a *Klebsiella pneumoniae*. Ensayo realizado con el método de difusión de disco en agar. Se utilizó un apósito comercial como control positivo (C). M.O. (*Moringa oleifera*), Col. t=0 (andamio de colágeno sin entrecruzar), Col. t= 1-3 h (andamios de colágeno entrecruzado a diferentes tiempos), Col./M.O. 2% t=0 (andamio de colágeno/M.O. 2% sin entrecruzar), Col./M.O. t= 1-3 h (andamios de colágeno/M.O. 2% entrecruzado a diferentes tiempos). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Los niveles de significancia están dados como* (p < 0.05) y *** (p < 0.001)..... 46
20. Efecto de la temperatura de entrecruzamiento por calor, durante 1 h, en actividad antimicrobiana de andamios de Col./H.P. 2%/M.O. 2%, frente a *S. aureus*. Ensayo realizado con el método de difusión de disco en agar. M.O. (*Moringa oleifera*), Col./H.P. 2%/M.O. 2% (andamio de colágeno/HEMA-PEGMA 2%/M.O. 2%). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Los niveles de significancia están dados como *** (p < 0.001)..... 47
21. Efecto del tiempo de entrecruzamiento por calor a 100 °C, en actividad antimicrobiana de andamios de Col./H.P. 2%/M.O. 2%, frente a *S. aureus*. Ensayo realizado con el método de difusión de disco en agar. M.O. (*Moringa oleifera*), Col./H.P. 2%/M.O. 2% (andamio de colágeno/HEMA-PEGMA 2%/M.O. 2%). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Los niveles de significancia están dados como* (p < 0.05) y *** (p < 0.001)..... 48
22. Efecto del tiempo de entrecruzamiento por calor a 100 °C, de andamios de Col./H.P. 2% y Col./H.P. 2%/M.O. 2% en actividad antimicrobiana, frente a *Klebsiella pneumoniae*. a) Ensayo realizado con el método de difusión de disco en agar. Se utilizó un apósito comercial como control positivo (C). b) Gráfica donde se muestran los resultados de dicho ensayo. M.O. (*Moringa oleifera*), H.P. 2% (HEMA-PEGMA 2%) Col./H.P. 2% t=0 (andamio de colágeno/ H.P. 2% sin entrecruzar), Col./H.P. 2% t= 1-9 h (andamios de colágeno entrecruzado a diferentes tiempos), Col./H.P. 2%/M.O. 2% t=0 (andamio de colágeno/H.P. 2%/M.O. 2% sin entrecruzar), Col./M.O. t= 1-9 h (andamios de colágeno/H.P. 2%/M.O. 2% entrecruzado a diferentes tiempos). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Los niveles de significancia están dados como ** (p < 0.01) y *** (p < 0.001)..... 49
23. Actividad antiinflamatoria de los andamios compuestos. Col. (Colágeno), Col./M.O. 2% (Colágeno/*Moringa oleifera* 2%), Col./H.P. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%), Col./H.P. 2% /M.O. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%/ *Moringa oleifera* 2%). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3)..... 50

24. Actividad antioxidante de extractos de andamios expresado en nmol Trolox equivalentes a capacidad antioxidante (TEAC) por 1 mg de andamio. Col. (Colágeno), Col./M.O. 2% (Colágeno/*Moringa oleifera* 2%), Col./H.P. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%), Col./H.P. 2% /M.O. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%/ *Moringa oleifera* 2%). (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Los niveles de significancia están dados como *** ($p < 0.001$)..... 51
25. Efecto de las alícuotas de liberación de los andamios en la actividad de elastasa. Datos correspondientes a alícuota de liberación de 15 min. Control: agua destilada. Col. (Colágeno), Col./M.O. 2% (Colágeno/*Moringa oleifera* 2%), Col./H.P. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%), Col./H.P. 2% /M.O. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%/ *Moringa oleifera* 2%). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3)..... 52
26. Viabilidad celular de fibroblastos humanos (línea celular CCD- 1112sk) en presencia de andamios compuestos. Col. (Colágeno), Col./M.O. 2% (Colágeno/*Moringa oleifera* 2%), Col./H.P. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%), Col./H.P. 2% /M.O. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%/ *Moringa oleifera* 2%). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3)..... 53

Capítulo 1. Introducción

Un andamio es una red polimérica porosa interconectada que permite la proliferación de células gracias al flujo de nutrientes y oxígeno, a través de sus poros (Bassu, 2017) y, dada su función, deben ser biocompatibles y biodegradables (O'Brien, 2011; Moura et al., 2013). Los biomateriales fabricados a partir de colágeno tienen alta porosidad, biodegradabilidad, baja respuesta inmunogénica y alta biocompatibilidad en comparación con otros polímeros naturales (Maeda et al., 1999). Por lo que sus propiedades biológicas han sido el principal criterio para la utilización de este polímero en aplicaciones biomédicas (Poole-Warren et al., 2016). Un criterio muy importante por considerar es que los andamios deben ser lo suficientemente resistentes para permitir su manipulación, durante su aplicación en un sitio lesionado, para promover la cicatrización (Hinderer et al., 2016). Sin embargo, debido a la naturaleza del colágeno, no se logra cumplir con esta característica. Si bien se han realizado extensas investigaciones con el fin de crear andamios tridimensionales basados en colágeno para una amplia variedad de aplicaciones enfocadas en la reparación y regeneración de tejidos (Grover et al., 2012; Campbell et al., 2014; Ahmad et al., 2015; Mullen et al., 2015; Davidenko et al., 2015), el mejorar la estabilidad de materiales a base de colágeno, como su rápida degradación *in situ*, debido a enzimas presentes en el tejido en el que el material es implantado, así como propiedades estructurales disminuidas (Chang et al., 2012; Yunoki, et al., 2010), continúa siendo un reto. Estas desventajas podrían eliminarse mediante la incorporación de polímeros sintéticos a la matriz polimérica natural. Algunos polímeros pueden ser el metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) y metil éter metacrilato de polietilenglicol (PEGMA). Además de su biocompatibilidad, se ha reportado que los metacrilatos pueden inhibir la función de metaloproteinasas (MMPs), enzimas presentes en heridas, las cuales afectan el proceso de cicatrización (Sun et al., 2017). Por lo tanto, el propósito general de esta investigación es generar una alternativa para el mejoramiento de cicatrización en heridas de tejidos blandos, tanto agudas como crónicas, siendo estas últimas de suma importancia debido a las complicaciones clínicas que pueden llegar a desencadenar. En esta tesis se reporta la fabricación de andamios a base de colágeno, a los cuales se incorporaron HEMA y PEGMA con la finalidad de modificar la integridad estructural de los materiales, con respecto a los andamios que solo contienen colágeno. Además, se incorporaron extractos de plantas con actividades biológicas para promover la cicatrización de heridas, con efectos tales como antiinflamatorios, antioxidantes y antimicrobianos, previamente reportados para algunas de las plantas aquí propuestas. Por lo tanto, los materiales obtenidos se evaluaron con respecto a sus características microestructurales, actividad antimicrobiana, antioxidante y antiinflamatoria y su biocompatibilidad. También se evaluaron propiedades fisicoquímicas, tales como capacidad de absorción de agua y estabilidad en medio acuoso.

1.1. Antecedentes

La piel es el órgano más grande en el cuerpo humano y tiene una superficie de área de aproximadamente de 1.5 – 2 m². Tiene la importante función de proteger al cuerpo de múltiples ambientes dañinos, incluyendo microorganismos externos, rayos ultravioletas y sustancias químicas; también previene la deshidratación debido a la evaporación de la humedad, regula la temperatura corporal, y está asociada en los procesos de sensación y excreción. La piel está dividida en dos partes: la epidermis (la capa externa) y la dermis (la parte interna). La unión dermis-epidermis, también llamada membrana basal, separa las dos capas. Por debajo de la dermis se encuentra una capa de tejido conectivo laxa, llamada tejido subcutáneo o hipodermis (Ayello et al., 2014; Summerfield et al., 2015). Cuando existe un corte o abertura de la piel, puede alcanzar tal profundidad que la dermis, grasa subcutánea, el músculo e inclusive el hueso, pueden ser dañados. En consecuencia, las funciones de protección ejercidas por la piel no se desempeñan adecuadamente, por lo que es de vital importancia la restauración de su integridad de manera rápida y eficiente (Enoch, 2004).

Una herida es la interrupción de la estructura y función anatómica normal de la piel. Puede ser descrita como una secuencia de daños a una superficie epitelial y su tejido conectivo circundante que puede complicarse debido al daño excesivo del tejido, una patología subyacente y la perfusión y oxigenación insuficiente a los tejidos (Dunhill et al., 2017). Estas lesiones, ya sea con violencia, accidente o por cirugía, pueden ser categorizadas en dos tipos principales: heridas agudas y crónicas.

En heridas agudas, la cicatrización comienza a partir de la generación de un coágulo de fibrina que cubre el lugar dañado, y con el paso de los días, dan inicio las fases para regenerar el sitio de la herida. La formación de capilares, así como la subsecuente llegada de fibroblastos y células inflamatorias al sitio dañado, permiten la formación un tejido de granulación contráctil, el cual unirá los márgenes de la herida (Martin, 1997). Por lo general, estas heridas se presentan en individuos sin defectos fisiopatológicos y el proceso de curación se realiza siguiendo el orden del proceso de cicatrización; este es continuo, rápido y con el menor gasto de energía posible por parte del organismo. En las heridas crónicas, el tiempo de curación es retardado y la distribución celular no es completa, por lo que la cicatrización no se produce. El retraso de cicatrización puede deberse a factores propios del huésped: desnutrición, presencia de una fisiopatología o mala circulación, entre otros. Una herida se considera crónica cuando no sana después de 10 semanas, esto debido generalmente a que las fases del proceso de cicatrización están desacopladas (Lee, 2005).

1.1.1. Proceso de cicatrización

La respuesta de cicatrización debe iniciar cuando el tejido de la piel es dañado o experimenta un cambio en su conformación estructural. El proceso de cicatrización de una herida está dividido en cuatro fases: 1) fase de coagulación, 2) fase inflamatoria, 3) fase de migración/proliferación y 4) fase de remodelación. En este proceso interactúan las células presentes en cada fase, los múltiples factores derivados de las células, y los componentes de la matriz extracelular (MEC) (Moura et al., 2013).

Después de la lesión del tejido, un coágulo de fibrina se forma con el fin de reestablecer la homeostasis local, y las plaquetas agregadas secretan varios factores de crecimiento y citocinas, como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y la proteína quimio-atrayente de monocitos (MCP-1), los cuales reclutan a neutrófilos y monocitos al sitio de la herida. Estas células inflamatorias inducen la expresión del factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los cuales son extremadamente importantes para la primera fase del proceso de formación de tejido nuevo (Wilgus, 2008).

La re-epitelización usualmente comienza unas cuantas horas después de la lesión. En respuesta a estos factores de crecimiento, los queratinocitos y los fibroblastos migran desde los límites hacia el sitio de la herida donde proliferan y construyen la MEC que ayudará a mejorar la cicatrización. La MEC inicial es gradualmente reemplazada por una matriz de colágeno y vasos sanguíneos, resultantes del proceso de angiogénesis. Los factores angiogénicos, como el factor de crecimiento para fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) inducen este proceso al estimular la producción de fibroblastos y de factores de crecimiento vascular endotelial por medio de macrófagos y células endoteliales (Wilgus, 2008; Tsirogianni et al., 2006). Por otro lado, la actividad y expresión de enzimas proteasas también son necesarias para el proceso de angiogénesis. Cuando el área de la herida es cubierta completamente con el nuevo tejido granuloso, la angiogénesis se detiene y comienza el colapso de varios vasos sanguíneos que irrigan el sitio de la lesión. La última fase del proceso de cicatrización se caracteriza por la degradación de tejido de granulación previamente formado, y por la regeneración de la dermis (Moura, et al., 2013). Cada fase se observa en todas las heridas y es consecutivamente precedida de la superposición de cada fase sin una distinción definida (Martin et al., 1997; Singer et al., 1999; Hirth et al., 2012).

Las fases de la cicatrización se muestran en la Fig.1, en la cual se hace hincapié en los eventos principales ocurridos en cada fase y los tipos de células implicadas. Mientras las heridas agudas pasan por la

progresión lineal de estos eventos de superposición biológicos y moleculares, algunas áreas de las heridas crónicas se encuentran en diferentes fases al mismo tiempo y, presumiblemente, la progresión a la siguiente fase no ocurre en sincronía (Falanga et al., 2005).

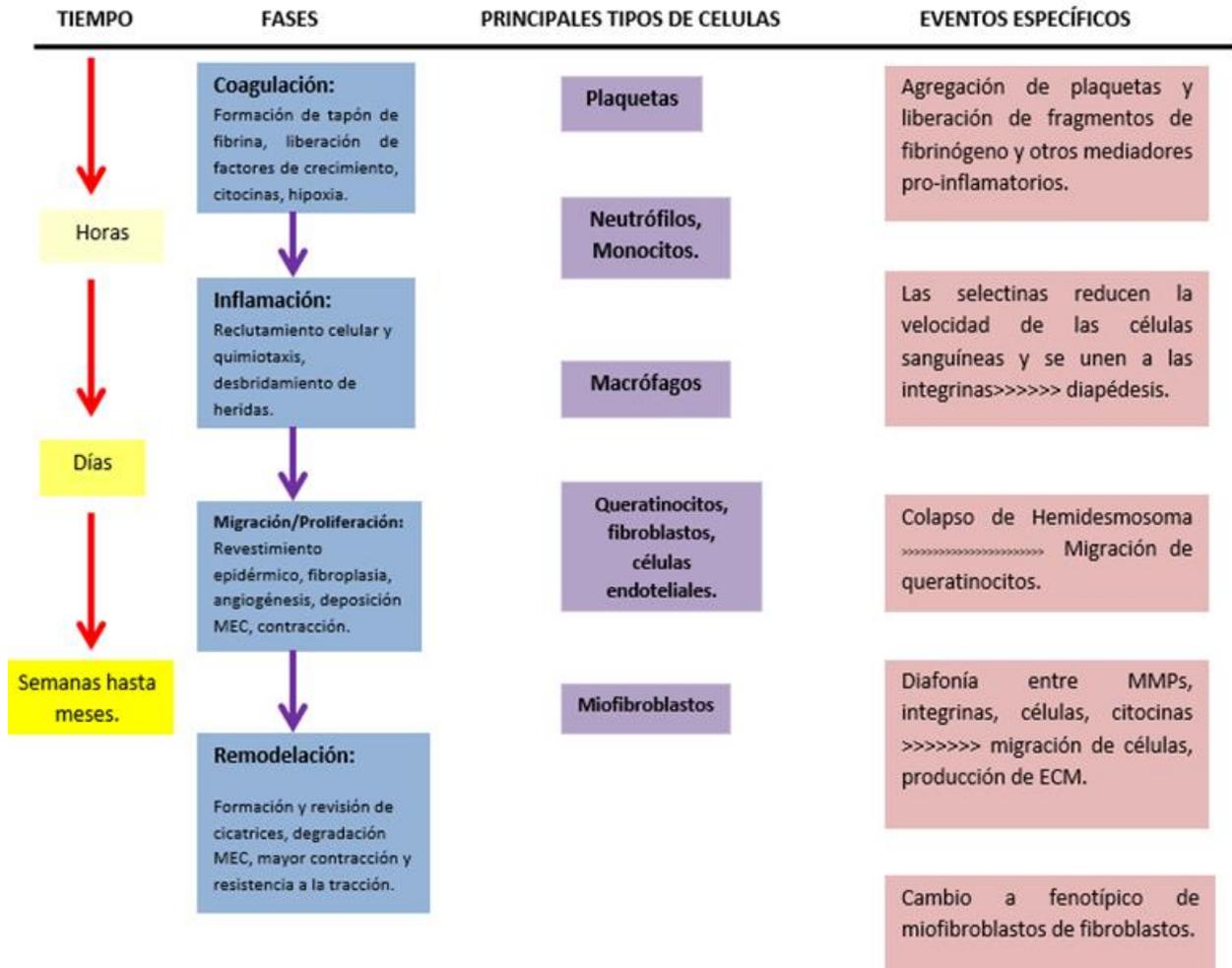


Fig. 1. Fases de la cicatrización, principales tipos de células involucradas en cada fase, y eventos acontecidos en ellas. Modificado de Falanga et al. (2005).

1.1.2. Cicatrización en heridas crónicas

La cicatrización de una herida requiere de una integración bien orquestada de eventos celulares y moleculares como la migración celular, proliferación celular, y depósito de la MEC en el sitio de la lesión. Las respuestas celulares a mediadores inflamatorios, factores de crecimiento, citocinas y fuerzas

mecánicas deben ser apropiadas y precisas (Falanga et al., 2005). Muchos factores pueden impedir que el proceso de cicatrización se realice de manera normal en heridas crónicas. Factores locales incluyen la presencia de cuerpos extraños, maceración de tejidos, isquemia, así como infección. Factores sistémicos tan diversos como la edad avanzada en el paciente, malnutrición, diabetes y presencia de enfermedad renal pueden ser de importancia. Además de los factores locales y sistémicos anteriormente señalados, la reducción de factores de crecimiento, un desbalance entre las enzimas proteolíticas y sus inhibidores, así como la presencia de células senescentes juegan un papel importante en la cicatrización de heridas de este tipo (Harding et al., 2002).

En heridas crónicas, un incremento de neutrófilos puede llegar a generar un efecto destructivo, esto debido a la función exacerbada de estas células en el sitio de la lesión, por lo que su reparación será afectada. Además, debido a este incremento, las heridas crónicas se transforman en ambientes proteolíticos compuestos principalmente de proteasas derivadas del huésped (Shah et al., 2017). Algunos estudios reportan que esto sucede debido a la persistente y excesiva actividad de metaloproteinasas (MMPs) y/o a los bajos niveles de inhibidores de MMPs (Lobmann et al., 2006; Liu et al., 2009). Por otra parte, la isquemia y la enfermedad vascular reducen la capacidad cicatrizante debido al escaso suplemento de oxígeno y nutrientes hacia el área de la herida (Guo et al., 2010). También se presenta deterioro de la quimiotaxis, así como de la función ejercida por granulocitos y macrófagos, además de inflamación prolongada y desregulación de la fase de migración/proliferación (Acosta et al., 2008; Blaklythy et al., 2009). Estos eventos están principalmente causados por la disminución y/o expresión deteriorada de los factores angiogénicos y de crecimiento (VEGF y PDGF) (Bloomgarden, 2008). Se ha encontrado que los fibroblastos en heridas crónicas presentan una respuesta disminuida a hormonas del crecimiento, lo que puede deberse a un incremento en el número de células senescentes (Hasan et al., 1997; Stanley et al., 1997). Finalmente, también pueden existir anomalías asociadas al óxido nítrico (NO), acumulación de colágeno (Brem et al., 2007), migración y proliferación anormal de fibroblastos y queratinocitos (Bloomgarden, 2008), así como acumulación de componentes de MEC y remodelación de esta, por MMPs (Muller et al., 2008).

Este microambiente desregulado y proinflamatorio conduce a la destrucción excesiva de tejido, así como también a la reducción de niveles de factores de crecimiento normalmente encontrados en individuos sanos (Falanga et al., 2005). Además de lo anterior, tanto macrófagos como neutrófilos producen especies reactivas de oxígeno (ROS) como mecanismo de defensa contra bacterias oportunistas, las cuales pueden agravar la inflamación y la citotoxicidad del microambiente (Shah et al., 2017).

1.1.3. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

El oxígeno (O_2) es un sustrato esencial requerido para altos rendimientos de trifosfato de adenosina (ATP) impulsados por mitocondria y, en el contexto de cicatrización de heridas, provee la cantidad elevada de energía requerida para la regeneración de tejidos. Los radicales derivados de oxígeno, conocidos como ROS, son también de gran importancia para este proceso ya que actúan como moléculas mensajeras de señalización secundaria. El término ROS es aplicado para todas aquellas moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada y que contienen oxígeno. Los principales miembros de la familia de moléculas de ROS incluyen el anión superóxido (O_2^-), peróxido (O_2^{2-}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilos (OH) y iones hidroxilo (OH^-), entre otros (Dunnill et al., 2015).

Las ROS, en niveles homeostáticos, son importantes como protectoras iniciales de las heridas. Durante la respuesta de cicatrización, ciertas células utilizan estos radicales, incluyendo las plaquetas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos. Algunos efectos sobre el microambiente de la herida producidos a partir de las ROS son enumerados a continuación : 1) reducen la irrigación sanguínea y la señalización celular local para así promover la formación del coágulo de fibrina; 2) la emisión local de ROS promueve la rápida migración de neutrófilos desde los vasos sanguíneos circundantes para proteger el sitio contra bacterias; 3) parte de la cascada de señalización de las ROS, activan la fagocitosis de bacterias y hongos, para frenar su crecimiento y proveer señales que ayuden a mejorar la futura respuesta inmunitaria frente a estos; 4) los monocitos y otras células, migran hacia la herida para ayudar a atacar patógenos invasores gracias a la señalización de ROS; y por último, 5) las ROS estimulan la división y migración de células endoteliales, fibroblastos y queratinocitos, para la reconstrucción de vasos sanguíneos y la formación de matriz extracelular (incluyendo la síntesis de colágeno) (Dunnill et al., 2017). En la Fig. 2, se puede observar de manera esquematizada los procesos en los que las ROS están involucradas en la cicatrización de una herida.

Aunque los niveles bajos de ROS pueden influenciar de manera positiva la cicatrización, la producción excesiva de estos radicales conduce al estrés oxidativo, el cual puede tener efectos negativos en este proceso, ya que puede promover el daño tisular. Niveles elevados y sostenidos de ROS, han sido detectados *in vivo* y se asocian con la falta de cicatrización en heridas crónicas y de tejidos suaves (Dunnill et al., 2017).

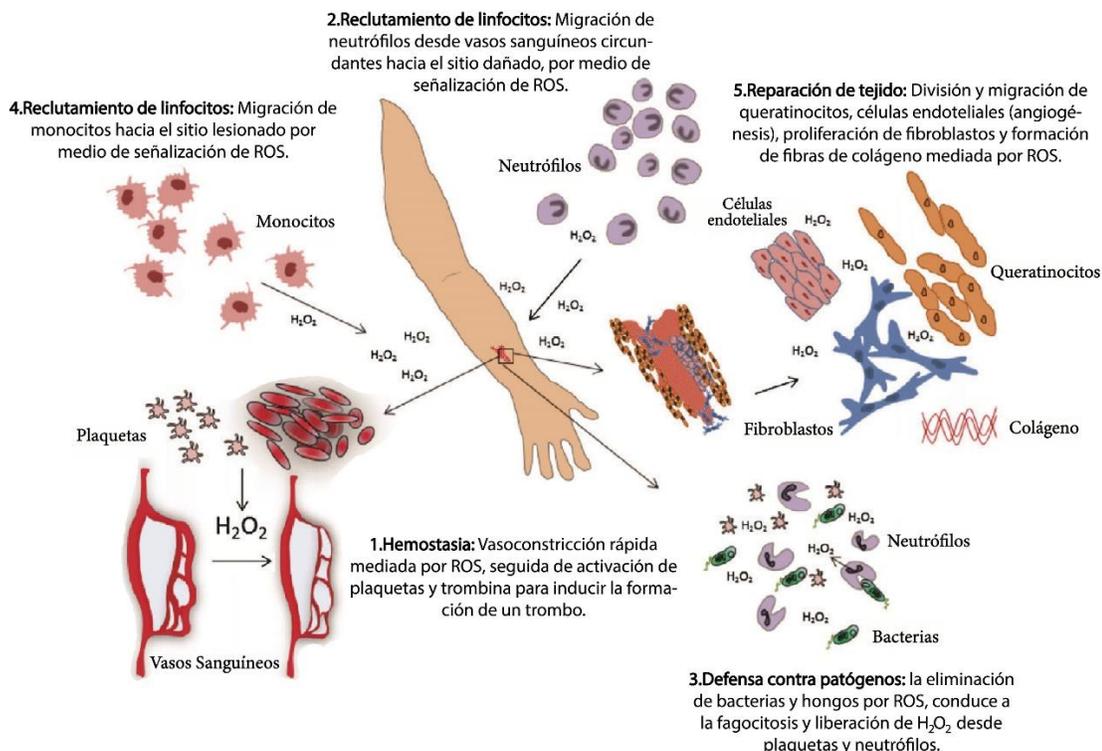


Fig. 2. Proceso de cicatrización de heridas y especies reactivas de oxígeno. En este diagrama se muestra al compuesto peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para explicar los múltiples roles en los que ROS se involucran durante la cicatrización de heridas agudas. (nota: se hace referencia a niveles homeostáticos de ROS). Modificado de Dunhill et al. (2017).

El control homeostático de niveles de ROS en células (estado redox), está a cargo de un grupo de compuestos especializados conocidos como antioxidantes. Un antioxidante es una sustancia que retarda o previene la oxidación de dicho sustrato encontrándose en bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable o biomolécula (Halliwell, 1994). Los antioxidantes pueden llegar a remover los efectos deletéreos de las ROS, y lo hacen al donar sus propios electrones, previniendo que estas no logren capturar electrones de otras moléculas importantes, como ADN, proteínas y lípidos. En el contexto de cicatrización de heridas, a nivel mundial se estudia el efecto antioxidante y antiinflamatorio de los compuestos fitoquímicos (Shah et al., 2017).

1.1.4. Compuestos fitoquímicos

Las plantas con efectos medicinales son una de las mejores fuentes para obtener una gran variedad de medicamentos. Se calcula que alrededor del 80% de los habitantes de países en vías de desarrollo, cubren sus necesidades de atención primaria de salud con medicamentos tradicionales. Una gran parte de los tratamientos tradicionales están centrados en el uso de extractos de plantas o de sus principios activos (Akerlele, 1993). La extracción y caracterización de compuestos activos a partir de plantas medicinales han resultado en el descubrimiento de nuevos fármacos con alto valor terapéutico (Cervantes et al., 2001). Así como algunos de los fármacos que se han desarrollado en tiempos recientes, las prescripciones o extractos herbales contienen múltiples constituyentes activos. Es interesante señalar que los compuestos naturales contenidos en estas “mezclas herbales” pueden llegar a interactuar sinérgicamente dando como resultado un efecto farmacológico, el cual pudiera actuar en el cuerpo humano, al proveer efectos terapéuticos sin o con mínimos efectos secundarios (Kaufman et al., 1999). Un gran número de plantas y compuestos naturales han mostrado poseer actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana, en gran medida gracias a los compuestos secundarios que las plantas sintetizan como parte de su metabolismo, los compuestos fitoquímicos (Nascimento et al., 2000), los cuales pueden poseer actividad biológica benéfica para la salud (Shah et al., 2017).

La utilización de antioxidantes naturales obtenidos a partir de plantas con efectos medicinales pueden ser una vía accesible y fácil para inhibir los efectos negativos causados por ROS. Es así, que los compuestos fitoquímicos con alta capacidad antioxidante tienen aplicaciones farmacológicas (Kavoosi, 2017). Plantas como *Aloe vera* (*A. vera*) y *Moringa oleifera* (*M. oleifera*) contienen compuestos fitoquímicos, tales como fenoles y flavonoides, entre otros, que pueden promover la cicatrización de tejidos dadas sus actividades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas (Budovsky et al., 2015). La *A. vera* contiene unos 75 compuestos con potencial actividad biológica y alrededor del 90% de estos compuestos están concentrados en el gel que se obtiene de la parte central de las hojas; los azúcares contenidos constituyen cerca del 25% de sus ingredientes esenciales, los cuales tienen excelentes propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, antialérgicas, antimicrobianas y analgésicas (Balaji et al., 2015). Mientras que para *M. oleifera*, se ha reportado su capacidad para promover la cicatrización de heridas, al utilizar extractos acuosos de las hojas de esta planta en heridas provocadas en ratas (Rathi et al., 2006; Muhammad et al., 2016); así mismo, recientemente se evaluaron extractos polares y no polares a diferentes dosis de *M. oleifera* (30–300 mg/kg), en un modelo murino, en donde los resultados obtenidos mostraron evidencia de las actividad analgésica y antiinflamatoria de esta planta (Martínez-González et al., 2017).

Hammamelis virginiana (*H. virginiana*) es una planta cuyas aplicaciones como fitofármaco han resultado en objeto de estudio desde hace años (Villar del Fresno, 2001). La actividad de esta planta se atribuye a la presencia de compuestos polifenólicos (sustancias tánicas y flavonoides) y a aceites esenciales. La mayoría de los ensayos farmacológicos se han orientado hacia el establecimiento de una actividad antiinflamatoria tópica o sistémica, o en ese mismo sentido para el tratamiento de diversas afecciones de la piel (Bruneton, 1993; Thring et al., 2011). En un estudio doble ciego se demostró que una pomada a base de destilado de *H. virginiana* era tan eficaz como los preparados con un AINE (bufexamac) en el tratamiento de dermatitis atópica (pacientes con eccema) (Korting et al., 1995). Se ha demostrado *in vitro*, en cultivo de fibroblastos dérmicos murinos, que un compuesto tanino obtenido a partir de esta planta presenta un efecto protector contra el daño causado por ROS (Masaki et al., 1995). Además, también inhibe el efecto de TNF α *in vitro*, el cual induce la muerte de células endoteliales (Habtemariam, 2002).

El efecto cicatrizante de extractos de *Calendula officinalis* (*C. officinalis*) en heridas inducidas en ratas albinas ha sido previamente reportado en estudios *in vivo* (Klouček-Popova et al., 1982). Por otro lado, resultados de una investigación *in vitro* demostraron que extractos de esta planta estimulan la migración y proliferación de la línea NIH-3T3 de fibroblastos de ratón (Fronza et al., 2009). Un estudio efectuado en 2012 reportó que extractos de *C. officinalis* mostraban efectos para promover angiogénesis, así como cicatrización en heridas cutáneas, inducidas en un modelo murino (Parente et al., 2012). También se ha reportado la utilización del extracto de *C. officinalis* para prevenir dermatitis aguda durante tratamiento de cáncer de mama (Pommier et al., 2004). A través de estudios químicos realizados a diferentes tipos de extractos de *C. officinalis*, revelaron la presencia de diferentes clases de compuestos como triterpenoides, flavonoides, quinonas, carotenoides, aminoácidos, entre otros (Muley et al., 2009), a los cuales se les atribuye la actividad biológica de esta planta.

El uso de plantas medicinales tiene una larga historia en todo el mundo y las preparaciones herbales, incluyendo los extractos, pueden ser hallados en las farmacopeas de numerosos países (Hostettmann et al., 1995). Estos extractos pueden ser utilizados de manera tópica o incluirse en materiales biocompatibles, como apósitos o andamios, para que estos puedan dar beneficios de manera localizada en el sitio de la lesión.

1.1.5. Andamios

Un andamio se define como una red polimérica que presenta poros interconectados de 10 y 100 μm , que facilita el crecimiento de un tejido y reduce las limitaciones de difusión de nutrientes y oxígeno dada su alta porosidad (Bassu, 2017). Los andamios pueden ser utilizados para diferentes propósitos, por ejemplo: 1) adhesión y migración de células; 2) retención y entrega de factores bioquímicos y de crecimiento; 3) difusión/expresión de productos y nutrientes vitales para la célula; y d) ejercer una cierta influencia mecánica y biológica para modificar el comportamiento celular (Bassu, 2017).

Con el propósito de que un andamio sea funcional en un organismo, el diseño de éste debe ser completamente afinado y cumplir con ciertas características; debe fabricarse a partir de un material biocompatible y, de preferencia, biodegradable, para que este pueda ser degradado por el organismo en el sitio de implantación, con lo que se evitará cualquier tipo de traumatismo asociado a su remoción. Un andamio debe facilitar que las células lleven a cabo procesos que permitan su funcionamiento normal tales como reacciones metabólicas y producción de energía, mitosis para promover su división y crecimiento, así como procesos de transporte pasivo y activo de nutrientes y/o desechos, según sea el caso. Además de lo anterior, las células deben ser capaces de migrar a través del andamio para comenzar a proliferar (O'Brien, 2011). Mientras que la morfología y la porosidad son elementos clave en el diseño de los andamios, sus propiedades mecánicas son de importancia secundaria, debido a que no requieren proveer soporte mecánico. Sin embargo, deben ser lo suficientemente resistentes para permitir su manipulación e implantación en el sitio deseado (Hinderer et al., 2016).

Típicamente, tres grupos individuales de biomateriales, cerámicos, polímeros sintéticos y naturales, son utilizados en la fabricación de andamios para la ingeniería de tejidos. Cada uno de estos grupos de biomateriales tienen ventajas y desventajas específicas. Los andamios a base de materiales cerámicos se caracterizan por tener una alta resistencia mecánica, muy baja elasticidad y superficies rígidas y quebradizas. Desde la perspectiva de utilización de estos materiales en padecimientos óseos, exhiben una excelente biocompatibilidad debido a sus similitudes tanto físicas como químicas en comparación con la fase mineral del tejido óseo nativo. Sin embargo, su utilización en ingeniería de tejidos ha sido limitada debido a su dificultad para ser moldeados, así como también por su configuración quebradiza (Wang, 2003). Un ejemplo de este tipo de materiales es la hidroxiapatita (HA) que, aunque es un constituyente primario de hueso y pudiera considerarse como un material ideal para aplicaciones como sustituto óseo para implante, se han reportado dificultades para controlar su tasa de degradación (Van Landuyt et al., 1995; Tancred et al., 1998).

Algunos de los polímeros sintéticos que se han utilizado en la fabricación de andamios son: poliestireno, ácido poliglicólico (PGA), y ácido poli-(láctico-co-glicólico) (PLGA) (O'Brien, 2011). Mientras que estos materiales han mostrado ventajas tales como facilidad para moldear su arquitectura y una tasa de degradación controlada, dependiente de la concentración o composición del polímero, presentan desventajas que incluyen el riesgo de ser rechazados al momento de ser implantados en un organismo vivo debido a su baja bioactividad (Lu et al., 2000; Oh et al., 2003; Rowlands et al., 2007). Por otro lado, el proceso de degradación de algunos de estos polímeros, como PGA, son realizados por medio de hidrólisis; por lo que hay producción de dióxido de carbono y un decremento en el pH local, lo cual pudiera resultar en necrosis del tejido en el que está implantado (Liu et al., 2006).

El tercer tipo de biomateriales utilizados comúnmente para la fabricación de andamios son aquellos que provienen de fuentes biológicas. Ejemplos de estos son el colágeno, sustratos a base de alginato y quitosano, así como varios proteoglicanos. A diferencia de los andamios a base de polímeros sintéticos, los andamios de polímeros naturales promueven una excelente adhesión y proliferación celular; además son biodegradables, por lo que permiten, con el paso del tiempo, que las células hospederas produzcan matriz extracelular y esta reemplace al andamio degradado. Sin embargo, este tipo de andamios presentan bajas propiedades mecánicas, así como problemas alrededor de su fabricación lo cual limita su uso, por ejemplo, en aplicaciones ortopédicas (O'Brien, 2011).

Las desventajas que existen cuando se utilizan andamios constituidos por un solo tipo de biomaterial, han llevado a la investigación y desarrollo de materiales compuestos constituidos de diferentes tipos de biomateriales. Por ejemplo, algunos grupos de investigación han intentado la introducción de materiales cerámicos en andamios basados en polímeros (Taboas et al., 2003; Kim et al., 2006), mientras que otros han combinado polímeros sintéticos con polímeros naturales (Friess y Schlapp 2006; Wu et al. 2007), con el fin de mejorar sus propiedades de compatibilidad (O'Brien, 2011). Implantes de piel, apósitos y andamios, construidos a partir de polímeros biocompatibles, como colágeno, varios proteoglicanos, sustratos basados en alginato y quitosano, han sido desarrollados para mejorar la cicatrización debido a las ventajas mostradas para reducir la formación de una cicatriz, así como ayudar a acelerar la cicatrización sin ninguna infección (Ryan et al., 2012). El enfoque por utilizar en este trabajo se basa en andamios constituidos de colágeno.

1.1.6. Andamios de colágeno

La MEC de los tejidos brinda soporte mecánico a las células. Además, provee un ambiente idóneo en el que las señales biológicas se transmiten fácilmente y los diferentes procesos celulares puedan llevarse a cabo normalmente en los distintos órganos y tejidos que constituyen el cuerpo (Ryan et al., 2012). Cuando se utilizan biopolímeros en forma de andamios, estos deben ser capaces de mimetizar estas funciones (Davidenko et al., 2016).

En años recientes, se han realizado extensas investigaciones con el fin de crear andamios tridimensionales basados en colágeno y otras biomoléculas para una amplia variedad de aplicaciones enfocadas en la reparación y regeneración de tejidos incluyendo tendón (Ahmad et al., 2015), cartílago (Mullen et al., 2015), glándulas mamarias (Campbell et al., 2014), así como tejido de miocardio (Grover et al., 2012; Davidenko et al., 2015). Sin embargo, las características del colágeno como biomaterial son distintas a aquellas de los polímeros sintéticos, principalmente en la manera en la que interacciona con el cuerpo (McPherson et al., 1986). El colágeno tiene una función importante en la formación de tejidos y órganos, y está involucrado en varias funciones de expresión de las células. En particular, el colágeno de tipo I, es el constituyente más abundante de la MEC de muchos tejidos blandos y duros en el cuerpo humano, principalmente de la piel, el cartílago, así como de tejido conectivo y óseo (O'Brien, 2011).

Debido a su excelente biocompatibilidad y bioseguridad, el uso de colágeno en aplicaciones biomédicas ha ido ampliándose y es utilizado en múltiples áreas de bioingeniería. Esta proteína provee tanto soporte estructural a las células residentes, así como sitios moleculares de reconocimiento de receptores celulares, los cuales son esenciales para las interacciones célula- sustrato; además, puede formar fibras con alta resistencia y estabilidad a través de su auto agregación y entrecruzamiento (Knight et al., 1998). Se ha demostrado que los andamios de colágeno absorben fácilmente grandes cantidades de exudado en heridas, tienen una adherencia suave al microambiente húmedo del sitio afectado, mantienen el tejido hidratado, y lo protegen contra infecciones causadas por bacterias (Lee et al., 2001). El criterio principal para la utilización del colágeno en aplicaciones biomédicas se basa en las propiedades biológicas que este polímero presenta (Poole-Warren et al., 2016). Los biomateriales fabricados a partir de colágeno tienen alta porosidad, biodegradabilidad, baja respuesta inmunogénica y alta biocompatibilidad en comparación con otros polímeros naturales, como quitosano y alginato (Maeda et al., 1999).

Sin embargo, algunas desventajas de los sistemas basados en colágeno son su rápida degradación *in situ*, debido a enzimas colagenasas presentes en el tejido en el que el material es implantado, así como

propiedades estructurales disminuidas (Chang et al., 2012; Yunoki, et al., 2010). Es necesario mejorar las propiedades estructurales para contrarrestar algunas de las desventajas que presentan los andamios basados en colágeno. El mejoramiento puede lograrse, ajustando la estructura de la matriz de colágeno o agregando otras sustancias a ella (O'Brien, 2011). Polímeros sintéticos han sido estudiados para su posible utilización en la fabricación de andamios basándose en su porosidad y propiedades mecánicas, las cuales son características deseables en biomateriales (Yunoki et al., 2010). Hidrogeles sintetizados a partir de colágeno-HEMA-ciprofloxacino, exhibieron características claves útiles para su utilización en ingeniería de tejidos, entre ellas una alta porosidad y el mejoramiento de sus propiedades físicas (Pamfil et al., 2017). En un estudio basado en células de pulpa dental, HEMA a concentraciones de 0.5%, 2.0%, 5.0% y 10.0%, equivalentes a 5, 20, 50 y 100 µg/ml, mostraron efectos sobre la actividad y expresión de MMPs, por lo que los autores sugieren que puede proteger contra la degradación de colágeno tipo I durante procesos de adhesión de dentina (Sun et al., 2017). Por otro lado, un estudio realizado en andamios de alginato a los cuales se les incorporó PEGMA como plastificante, mostraron que al agregar estos polímeros ayudan a mejorar las características estructurales de los materiales resultantes (Rubio-Elizalde et al., 2019).

1.1.7. Compuestos fitoquímicos en andamios

Los materiales compuestos, específicamente aquellos para aplicaciones terapéuticas, tienen la ventaja de incrementar significativamente las propiedades individuales de cada componente en el material resultante. Mientras los andamios pueden ayudar a la regeneración de tejidos, debido a que actúan como templetas que facilitan la proliferación de células, el incorporar compuestos naturales los cuales exhiben efectos benéficos como actividad antimicrobiana, propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, podría dar como resultado un material compuesto que sea una alternativa viable, encaminada al mejoramiento de la cicatrización (Rubio-Elizalde et al., 2019).

Investigaciones dirigidas al desarrollo de andamios porosos en los cuales se han incorporado extractos o compuestos naturales, han reportado que estos promueven el proceso de cicatrización. Un estudio, enfocado en la fabricación de andamios de colágeno a los que se les incorporó curcumina, mostró resultados favorables al ser colocados en la superficie de heridas, en un ensayo *in vivo* realizado en un modelo murino. Los resultados mostraron disminución del diámetro de la herida, la proliferación celular del sitio lesionado aumentó y además mostraron que había mejor remoción de radicales libres, en comparación con aquellos andamios que no contenían curcumina en su formulación (Gopinath et al.,

2004). En otro trabajo basado en el estudio de 30 pacientes diabéticos que presentaban infecciones en heridas crónicas de pie, los cuales fueron tratados con apósitos formulados con miel, la cicatrización completa del sitio lesionado se mostró en el 43.3% de los pacientes, mientras que solo el 6.7% de las ulceraciones no respondieron al tratamiento (Moghazy et al., 2010). Se ha mostrado en hidrogeles formulados a partir de la combinación de curcumina y plata, el efecto de inhibición de crecimiento de *Escherichia coli*, en comparación con hidrogeles que no contienen curcumina (Varaprasad et al., 2011).

Actualmente, la formulación e investigación de materiales compuestos biocompatibles, para su aplicación en cicatrización de heridas se enfoca en obtener el mejor desempeño de estos cuando son aplicados en sistemas biológicos, por lo que su capacidad de absorción, flexibilidad, propiedades fisicoquímicas y biológicas son ampliamente evaluadas para aprovechar sus ventajas.

Por lo tanto, en este proyecto se propuso desarrollar y evaluar la efectividad de materiales compuestos en forma de andamios de colágeno-HEMA/PEGMA, conteniendo extractos acuosos con compuestos fitoquímicos obtenidos a partir de plantas con efectos medicinales para ayudar a mejorar la cicatrización de heridas.

1.2. Justificación

En la actualidad, existe el reto de diseñar y fabricar estructuras que faciliten la cicatrización. La necesidad de terapias o agentes con esta característica ha aumentado significativamente, debido al incremento de personas que han sido diagnosticadas con enfermedades metabólicas (diabetes, obesidad, hipertensión) así como enfermedades autoinmunes. Estos padecimientos y sus complicaciones (amputaciones, infecciones, sepsis, etc.) han contribuido al aumento en el número de pacientes con heridas en tejidos blandos a nivel mundial.

Es importante diseñar y crear sistemas que mimeticen las interacciones que ocurren en un sistema *in vivo*. Debido a las propiedades biológicas que exhibe el colágeno, la creación de un andamio basado en este polímero pudiera promover estas interacciones como si se tratara de un tejido nativo; y mediante la inclusión de HEMA/PEGMA, algunas de sus desventajas físicas pudieran ser controladas. Además, la incorporación de extractos de plantas con efectos medicinales, ayudarían a mejorar la cicatrización de

heridas, debido a los efectos inherentes antioxidantes, antiinflamatorios y antimicrobianos contenidos en ellos.

1.3. Hipótesis

Los materiales a base de colágeno-HEMA-PEGMA-compuestos fitoquímicos, tendrán propiedades estructurales y fisicoquímicas tales como porosidad y absorción de agua respectivamente, así como propiedades biológicas tales como actividad antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana, para ayudar a mejorar la cicatrización de heridas.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Desarrollar y evaluar, *in vitro*, andamios a base de colágeno-HEMA/PEGMA-compuestos fitoquímicos extraídos de plantas medicinales.

1.4.2. Objetivos específicos

- Seleccionar la(s) planta(s) que se utilizarán como componentes de los andamios a base de colágeno.
- Fabricar andamios porosos utilizando colágeno-HEMA-PEGMA-compuestos fitoquímicos a partir de la(s) planta(s) seleccionada(s).
- Evaluar la microestructura de los andamios obtenidos por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM).

- Evaluar las propiedades fisicoquímicas (capacidad de absorción de agua y estabilidad en medio acuoso) de los materiales obtenidos.
- Determinar las propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes, así como la biocompatibilidad de los andamios obtenidos.

Capítulo 2. Metodología

2.1. Materiales

Para este trabajo se utilizaron cuatro especies de plantas: *Aloe vera*, *Moringa oleifera*, *Hamamelis virginiana* y *Calendula officinalis*. Las hojas de *A. vera* se colectaron de un vivero en Ecoparque-El Colegio de la Frontera Norte, en donde sus plantas se cultivan sin la utilización de compuestos químicos que pudiesen ser nocivos para el consumo o utilización con fines terapéuticos. Las hojas pulverizadas de *M. oleifera*, *H. virginiana* y *C. officinalis*, se obtuvieron de un distribuidor comercial especializado, Stevia San Martín, con certificación de venta de productos orgánicos por parte de Agricert México (Agricert., 2016).

Los reactivos colágeno bovino tipo I, metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), metil éter metacrilato de polietilenglicol (PEGMA) Mn~500, dimetilacrilato de etilenglicol (EGDMA), persulfato de amonio (APS), ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfónico) (ABTS), 6- hidroxí-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox), nitroprusiato de sodio (SNP), reactivo de Griess, se adquirieron de Sigma-Aldrich. Los fibroblastos dérmicos humanos de la línea CCD-1112Sk (ATCC CRL-2429), y las especies bacterianas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Escherichia coli* (ATCC 25922), fueron obtenidas de *American Type Culture Collection*, (ATCC).

2.2. Preparación de extractos acuosos

Se realizaron extracciones acuosas de las cuatro plantas utilizadas en este trabajo. La finalidad de obtener extractos de este tipo es que, debido a que son totalmente solubles en agua, se permitirá que la distribución del extracto a través de nuestra matriz polimérica sea facilitada. Para extraer el gel de *A. vera*, las hojas se cortaron a la mitad y se colectó el gel interno de estas, drenando el líquido durante toda la noche, a 4 °C. El gel obtenido se congeló a -80 °C y se liofilizó para concentrarlo. En el caso de *M. oleifera*, *H. virginiana* y *C. officinalis*, las hojas secas de estas plantas fueron trituradas, cada una por separado. En una investigación conducida por Rubio-Elizalde et al. (2019), se demostró, con base en los resultados obtenidos a partir de un análisis metabolómico realizado a andamios constituidos de alginato-*A. vera* y *M. oleifera*, la presencia de derivados de quercetina y kaempferol, así como ácido clorogénico (Rubio-Elizalde et al., 2019), compuestos reportados previamente en extractos de *M. oleifera* (Bennett et al., 2003;

Brahma et al., 2009; Chin et al., 2018). Por lo anterior, siguiendo la metodología descrita por Rubio-Elizalde et al., 2019, se agregaron 25 g de hojas pulverizadas a un vaso de precipitado conteniendo 250 ml de agua destilada a 75 °C, y se dejaron en contacto durante 5 min (Rubio-Elizalde et al., 2019). Posteriormente, la solución resultante se filtró dos veces (tamaño de poro de 20 µm), y se centrifugó a 42,336 g por 10 minutos, a 4 °C. Se realizó una tercera filtración, utilizando filtros de papel con tamaño de poro de 0.2 µm (Whatman®). Todo el proceso de extracción fue llevado a cabo protegido de la luz, para ayudar a preservar a todos aquellos posibles compuestos fotosensibles extraídos. Los extractos acuosos se congelaron a -80 °C y posteriormente se liofilizaron para concentrarlos y conservarlos. Cada extracción y liofilización se realizó por separado. Los recipientes con los extractos liofilizados se guardaron a 4 °C hasta su utilización.

2.3. Caracterización de los extractos

Para evaluar a los extractos con respecto a su capacidad antimicrobiana, antiinflamatoria y antioxidante, se realizaron soluciones de cada uno a una concentración final de 0.5, 1.0 y 2.0% (m/v) en agua destilada estéril, en tubos protegidos de la luz. Los extractos de las plantas con mejores resultados fueron seleccionados para formar parte de la formulación de los andamios de colágeno-HEMA/PEGMA-compuestos fitoquímicos.

2.3.1. Actividad antimicrobiana

El ensayo de actividad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión de disco en agar. Este método consiste en preparar una doble capa de agar, una capa base sólida y una capa líquida, la cual contiene un inóculo de bacterias, es decir una cepa bacteriana a una concentración conocida, que es vertida sobre la anterior con el fin de obtener un crecimiento de bacterias uniforme sobre la superficie de la caja Petri, facilitando la observación de los resultados de estos ensayos (Balouiri et al., 2016).

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos y los andamios, fueron seleccionadas bacterias (Gram +/-), que comúnmente están asociadas a infecciones de heridas, tales como *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *K. pneumoniae* (ATCC 13883) y *S. aureus* (ATCC 25923). Debido a la diversidad de las especies de bacterias utilizadas, se optó por utilizar un medio de cultivo que pudiera proveer todos

los requerimientos nutricionales de estas bacterias. El medio seleccionado fue Luria Bertani (LB) (Liu et al., 2018). Se utilizó medio sólido para cultivar las cepas bacterianas y en el caso de la preparación del inóculo, medio líquido. Cada especie bacteriana fue sembrada en cajas Petri de 8.5 cm de diámetro, conteniendo medio LB sólido (20 ml, aproximadamente); las cajas fueron incubadas a 37 °C por periodos de entre 18 y 24 h. Se obtuvieron sensidiscos de papel filtro Whatman® de 6mm de diámetro (Sigma Aldrich cat. WHA2017006), los cuales fueron esterilizados previo a su uso. Las muestras de los diferentes extractos, fueron colocadas en dichos sensidiscos, para posteriormente revisar la inhibición de crecimiento bacteriano en la periferia de estos. Por lo cual, se impregnaron con 30 µl de solución acuosa al 0.5, 1.0 y 2.0% (m/v) de cada uno de los extractos de plantas obtenidos. Se dejaron secar en una campana de extracción, para evitar su contaminación, entre 3 a 5 h a temperatura ambiente. Después de este periodo de tiempo, se verificó que la solución aplicada a los sensidiscos estuviera totalmente embebida en ellos y que estos estuvieran completamente secos, al examinar que no hubiera remanentes de las soluciones en la periferia de los sensidiscos.

Los inóculos bacterianos de cada una de las especies utilizadas se obtuvieron siguiendo la metodología descrita por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, CLSI por sus siglas en inglés (CLSI, 2012). Se transfirieron 1-2 colonias frescas de 24 h de incubación de las cepas bacterianas *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *K. pneumoniae* (ATCC 13883) y *S. aureus* (ATCC 25923), asépticamente y por separado, a tubos estériles conteniendo 3 ml de medio LB. Posteriormente, las colonias se disgregaron por un periodo de 2-3 min. Se dejaron reposar por aproximadamente 15 min. Una vez obtenida una solución homogénea, se ajustó su turbidez a 0.08-0.12 mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm (Biorad SmartSpect™ 3000), la cual nos permite sugerir una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 CFU/ml, según resultados obtenidos y publicados por la institución (CLSI, 2012).

Para realizar los ensayos correspondientes a cada una de las diferentes cepas bacterianas, se elevó la temperatura de alícuotas de 100 ml de medio LB, hasta obtener una consistencia líquida en el medio. Posteriormente, se hicieron los cálculos pertinentes para obtener un volumen de inóculo que aportara alrededor de 1×10^6 UFC/mL en 100 ml. Es importante señalar que la temperatura del medio de cultivo al agregar el inóculo debe ser entre 37-41 °C, ya que, si está elevada puede inhibir el crecimiento bacteriano, y si esta se ve disminuida el medio de cultivo comienza a gelificarse, lo que da como resultado una capa no homogénea y los resultados pueden ser afectados. Para analizar cada una de las plantas, los sensidiscos con soluciones acuosas de extracto de *A. vera*, *M. oleifera*, *H. virginiana* y *C. officinalis* a concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0% (m/v), se colocaron por separado en cajas petri y en cada caso, los experimentos se realizaron por triplicado. Se utilizaron antibióticos de amplio espectro, carbenicilina (100 µg/disco), así

como tetraciclina (30 µg/disco) como controles positivos, y agua estéril (30 µl/disco) como control negativo. El proceso de selección de estos controles se encuentra descrito en el ANEXO 1. Una vez incorporado el inóculo al medio fundido, se mezcló para que este se dispersara de manera homogénea. Se vertieron aproximadamente 7-8 ml de esta mezcla (medio LB-inóculo), en el centro de cada una de las cajas conteniendo los sensidiscos, con la finalidad de que esta se difundiera por toda la superficie, formando una capa delgada y homogénea por toda ella. Posteriormente se dejó solidificar en una campana de extracción, por aproximadamente 15-20 min y se colocaron en una incubadora a 37 °C por 10-12 h.

2.3.2. Actividad antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria se analizó con base en la capacidad de remoción de óxido nítrico (NO), donado por nitroprusiato de sodio. El NO se cuantificó con el reactivo *Griess*, a 540 nm.

En una placa de 96 pozos se agregaron 80 µl de SNP (2.5 mM), se mezclaron con 20 µl de muestra y se incubaron en contacto de la luz, a 22 °C. Después de 1 h, se agregaron 100 µl de reactivo de Griess (1X) a cada una de las muestras, y se incubaron durante 15 min, a 22 °C y protegidos de la luz. Se leyó la absorbancia a 540 nm (Lector de placas Epoch, BioTek). La remoción del NO se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Remoción de NO, \%} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100 \quad (1)$$

donde $\text{Abs}_{\text{control}}$ es la absorbancia del reactivo de Griess y SNP, $\text{Abs}_{\text{muestra}}$ es la absorbancia del reactivo de Griess, el SNP y la muestra. El ensayo se llevó a cabo por cuadruplicado.

2.3.3. Actividad antioxidante

La generación del radical $\text{ABTS}^{*\cdot}$ constituye la base de uno de los métodos espectrofotométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total, de soluciones o sustancias puras. El ensayo original de $\text{ABTS}^{*\cdot}$ estaba basado en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir un radical catión, en presencia o ausencia de antioxidantes. Un formato

más apropiado para el ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes (Re et al., 1999).

La técnica mejorada para la generación del catión ABTS, implica la producción directa del cromóforo ABTS verde-azul a través de la reacción entre ABTS y persulfato de potasio. Este compuesto presenta una absorción máxima a diferentes longitudes de onda a 645 nm, 734 nm y 815 nm las cuales han sido reportadas previamente en la bibliografía (Miller et al., 1993).

Siguiendo este procedimiento, se generó el radical ABTS^{•+} para después ponerse en contacto con los extractos y así, determinar la capacidad antioxidante de estos. El radical ABTS^{•+} se preparó en agua destilada y se ajustó su absorbancia a 0.7 (± 0.02) según el método descrito por Re et al. (1999). Para analizar los extractos acuosos de las diferentes plantas utilizadas, 50 µl de las soluciones se transfirieron a una placa de 96 pozos y se mezclaron con un volumen de 150 µl de ABTS^{•+}, e incubados por 6 minutos a 22 °C, protegidos de la luz. Se leyó la absorbancia a 734 nm (Lector de placas Epoch, BioTek). El porcentaje de inhibición de la absorbancia a 734 nm se calculó utilizando la fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100 \quad (2)$$

donde: $\text{Abs}_{\text{control}}$ y $\text{Abs}_{\text{muestra}}$ son valores de absorbancia del control y la muestra a los 6 minutos, respectivamente, utilizando como control la absorbancia del ABTS^{•+} con agua destilada, el ensayo se realizó por cuadruplicado.

Se realizó una curva de calibración utilizando una solución de Trolox a diferentes concentraciones (0–100 nmol/ml) disuelto en etanol absoluto, a un tiempo de reacción de 6 min. Es así como la actividad antioxidante de los extractos acuosos de las plantas evaluadas se expresó en nmol de Trolox equivalentes a capacidad antioxidante (TEAC) por cada 1 mg de extracto.

2.4. Fabricación de andamios Colágeno-HEMA/PEGMA-Compuestos fitoquímicos

2.4.1. Preparación de solución de colágeno

Para obtener la matriz polimérica inicial se utilizó colágeno bovino, tipo I y se preparó una solución a una concentración de 10 mg/ml siguiendo las instrucciones del proveedor. El colágeno (1 g de fibras) se hidrató en 50 ml de agua destilada fría (50% del volumen final), y se mezcló por 15 min a 300 rpm, con un agitador magnético. Posteriormente, se agregaron 50 ml de HCl 0.02 M a 4 °C a la suspensión y se continuó mezclando con agitador magnético durante 10 min. La solución obtenida se homogenizó con una licuadora de mano a alta velocidad, por 15 min aproximadamente. Para remover las burbujas resultantes, la mezcla se transfirió a tubos cónicos de 50 ml, en alícuotas de 20-25 ml, y se centrifugó (Centrífuga Multifuge 1 S-R, Heraeus) por periodos de 2 min a 4000 rpm, hasta no encontrar burbujas. Se obtuvo una solución viscosa, incolora y con un pH entre 2 y 3, la cual se almacenó a 4 °C hasta su utilización.

Los extractos que presentaron actividad antimicrobiana contra dos de las diferentes cepas bacterianas utilizadas en este trabajo, *S. aureus* y *K. pneumoniae*, fueron utilizados para formular los diferentes tipos de andamios (datos descritos más adelante en la sección de resultados). Por lo tanto, se fabricaron cuatro tipos de andamios, todos a base de colágeno a una concentración de 10 mg/ml, (definido de aquí en adelante como Col.), e incorporando o suprimiendo la incorporación de HEMA/PEGMA al 2% (v/v), (definido de aquí en adelante como H.P. 2%) y extracto acuoso de *M. oleifera*, (definido de aquí en adelante como M.O.).

2.4.2. Preparación de andamios

La reacción entre HEMA/PEGMA para preparar los andamios, se realizó en base a la metodología descrita por Castro-Ceseña et al. (2016), con las siguientes modificaciones: para una concentración final de 2% v/v, tanto de HEMA como de PEGMA en la solución de colágeno a 10 mg/ml, se agregó gota a gota HEMA a una mezcla de PEGMA-colágeno, mientras se mantuvo agitación constante. Se agregó dimetilacrilato de etilenglicol (EGDMA) (4% mol con respecto a HEMA) como entrecruzante. La polimerización comenzó al agregar el iniciador térmico persulfato de amonio (APS) (0.5% mol con respecto a HEMA). La reacción se llevó a cabo a 50 °C y protegida de la luz y concluyó al cabo de 110 min, al colocar el recipiente de reacción en un baño de hielo hasta alcanzar temperatura ambiente (Castro-Ceseña et al., 2016). La mezcla

colágeno, HEMA y PEGMA (definida como Col./HP, de aquí en adelante) se utilizó para preparar andamios con y sin extracto de *M. oleifera* al 2% (m/v), para obtener andamios que se denominaron como: Col./H.P. 2% y Col./H.P. 2%/M.O. 2%, respectivamente. Para conocer el efecto del HEMA y del PEGMA en los materiales, también se prepararon andamios utilizando solo colágeno, es decir sin adicionar HEMA o PEGMA, con y sin *M. oleifera* al 2% (m/v), denominados como: Col. y Col./M.O. 2%, respectivamente. Una vez preparadas cada una de las soluciones, se depositaron 300 μ l de la respectiva solución en placas de poliestireno de 48 pozos. Se congelaron durante 20 h a -80 °C y se liofilizaron (Labconco FreeZone 1) durante 24 h.

Al finalizar, los andamios obtenidos se desmoldaron y se colocaron en charolas de aluminio y posteriormente fueron sometidos a un proceso de entrecruzamiento por deshidratación por calor. Este procedimiento, consiste en la remoción de agua desde proteínas para formar un entrecruzamiento como resultado de una reacción de condensación, por lo que se requiere una elevación de la temperatura igual o mayor a 100 °C (Castro-Ceseña et al., 2016). Por lo tanto, se evaluaron diferentes temperaturas de entrecruzamiento (100 , 110 , 120 , 130 y 140 °C), durante diferentes periodos (1 , 3 , 6 , 9 , 12 y 24 h), para determinar si se afectaba la capacidad antimicrobiana del extracto acuoso incorporado a los andamios, por efecto de la elevación de la temperatura. Estos experimentos se describen con mayor detalle en el ANEXO 2. A partir de los resultados obtenidos por estos experimentos, se determinó que las condiciones idóneas de entrecruzamiento para los andamios formulado en este trabajo, es una temperatura a 100 °C y 88 kPa (vacío), durante un periodo de 1 h (Fig. 3).

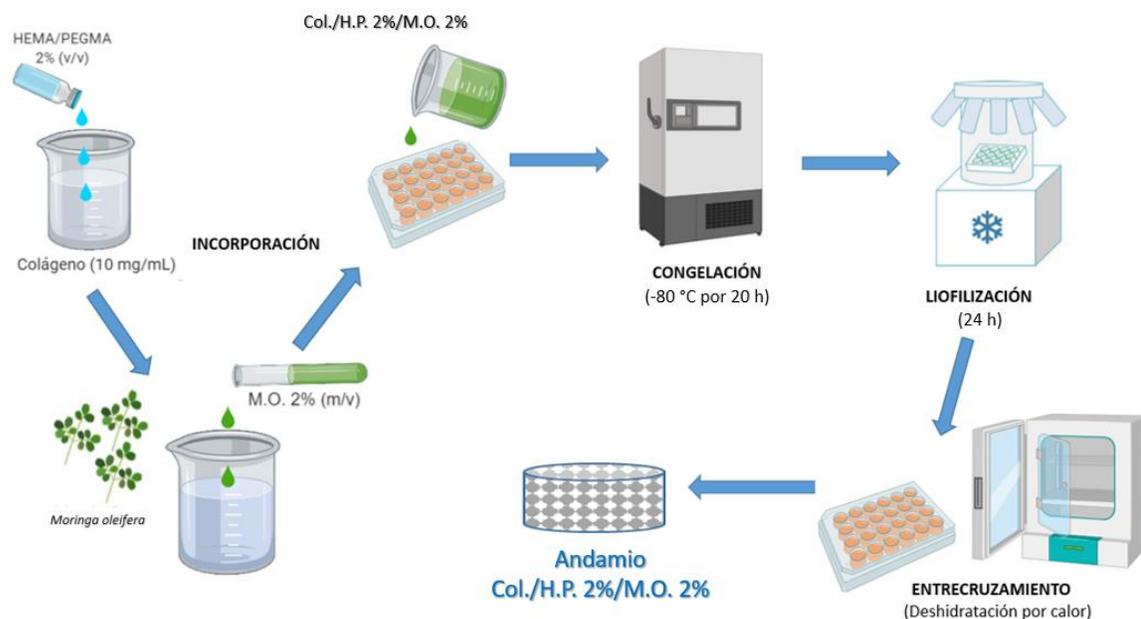


Fig. 3. Proceso de elaboración de andamios constituidos colágeno/H.P. 2%/M.O. 2%. Colágeno (10 mg/ml); H.P. (HEMA-PEGMA); M.O. (*Moringa oleifera*).

2.5. Caracterización de los andamios Colágeno-HEMA/PEGMA-Compuestos fitoquímicos.

2.5.1. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los andamios obtenidos se evaluó mediante el método de difusión de disco en agar, previamente descrito en esta metodología (sección 2.3.1), con las siguientes modificaciones:

Los andamios, Col., Col./M.O. 2%, Col./H.P. 2% y Col./H.P. 2%/ M.O. 2%, fueron colocados (por triplicado) en cajas Petri conteniendo agar LB, posteriormente se agregaron 10 ml de medio LB conteniendo 1×10^6 UFC/mL de bacterias (*S. aureus* o *K. pneumoniae*, según fuera el caso), en el centro de cada una de las cajas conteniendo los andamios, para que se difundiera de manera uniforme. Se utilizó un apósito comercial de alginato (Sterile antimicrobial silver alginate dressing, CVS Health) como control positivo, ya que es un material comercial que es utilizado para promover la cicatrización de heridas, debido a que presenta actividad antimicrobiana, asociada a la incorporación de plata en su formulación. Cabe destacar que este apósito se empleó con la finalidad de evaluar la efectividad de los procedimientos realizados en estos experimentos, ya que, debido a las diferencias entre las formulaciones de alginato y colágeno de los andamios, estos no pueden ser comparados entre sí. La actividad antimicrobiana se evaluó comparando los diámetros de las zonas de inhibición presentadas por los diferentes tipos de andamios.

2.5.2. Actividad antiinflamatoria relativa a remoción de NO

La actividad antiinflamatoria se determinó de igual manera a la descrita en la sección 2.3.2. de esta metodología, con las siguientes modificaciones: cada formulación de andamio (por triplicado), se sumergió en 2 ml de agua destilada, la cual se cambió cada 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 8 y 24 h y una vez transcurridos estos periodos de tiempo, se almacenó a 4 °C para determinar la capacidad de remoción de NO de los compuestos liberados de los andamios. Se tomaron 33.6 µl de muestra y se mezclaron con 66.4 µl de SNP (2.5 mM) y se incubaron a 22 °C. Al cabo de 60 min se agregaron 100 µl de reactivo de Griess 1X, la reacción se incubó durante 15 min y se leyó la absorbancia a 517 nm.

2.5.3. Actividad antioxidante

Para determinar la capacidad antioxidante de los andamios, las alícuotas de liberación obtenidas a diferentes tiempos (sección 2.5.2.), fueron utilizadas como muestra para medir la capacidad de los compuestos liberados de los andamios. Se generó el radical ABTS^{•+} y se puso en contacto con las alícuotas de liberación siguiendo la metodología descrita en la sección 2.3.3. Cada uno de los ensayos de actividad antioxidante se realizó por triplicado, para cada una de las formulaciones de andamios elaborados.

2.6. Microestructura de los andamios

La microestructura de los andamios se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), usando un microscopio EVO/MA15 ZEISS a un voltaje de 15kV, bajo condiciones de presión variable.

2.7. Caracterización biológica y fisicoquímica de andamios Colágeno-HEMA/PEGMA-Compuestos fitoquímicos.

2.7.1. Inhibición de la actividad de elastasa

Para este experimento se utilizó elastasa de páncreas porcino (PPE) en presencia de las alícuotas de liberación anteriormente obtenidas. Se mezclaron 40 µl de buffer Tris-HCl (100 mM pH 8.0), 20 µl de SucAla3-pNA (1.33 mg / ml) como sustrato, 30 µl de muestra y 10 µl de elastasa (0.23 U /ml) se agregaron a una placa de 96 pozos y se registró el aumento de la absorbancia a 410 nm, correspondiente a la formación de p-nitroanilina, durante 20 min a intervalos de 1 min cada uno. Se obtuvo la pendiente para cada grupo de muestras. La actividad de inhibición de elastasa se calculó en base a las pendientes obtenidas, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición de actividad elastasa (\%)} = \frac{\text{Velocidad inicial}_{\text{control}} - \text{Velocidad inicial}_{\text{muestra}}}{\text{Velocidad inicial}_{\text{control}}} \times 100 \quad (3)$$

Donde Velocidad inicial _{Control} representa la densidad óptica en ausencia de la muestra y velocidad inicial _{Muestra} representa la densidad óptica en presencia de la muestra (Wittenauer et al., 2015). Posteriormente se obtuvo el porcentaje de actividad de elastasa. Se analizó un conjunto de muestras por triplicado para cada una de las formulaciones de andamios, y se realizó un control positivo utilizando agua destilada, para comparar la actividad de la enzima sin la presencia de un inhibidor.

2.7.2. Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó mediante ensayo colorimétrico del (3-[4,5, dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio) (MTS). La línea celular CCD- 1112 Sk (ATCC) de fibroblastos de prepucio de neonato fue utilizada para este ensayo. Se utilizó el medio de cultivo Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % y antibiótico/antimicótico al 1 %. Los ensayos se realizaron entre los pases 9-12 para garantizar que las células presentaran la morfología y fisiología adecuada. Se activaron y cultivaron en una placa de 150 mm, y su mantenimiento se realizó a 37 °C, CO₂ al 5% y con cambio de medio cada 48 h. Se mantuvieron bajo estas condiciones hasta obtener una confluencia del 80-90%, siguiendo las especificaciones recomendadas por el proveedor. A los días 6-7 de cultivo alcanzaron la confluencia requerida y se subcultivaron en relación 1:4.

En placas de 48 pozos para cultivo celular (Corning Inc. costar, EE. UU.), se colocaron, por triplicado, los andamios de las diferentes formulaciones en presencia de los fibroblastos y se realizó un ensayo de proliferación celular; se sembraron un total 200 000 células/pozo. Los andamios-células fueron incubados durante periodos de 3, 6 y 10 días, en condiciones estándar y con cambio de medio cada tres días. Después de estos periodos, se retiró el medio y se agregaron 100 µl de tripsina en el centro de cada andamio, y se incubaron entre 3-5 min. Posteriormente se agregaron 300 µl de medio completo para inactivar esta enzima. El volumen total obtenido, con las células recuperadas, se transfirieron a tubos de 1.5 ml y se centrifugaron a 800 g por 5 min. Se retiró el sobrenadante cuidadosamente, y las células se resuspendieron en 100 µl de medio completo; posteriormente se colocaron en placas de 96 pozos para cultivo celular (Corning Inc. costar, EE. UU.). Se añadieron 20 µl de solución MTS y se incubaron por 3 h a 37 °C y CO₂ al 5%. Luego de este periodo, se leyó la densidad óptica a 490 nm en un espectrofotómetro (Lector de placas Epoch, BioTek), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La viabilidad celular se expresó como la absorbancia a 450 nm de las muestras remanentes después de los diferentes periodos de incubación.

2.7.3. Capacidad de absorción de agua

Un triplicado de cada una de las formulaciones de andamios, fueron pesados usando una balanza analítica. Posteriormente se sumergieron con 1 ml de PBS 1X (pH 7.4) durante 15, 30, 60, 90, 120 y 150 min a 37 °C. Posteriormente, se retiró el exceso de líquido y las muestras impregnadas fueron pesadas nuevamente. La capacidad de absorción de agua a cada tiempo de contacto y para cada andamio se calculó usando la ecuación:

$$\text{Absorción de agua, \%} = \frac{M_t - M_0}{M_0} \times 100 \quad (4)$$

donde M_t es la masa del andamio después de cada tiempo evaluado y M_0 es la masa inicial del andamio (Rubio-Elizalde et al., 2019).

2.7.4. Estabilidad en medio acuoso

Andamios de cada una de las formulaciones obtenidas, fueron sumergidos en PBS 1X (pH 7.4) por triplicado, durante periodos de 1, 3, 6, 9 y 15 días. Previamente cada uno de ellos fue pesado usando una balanza analítica. Los triplicados de cada grupo fueron removidos de la solución de buffer, y lavados con un exceso de agua para remover las sales remanentes de la solución de buffer. Posteriormente las muestras se liofilizaron y nuevamente se pesaron. Los resultados se basaron en la relación entre las mediciones iniciales y posteriores a la inmersión en PBS 1X (Hedberg et al., 2005; Rubio-Elizalde et al., 2019).

2.8 Análisis estadístico de los datos.

Resultados de actividad antimicrobiana, capacidad de remoción de NO, referente a la actividad antiinflamatoria, así como actividad antioxidante, tanto de extractos como andamios, fueron analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Las diferencias entre resultados se consideraron estadísticamente significativas por $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el

software GraphPad Prism 7.0. Se utilizaron tres especímenes de cada formulación de andamios para realizar dichas evaluaciones.

Capítulo 3. Resultados

3.1. Evaluación *in vitro* de extractos acuosos

3.1.1. Actividad antimicrobiana

Ensayos frente a bacterias Gram positivas. En los ensayos realizados frente a *S. aureus*, los extractos de plantas no presentaron actividad antimicrobiana frente a esta bacteria, con excepción del extracto de *M. oleifera* a una concentración de 2%. El halo de inhibición obtenido fue de aproximadamente 9-10 mm, después de 12 h de incubación a 37 °C (Fig. 4).

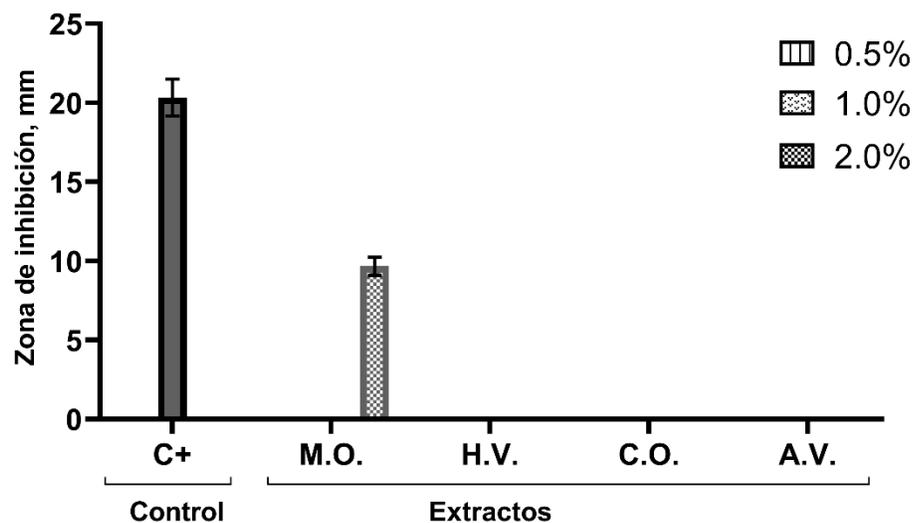


Fig.4. Actividad antimicrobiana de extractos acuosos de plantas, a concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0% (m/v), después de 12 h de incubación 37 °C, frente a *S. aureus*. Ensayo realizado por el método de difusión de disco en agar. Control positivo (C+) carbenicilina (100 µg). M.O. (*Moringa oleifera*), H.V. (*Hamamelis virginiana*), C.O. (*Calendula officinalis*), A.V. (*Aloe vera*). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3).

Ensayos frente a bacterias Gram negativas. En el presente proyecto seleccionamos tres cepas de bacterias Gram negativas: *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, las cuales se encuentran asociadas a infecciones de heridas. Por lo que se realizaron ensayos para conocer si los extractos de plantas obtenidos presentaban actividad antimicrobiana, frente a estas bacterias.

M. oleifera solo mostró actividad contra *K. pneumoniae*. Se inhibió el crecimiento de esta bacteria al colocar discos Whatman® de 6 mm impregnados de soluciones a concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0% (m/v) de este extracto, después de 10 h de incubación (Fig. 5a). Los halos de inhibición oscilaron entre 11-16 mm, aumentado de diámetro conforme aumentó la concentración del extracto contenido en el disco (Fig. 5b).

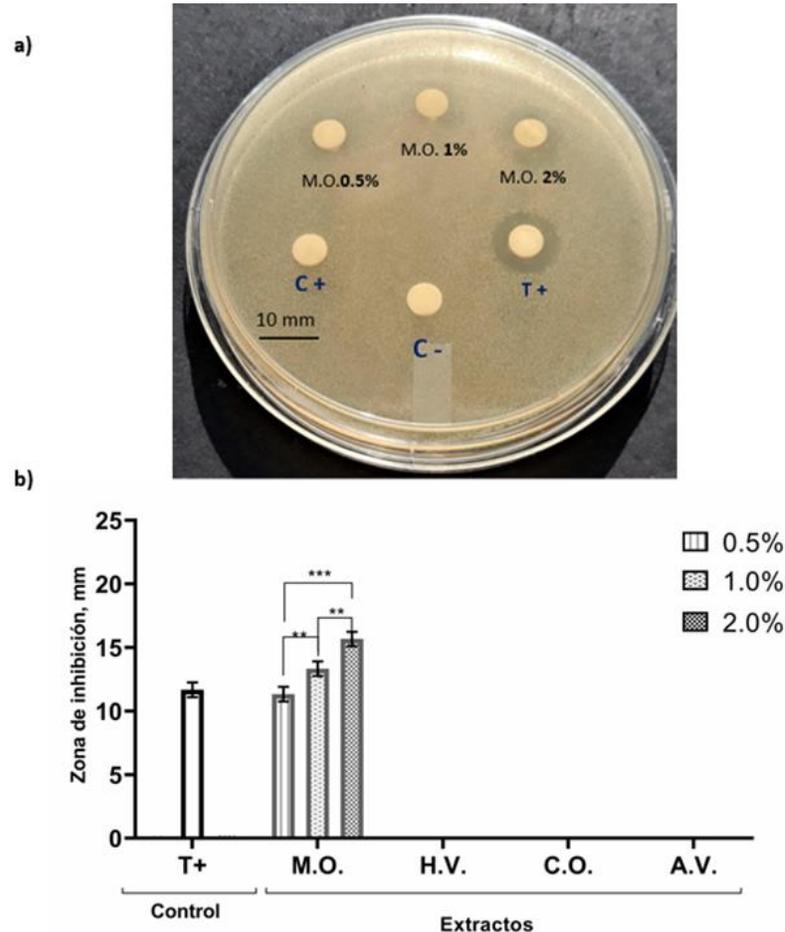


Fig.5. Actividad antimicrobiana de extractos acuosos de plantas, a concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0% (m/v) después de 10 h de incubación a 37 °C, frente a *Klebsiella pneumoniae*. a) Fotografía donde se observan las zonas de inhibición mostradas por el extracto de *M. oleifera*; b) Gráfica donde se muestran los resultados de dicho ensayo, realizado por el método de difusión de disco en agar. Control positivo tetraciclina (30 µg) así como también carbenicilina (100 µg). M.O. (*Moringa oleifera*), T+ (Tetraciclina), C+ (Carbenicilina), C- (control negativo). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Los niveles de significancia están dados como ** (p < 0.01) y *** (p < 0.001).

En el caso de los ensayos realizados con *P. aeruginosa* y *E. coli*, ninguno de los extractos mostró actividad antimicrobiana. Cabe mencionar que todos los extractos acuosos obtenidos de *A. vera*, *M. oleifera*, *H. virginiana*, y *C. officinalis*, fueron evaluados en presencia de estas bacterias (Fig.6 y 7).

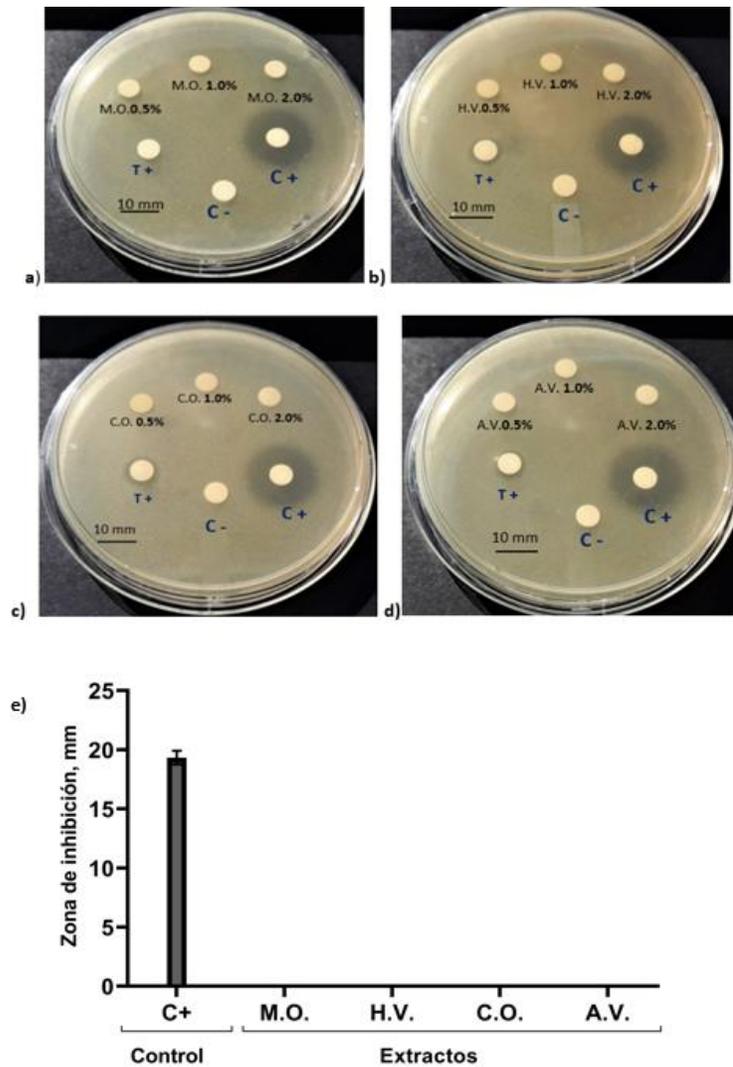


Fig. 6. Actividad antimicrobiana de extractos acuosos de plantas, frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Los extractos a) M.O. (*Moringa oleifera*), b) H.V. (*Hamamelis virginiana*), c) C.O. (*Calendula officinalis*), d) A.V. (*Aloe vera*), no mostraron actividad antimicrobiana contra esta bacteria, a concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0% (m/v) después de 12 h de incubación a 37 °C. e) Gráfica donde se muestran los resultados de dicho ensayo, realizado por el método de difusión de disco en agar. Control positivo carbenicilina (100 µg) así como también tetraciclina (30 µg). C+ (Carbenicilina), T+ (Tetraciclina), C- (control negativo). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3).

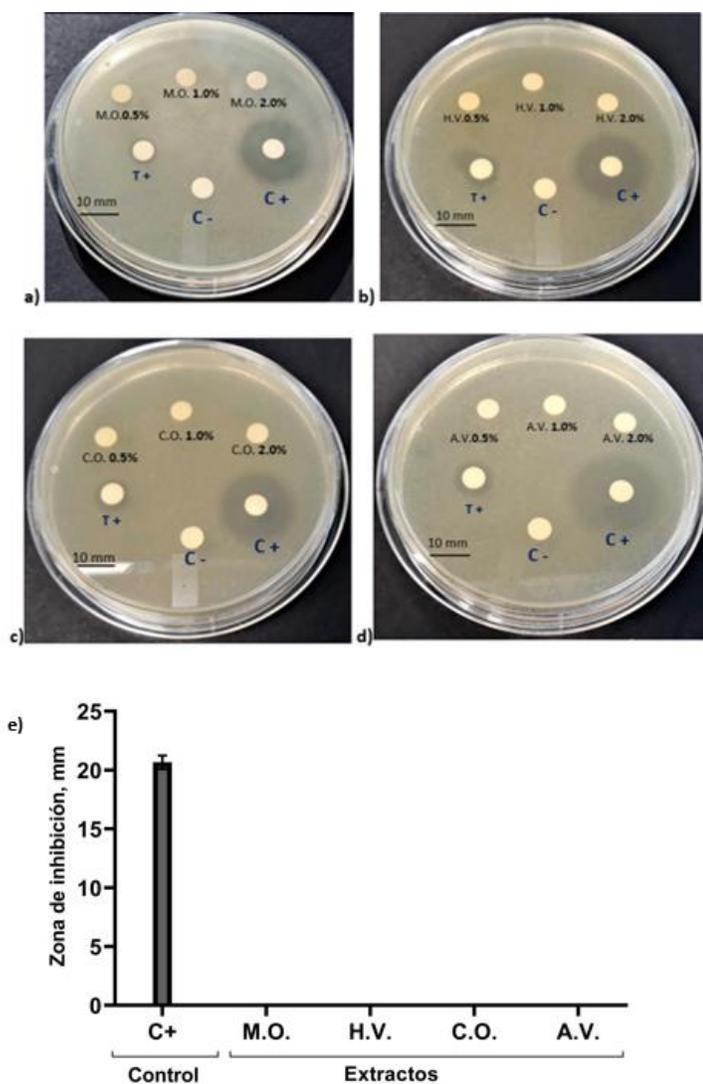


Fig. 7. Actividad antimicrobiana de extractos acuosos de plantas, frente a *E. coli*. Los extractos a) M.O. (*Moringa oleifera*), b) H.V. (*Hamamelis virginiana*), c) C.O. (*Calendula officinalis*), d) A.V. (*Aloe vera*), no mostraron actividad antimicrobiana contra esta bacteria, a concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0% (m/v) después de 12 h de incubación a 37 °C. e) Gráfica donde se muestran los resultados de dicho ensayo, realizado por el método de difusión de disco en agar. Control positivo carbenicilina (100 µg) así como también tetraciclina (30 µg). C+ (Carbenicilina), T+ (Tetraciclina), C- (control negativo). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3).

En resumen, de los extractos evaluados frente a las bacterias Gram (-), el extracto de *M. oleifera* mostró tener efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de *K. pneumoniae*. Lo anterior basado en la formación de un halo de inhibición, después de 10 h de incubación a 37 °C, alrededor de discos Whatman® impregnados con soluciones al 0.5, 1.0 y 2.0% (m/v), de este extracto.

En el caso de *S. aureus*, cepa utilizada para evaluar a las bacterias Gram (+), el extracto de *M. oleifera* mostró actividad antimicrobiana al ser utilizado a una concentración de 2.0 % (m/v). El halo de inhibición se observó después de incubar la caja conteniendo el disco por 12 h, a 37 °C. Los extractos de *Aloe vera*, *Calendula officinalis* y *Hamamelis virginiana*, no presentaron actividad antimicrobiana sobre las bacterias utilizadas en este ensayo, bajo las condiciones antes descritas.

3.1.2. Actividad antiinflamatoria

Cada uno de los extractos fue evaluado a concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0% (m/v), con respecto a su capacidad de remoción de NO. Los resultados de este ensayo se presentan graficados en la Fig. 8.

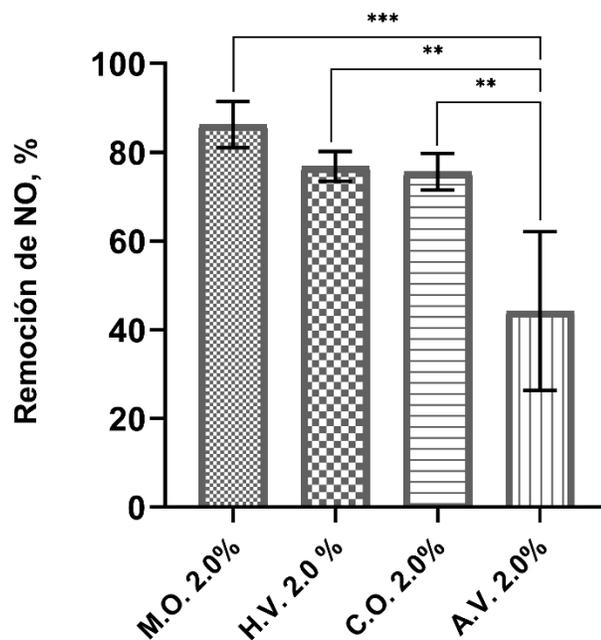


Fig. 8. Comparación de remoción de NO de extractos acuosos de plantas, a concentraciones de 2.0% (m/v). M.O. (*Moringa oleifera*), H.V. (*Hamamelis virginiana*), C.O. (*Calendula officinalis*), A.V. (*Aloe vera*). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=4). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Los niveles de significancia están dados como* ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

La mayoría de los extractos, con excepción de *Aloe vera*, presentaron un porcentaje de remoción de NO superiores al 60%. *Moringa oleifera* y *Calendula officinalis*, en general presentaron los porcentajes más altos de remoción de NO, 86.23 % y 75.56 % respectivamente, a una concentración de 2.0 % (m/v). Sin embargo, su capacidad no aumentó de manera lineal conforme la concentración del extracto aumentó. En el caso de *Hamamelis virginiana*, la capacidad de remoción de NO alcanzó un 76.82% a concentración del 2.0 % (m/v), no obstante, a concentraciones más bajas fue menor en comparación a aquellas presentadas por *M. oleifera* y *C. officinalis*.

El extracto que presentó menor capacidad antioxidante fue *A. vera*, con 44.26 % a una concentración de 2.0 % (m/v). Con base en los resultados poco favorables de estos ensayos y los anteriores con respecto a la actividad antimicrobiana y antioxidante de *A. vera*, decidimos descartar a esta planta como opción para incorporarla a los andamios.

3.1.3. Actividad antioxidante

Inicialmente, la actividad antioxidante de los extractos a concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0% (m/v), serian evaluadas. Sin embargo, al realizar la medición en la concentración de 0.5%, en 3 de los 4 extractos, la actividad antioxidante se mantuvo casi en su totalidad. Por ejemplo, el porcentaje de actividad antioxidante en el caso de los extractos de *Moringa oleifera*, *Hamamelis virginiana* y *Calendula officinalis* se mantuvieron por encima del 95% (99.55%, 100.0% y 98.77%, respectivamente), y en 21.6, 21.7 y 21.6 nmol TEAC/mg de extracto, respectivamente. En el caso de *Aloe vera* el porcentaje de actividad antioxidante fue de 45.29%, a concentración de 0.5% (m/v), correspondiente a 7.527 nmol TEAC/mg de extracto. En la Fig.9. se presentan gráficas con los resultados obtenidos al evaluar la actividad antioxidante de los extractos a 0.5% (m/v).

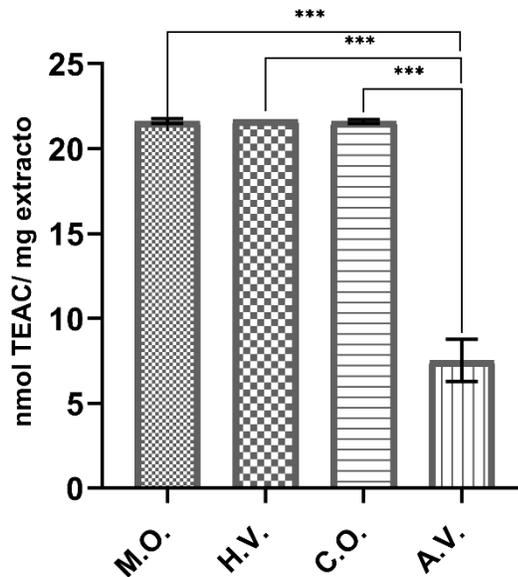


Fig.9. Actividad antioxidante de extractos de plantas, concentración 0.5% (m/v), expresado en nmol Trolox equivalentes a capacidad antioxidante (TEAC) por 1 mg de extracto. M.O. (*Moringa oleifera*), H.V. (*Hamamelis virginiana*), C.O. (*Calendula officinalis*), A.V. (*Aloe vera*). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=4). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Los niveles de significancia están dados como *** ($p < 0.001$).

Dados los resultados obtenidos anteriormente, así como los correspondientes a la capacidad antimicrobiana y antiinflamatoria (apartados 2.2.1 y 2.2.2 de esta sección), no fue necesario evaluar los extractos a las concentraciones mayores que inicialmente se proponían (1.0 y 2.0%), ya que hay concordancia en que a mayor concentración de extracto hay mayor efecto o actividad antimicrobiana y antiinflamatoria.

Debido a que la matriz de colágeno utilizada se encuentra en un medio ácido, se analizaron los extractos bajo esta condición, ya que la actividad antioxidante pudiera afectarse de manera negativa y disminuir por efecto de este medio, al momento de ser incorporado en la elaboración del andamio. Por lo tanto, se disolvieron los extractos en una solución de HCl 0.02 M para acidificar el medio y se prepararon soluciones a una concentración final de extracto de 0.5% (m/v).

No se observaron cambios en la actividad antioxidante de las soluciones realizadas en medio acidificado con respecto a aquellas que se encontraban en solución acuosa, con excepción de la *A. vera*, en donde el extracto en medio acidificado no conservó tanto su actividad antioxidante en comparación al acuoso. En

la Fig.10. se presenta una gráfica comparando los resultados obtenidos al evaluar la actividad antioxidante de los extractos en medio acidificado y acuoso, a concentración final de 0.5% (m/v).

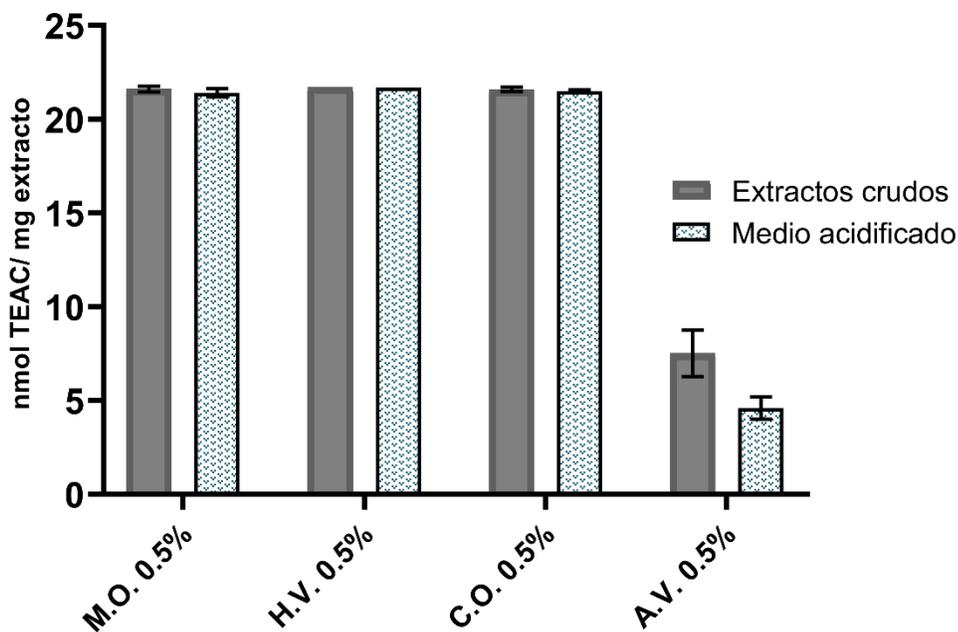


Fig. 10. Efecto del pH en la actividad antioxidante de extractos de plantas, a concentración de 0.5% (m/v), expresado en nmol Trolox equivalentes a capacidad antioxidante (TEAC) por 1 mg de extracto. M.O. (*Moringa oleifera*), H.V. (*Hamamelis virginiana*), C.O. (*Calendula officinalis*), A.V. (*Aloe vera*). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=4).

El porcentaje de actividad antioxidante en el caso de los extractos en medio acidificado de *Moringa oleifera*, *Hamamelis virginiana* y *Calendula officinalis* fueron de 98.66%, 99.89% y 99.08% respectivamente, lo cual corresponde a 21.4, 21.7 y 21.5 nmol TEAC/ mg, respectivamente. En el caso de *Aloe vera* el porcentaje de actividad antioxidante fue de 23.23%, 4.6 nmol TEAC/ mg, a concentración de 0.5% (m/v).

3.2. Elaboración de andamios

Con base en los resultados de los análisis realizados a los diferentes extractos, los andamios se realizaron solo con la incorporación de extracto acuoso de *M. oleifera* a una concentración final de 2% (m/v), ya que es la planta con mayores resultados positivos bajo las condiciones que se plantean en este trabajo. El extracto acuoso de *M. oleifera*, presenta actividad antimicrobiana frente a dos bacterias del grupo que se consideran como colonizadoras de heridas agudas y crónicas: *S. aureus* (Gram (+), a una concentración de 2.0% (m/v), y *K. pneumoniae* (Gram (-), a concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0% (m/v). Además, su actividad antioxidante es mayor a 90%, correspondiente a 21.6 nmol TEAC/mg de extracto, y su actividad antiinflamatoria mayor a 86%, a una concentración de 2.0% (w/v), según los resultados obtenidos en los ensayos realizados.

3.3. Evaluación de la microestructura de andamios por medio de microscopia electrónica de barrido (SEM).

La superficie de los andamios obtenidos (Fig. 11A'-D'), fueron analizadas por medio Microscopia Electrónica de Barrido (SEM). Aunque esta técnica no provee información cuantitativa de la porosidad de un material, aporta datos importantes con respecto a la distribución y tamaño de los poros presentes en el andamio. En todos los materiales analizados, se encontraron poros semiesféricos e interconectados.

En el caso de los andamios constituidos de colágeno (Col.) (Fig. 11A'), los poros presentaron un diámetro que oscilaron entre los 80-120 μm . En andamios constituidos de Col./M.O.2% (Fig. 11B'), el diámetro de los poros se encontró en un rango de entre 50–100 μm . Se encontró que aquellos andamios a los cuales se les agregó HEMA-PEGMA 2%, mostraron un tamaño de poro por debajo de los 100 μm , es decir más reducido con respecto a los que no tenían estos polímeros en su formulación. Es así, como en andamios constituidos de Col./H.P. 2% (Fig. 11C'), el tamaño de los poros fue entre 40-80 μm aproximadamente, y en el caso de andamios formulados por Col./H.P. 2%/M.O.2% (Fig. 11D'), de entre 30-60 μm aproximadamente.

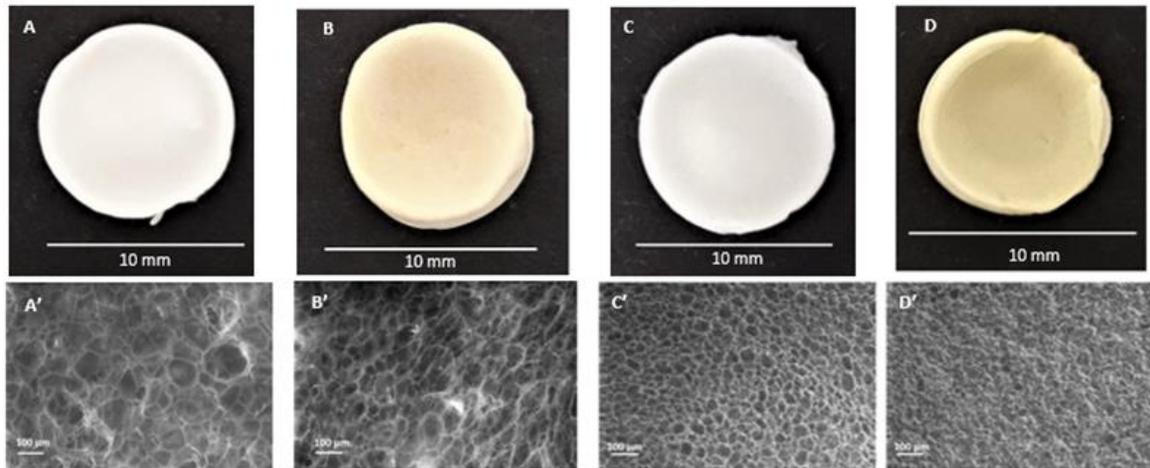


Fig. 11. Fotografías de los andamios obtenidos (A-D). Las fotografías de SEM muestran la microestructura de la superficie de los materiales (A'-D'). Colágeno 10 mg/ml (Col.) (A, A'), Colágeno/*Moringa oleifera* 2% (Col./M.O. 2%) (B,B'), Colágeno/HEMA-PEGMA 2% (Col./H.P. 2%) (C,C') y Colágeno/HEMA-PEGMA 2% /*Moringa oleifera* 2% (Col./H.P. 2%/M.O. 2%) (D,D').

3.4. Evaluación fisicoquímica de andamios Colágeno-HEMA/PEGMA-Compuestos fitoquímicos.

3.4.1. Capacidad de absorción de agua

Las 4 formulaciones de andamios, Col., Col./M.O.2%, Col./H.P.2% y Col./H.P.2%/M.O.2%, fueron evaluados con respecto a su capacidad de absorción de agua, al ser sumergidos 15, 30, 60, 90, 120 y 150 min en 1 ml de PBS 1X (pH 7.4). Los resultados obtenidos muestran que los andamios constituidos solo de colágeno (Col.) y Col./H.P. 2% presentaron la mayor capacidad de absorción de agua, 2960.77% y 1710.66% respectivamente, después de 150 min de inmersión. En el caso de andamios de Col./M.O. 2%, estos presentaron una absorción de agua menor con respecto a las formulaciones antes mencionadas, con un valor de 1273.21%. El andamio de Col./H.P. 2%/M.O.2% exhibió un porcentaje de absorción de 676.02%, siendo este el menor valor obtenido entre las diferentes formulaciones de andamios. En la Fig. 12 se muestran los resultados antes mencionados.

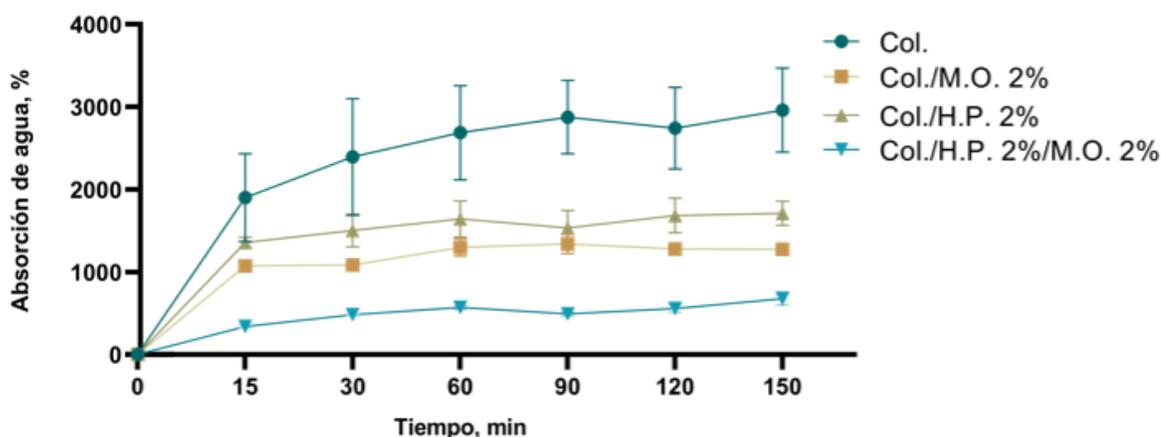


Fig. 12. Capacidad de absorción de agua de andamios compuestos. Col. (Colágeno), Col./M.O. 2% (Colágeno/*Moringa oleifera* 2%), Col./H.P. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%), Col./H.P. 2% /M.O. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%/Moringa oleifera 2%). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3).

3.4.2. Estabilidad en medio acuoso.

Para conocer la estabilidad de los andamios obtenidos, Col., Col./M.O.2%, Col./H.P.2% y Col./H.P.2%/M.O.2%, en un medio acuoso, estos fueron sumergidos en 1 ml de PBS 1X (pH 7.4), durante 3, 6, 9, 12 y 15 días. La finalidad de este ensayo era conocer la estabilidad de los materiales en un ambiente similar al fisiológico.

Los andamios constituidos de Col./H.P.2%/M.O.2%, presentaron la degradación más alta de las 4 formulaciones, aproximadamente 88.75% después de 15 días de inmersión en PBS 1X, y un 61.87% en el caso de los andamios de Col./M.O. 2%. Los andamios que no tenían extracto en su formulación, Col. y Col./H.P. 2%, mostraron un porcentaje de degradación de 8.14 y 25.70%, respectivamente. En la Fig. 13 se muestran los resultados antes mencionados.

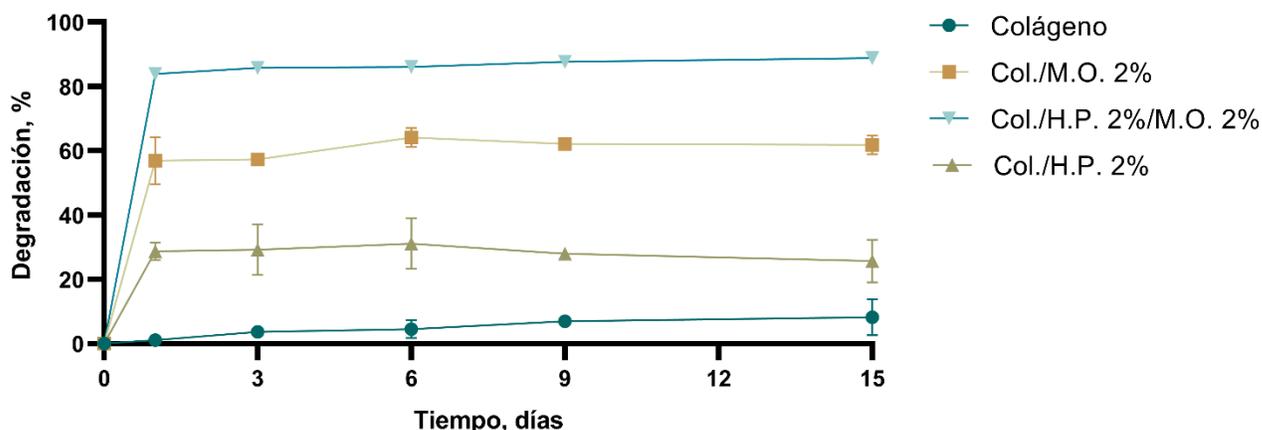


Fig. 13. Estabilidad en medio acuoso de andamios compuestos. Col. (Colágeno), Col./M.O. 2% (Colágeno/*Moringa oleifera* 2%), Col./H.P. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%), Col./H.P. 2% /M.O. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%/Moringa oleifera 2%). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3).

3.5. Caracterización biológica de andamios Colágeno-HEMA/PEGMA-Compuestos fitoquímicos.

3.5.1. Actividad antimicrobiana

Efecto del entrecruzamiento por calor en andamios de Colágeno y Col./M.O. 2%

Se buscó evaluar si la actividad antimicrobiana del extracto era conservada después de los procesos de elaboración del andamio (incorporación, liofilización y entrecruzamiento por calor); además del efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana del extracto de *M. oleifera* incorporado a los andamios. Una parte de los andamios, tanto de colágeno como de colágeno/M.O. 2%, fueron exentos de entrecruzamiento para revisar el efecto causado en los andamios por este proceso.

Evaluamos la capacidad antimicrobiana de los andamios obtenidos contra *S. aureus*, mediante un ensayo con el método de difusión de disco en agar, para analizar su actividad antimicrobiana. Los resultados obtenidos por este ensayo mostraron que aquellos andamios de colágeno/M.O. 2% que fueron entrecruzados por calor a 140 °C durante 24 h (Col./M.O. t= 24h), perdieron totalmente la capacidad antimicrobiana. Los andamios de colágeno/M.O. 2% que no se entrecruzaron (Col./M.O. 2% t=0)

presentaron un halo de inhibición de 22-23 mm de diámetro (n=3). Por otro lado, los andamios constituidos solo de colágeno, entrecruzado (Col. t=24 h) y sin entrecruzar (Col. t= 0 h), no mostraron efecto antibacteriano (Fig. 14).

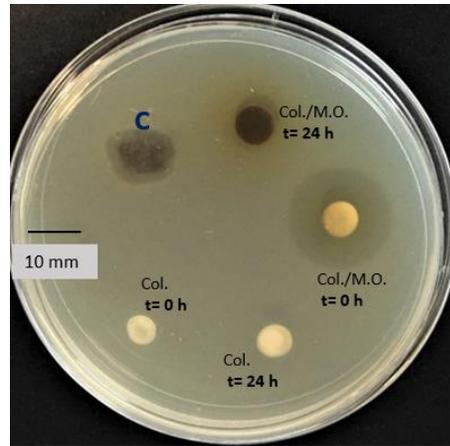


Fig.14. Efecto del entrecruzamiento por calor a 140 °C, durante 24 h, en actividad antimicrobiana de andamios de Col. y Col./M.O. 2%, frente a *S. aureus*. Ensayo realizado con el método de difusión de disco en agar. Se utilizó un apósito comercial como control positivo (C). M.O. (*Moringa oleifera*), Col. t= 0 h (andamio de colágeno sin entrecruzar), Col. t= 24 h (andamio de colágeno entrecruzado 24 h), Col./M.O. 2% t=0 (andamio de colágeno/M.O. 2% sin entrecruzar), Col./M.O. t= 24h (andamio de colágeno/M.O. 2% entrecruzado 24 h) (n=3).

Debido a los resultados anteriores, se determinó que era de importancia averiguar si el entrecruzamiento térmico que afectaba a la actividad antimicrobiana del extracto de *Moringa oleifera*, era dependiente del tiempo. Por lo que se realizó un entrecruzamiento térmico a 140 °C, a diferentes periodos. Los resultados de este ensayo mostraron que, con tan solo una hora bajo estas condiciones, los andamios de colágeno/M.O. 2%, pierden totalmente su capacidad de actividad antimicrobiana (Fig. 15).

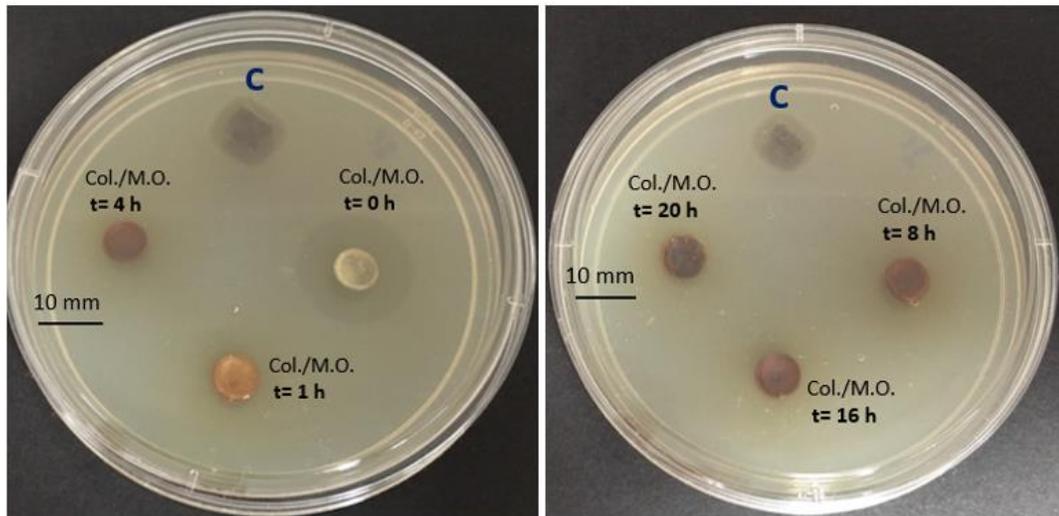


Fig.15. Efecto del tiempo de entrecruzamiento por calor a 140 °C, en actividad antimicrobiana de andamios de Col./M.O. 2%, frente a *S. aureus*. Ensayo realizado con el método de difusión de disco en agar. Se utilizó un apósito comercial como control positivo (C). M.O. (*Moringa oleifera*), Col./M.O. 2% t=0 (andamio de colágeno/M.O. 2% sin entrecruzar), Col./M.O. t= 1-20 h (andamios de colágeno/M.O. 2% entrecruzados a diferentes tiempos) (n=3).

Con base a los resultados obtenidos en estos ensayos, se decidió probar diferentes temperaturas de entrecruzamiento, entre 100 y 130 °C, para conocer si la pérdida del efecto antimicrobiano era dependiente de la temperatura de entrecruzamiento. Los andamios de Col./M.O. 2% se entrecruzaron por 1 h a 100, 110, 120, 130 y 140 °C. Se realizó otro ensayo de actividad antimicrobiana, por el método de difusión de disco en agar frente a *S. aureus*, y los resultados mostraron que la actividad antimicrobiana se mantenía a temperaturas de 100 y 110 °C. El análisis estadístico mostró que estos andamios presentaban diferencias significativas con respecto a aquellos andamios a los que no se sometieron a entrecruzamiento por calor (Col./M.O. 2% t=0) (Fig. 16).

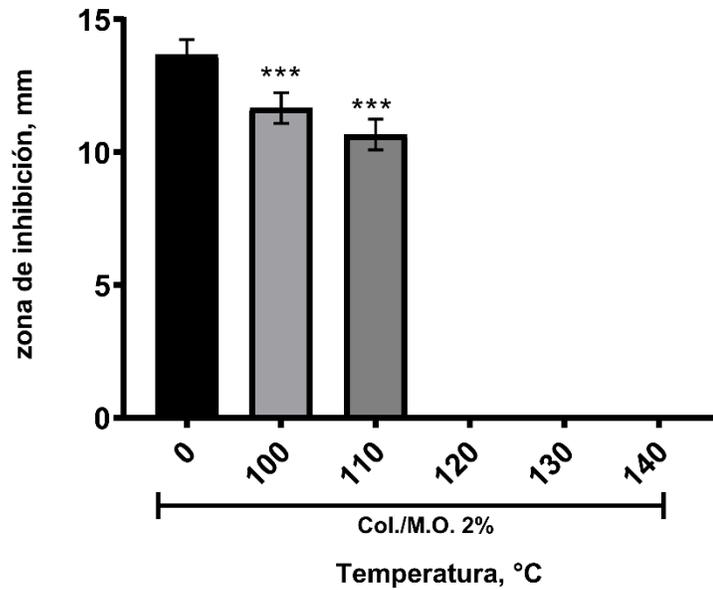


Fig. 16. Efecto de la temperatura de entrecruzamiento por calor, durante 1 h, en actividad antimicrobiana de andamios de Col./M.O. 2%, frente a *S. aureus*. Ensayo realizado con el método de difusión de disco en agar. M.O. (*Moringa oleifera*), Col./M.O. 2% (andamio de colágeno/M.O. 2%). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Los niveles de significancia están dados como *** ($p < 0.001$).

Una vez obtenidos estos resultados, decidimos que la temperatura de entrecruzamiento a utilizar sería de 100 °C. Es así, como se elaboraron andamios de Col./M.O. 2% los cuales fueron entrecruzados a diferentes periodos, 1, 3, 6, 9, 12 y 24 h, a 100 °C. Se realizó un ensayo para evaluar la actividad antimicrobiana de estos andamios frente a *S. aureus* y conocer si el tiempo de entrecruzamiento la afectaba. Los resultados de este ensayo mostraron que a 1 y 3 h, los andamios de Col./M.O.2% mantenían su capacidad de actividad antimicrobiana, con diferencias no significativas en comparación con andamios que no se expusieron a un proceso de entrecruzamiento (Col./M.O. 2% t=0) (Fig. 17).

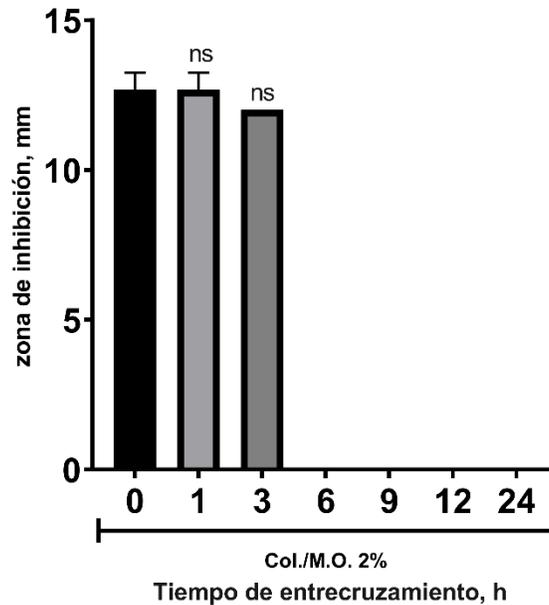


Fig. 17. Efecto del tiempo de entrecruzamiento por calor a 100 °C, en actividad antimicrobiana de andamios de Col./M.O. 2%, frente a *S. aureus*. Ensayo realizado con el método de difusión de disco en agar. M.O. (*Moringa oleifera*), Col./M.O. 2% (andamio de colágeno/M.O. 2%). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía.

Finalmente, se realizó un quinto ensayo de actividad antimicrobiana, frente a las dos bacterias a las cuales nuestro andamio mostró actividad antimicrobiana, *S. aureus* y *K. pneumoniae*.

Frente a *S. aureus*, los andamios de Col./M.O. 2%, fueron analizados en presencia de andamios de colágeno (Col.) entrecruzados a 1 y 3 h (Fig. 18). Los resultados de este ensayo mostraron que los andamios de Col./M.O. 2% a t=1 h, mantuvieron su capacidad antimicrobiana sin diferencias significativas con respecto a aquellos a los que no se sometieron a un proceso de entrecruzamiento (Col./M.O. 2% a t= 0 h). Además, los andamios de colágeno (Col.) no presentaron ningún efecto antimicrobiano, independientemente del tiempo de entrecruzamiento a los que fueron sometidos.

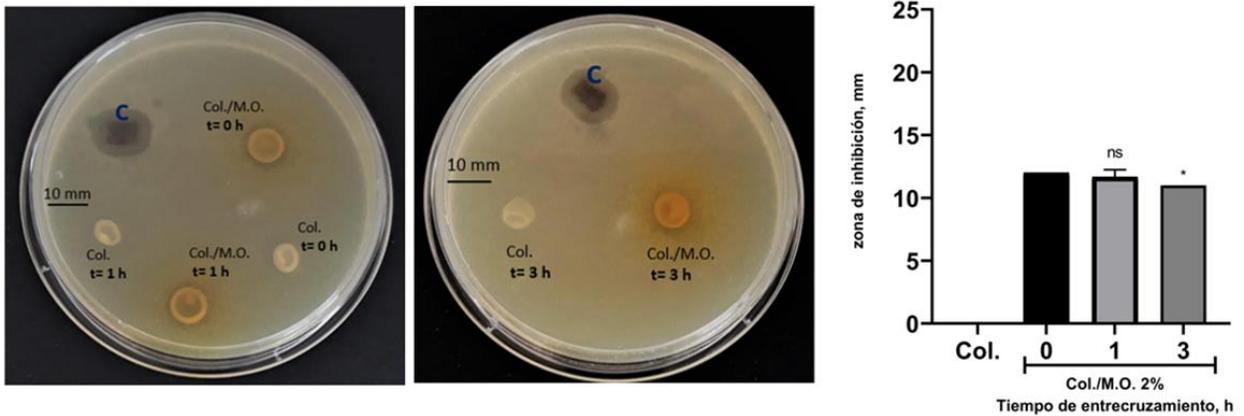


Fig. 18. Efecto del tiempo de entrecruzamiento por calor a 100 °C, de andamios de Col. y Col./M.O. 2% en actividad antimicrobiana, frente a *S. aureus*. Ensayo realizado con el método de difusión de disco en agar. Se utilizó un apósito comercial como control positivo (C). M.O. (*Moringa oleifera*), Col. t=0 (andamio de colágeno sin entrecruzar), Col. t=1-3 h (andamios de colágeno entrecruzado a diferentes tiempos), Col./M.O. 2% t=0 (andamio de colágeno/M.O. 2% sin entrecruzar), Col./M.O. t=1-3 h (andamios de colágeno/M.O. 2% entrecruzado a diferentes tiempos). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Los niveles de significancia están dados como * ($p < 0.05$).

En el caso de *K. pneumoniae*, los andamios de Col./M.O. 2%, fueron comparados en presencia de andamios de colágeno (Col.) entrecruzados a 1 y 3 h (Fig. 19). Los resultados de este ensayo mostraron que los andamios de Col./M.O. 2% a t=1 h, mantuvieron su capacidad antimicrobiana con diferencias ligeramente significativas con respecto a aquellos a los que no se sometieron a un proceso de entrecruzamiento (Col./M.O. 2% a t= 0 h). Los andamios de colágeno (Col.) tampoco presentaron ningún efecto antimicrobiano frente a esta bacteria, independientemente del tiempo de entrecruzamiento a los que fueron sometidos.

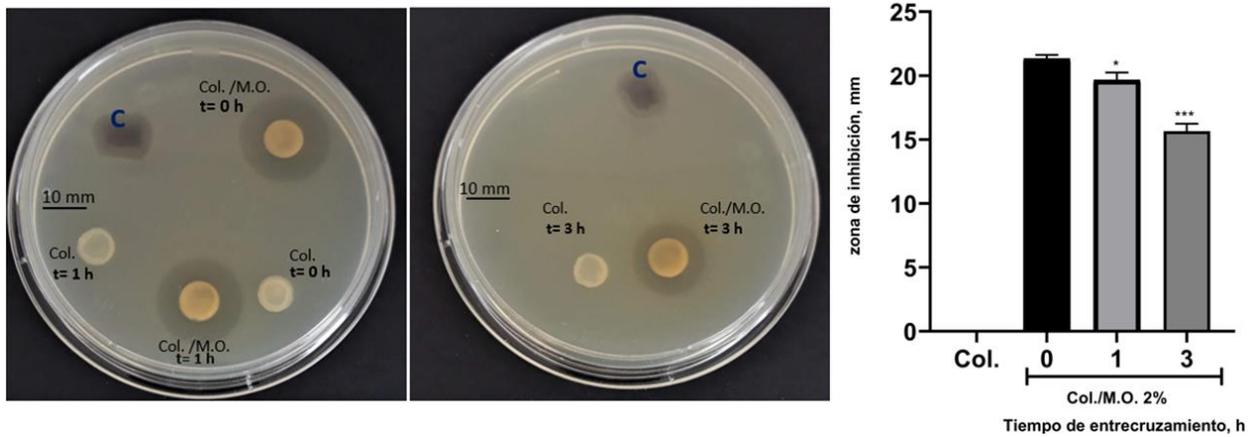


Fig. 19 Efecto del tiempo de entrecruzamiento por calor a 100 °C, de andamios de Col. y Col./M.O. 2% en actividad antimicrobiana, frente a *Klebsiella pneumoniae*. Ensayo realizado con el método de difusión de disco en agar. Se utilizó un apósito comercial como control positivo (C). M.O. (*Moringa oleifera*), Col. t=0 (andamio de colágeno sin entrecruzar), Col. t= 1-3 h (andamios de colágeno entrecruzado a diferentes tiempos), Col./M.O. 2% t=0 (andamio de colágeno/M.O. 2% sin entrecruzar), Col./M.O. t= 1-3 h (andamios de colágeno/M.O. 2% entrecruzado a diferentes tiempos). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Los niveles de significancia están dados como* ($p < 0.05$) y *** ($p < 0.001$)

Efecto del entrecruzamiento por calor en andamios Col./H.P. 2%/M.O. 2%

Una parte de los andamios, tanto de colágeno/HEMA-PEGMA 2% (Col./H.P. 2%) como de colágeno/HEMA-PEGMA 2%/ M.O. 2% (Col./H.P. 2%/M.O. 2%), fueron exentos de entrecruzamiento por calor con la finalidad de analizar el efecto causado en los andamios por este proceso, sobre la integridad física de estos y posteriormente su actividad antimicrobiana.

Se evaluaron diferentes temperaturas de entrecruzamiento, entre 100 y 140 °C, para conocer si la pérdida del efecto antimicrobiano dependía de la temperatura de entrecruzamiento en estos andamios, como en el caso de los andamios que no contenían HEMA-PEGMA. Los andamios de Col./H.P. 2%/M.O. 2% se entrecruzaron por 1 h a 100, 110, 120, 130 y 140 °C. Se realizó un ensayo de actividad antimicrobiana, por el método de difusión de disco en agar frente a *S. aureus*, y los resultados mostraron que la actividad antimicrobiana se mantuvo a temperaturas de 100 hasta 130 °C. El análisis estadístico mostró que estos andamios entrecruzados a una temperatura de 100 °C no presentaban diferencias significativas con respecto a aquellos andamios a los que no se sometieron a entrecruzamiento por calor (Col./M.O. 2% t=0) (Fig. 20).

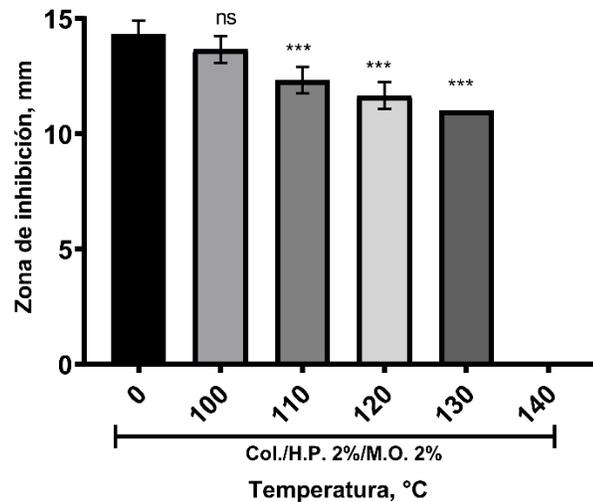


Fig. 20. Efecto de la temperatura de entrecruzamiento por calor, durante 1 h, en actividad antimicrobiana de andamios de Col./H.P. 2%/M.O. 2%, frente a *S. aureus*. Ensayo realizado con el método de difusión de disco en agar. M.O. (*Moringa oleifera*), Col./H.P. 2%/M.O. 2% (andamio de colágeno/HEMA-PEGMA 2%/M.O. 2%). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Los niveles de significancia están dados como *** ($p < 0.001$).

Con base en estos resultados, decidimos que temperatura de entrecruzamiento a utilizar sería de 100 °C. Andamios de Col/H.P. 2%/M.O. 2% fueron entrecruzados a diferentes periodos, 1, 3, 6, 9, 12 y 24 h, a 100 °C. Se realizó un ensayo para evaluar la actividad antimicrobiana de estos andamios frente a *S. aureus* y conocer si el tiempo de entrecruzamiento la afectaba. Los resultados de este ensayo mostraron que a 1, 3 y 9 h, los andamios de Col./H.P.2%/M.O.2% mantenían su capacidad de actividad antimicrobiana, con diferencias no significativas en comparación con andamios que no se expusieron a un proceso de entrecruzamiento (Col./M.O. 2% t=0). En el caso de andamios entrecruzados por 6 y 12 h, aunque los resultados mostraron que la actividad antimicrobiana se mantuvo, estos andamios mostraron diferencias ligeramente significativas y significativas, respectivamente, en comparación con andamios no expuestos al proceso de entrecruzamiento. Mientras que, en el caso de andamios entrecruzados por 24 h, se observó una pérdida total de la actividad antimicrobiana (Fig. 21).

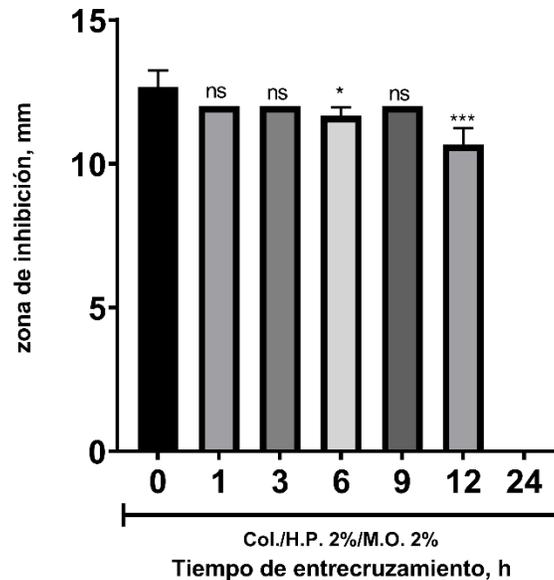


Fig. 21. Efecto del tiempo de entrecruzamiento por calor a 100 °C, en actividad antimicrobiana de andamios de Col./H.P. 2%/M.O. 2%, frente a *S. aureus*. Ensayo realizado con el método de difusión de disco en agar. M.O. (*Moringa oleifera*), Col./H.P. 2%/M.O. 2% (andamio de colágeno/HEMA-PEGMA 2%/M.O. 2%). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Los niveles de significancia están dados como* ($p < 0.05$) y *** ($p < 0.001$).

Se realizó un ensayo para evaluar la actividad antimicrobiana de estos andamios frente a *K. pneumoniae*. Los andamios de Col./H.P. 2%/M.O. 2%, fueron analizados en presencia de andamios de colágeno/HEMA-PEGMA 2% (Col./H.P. 2%) entrecruzados a 1, 3, 6 y 9 h (Fig. 22). Los resultados de este ensayo mostraron que los andamios de Col./M.O. 2% a t=1 h, mantuvieron su capacidad antimicrobiana con diferencias ligeramente significativas con respecto a aquellos a los que no se sometieron a un proceso de entrecruzamiento (Col./H.P. 2%/M.O. 2% a t= 0 h). Si bien la actividad antimicrobiana en el caso de andamios entrecruzados a 3, 6 y 9 h mostraron actividad antimicrobiana, se observaron diferencias significativas en comparación con andamios no expuestos al proceso de entrecruzamiento. Por otro lado, los andamios de colágeno/HEMA-PEGMA 2% (Col./H.P. 2%) no presentaron ningún efecto antimicrobiano, independientemente del tiempo de entrecruzamiento a los que fueron sometidos.

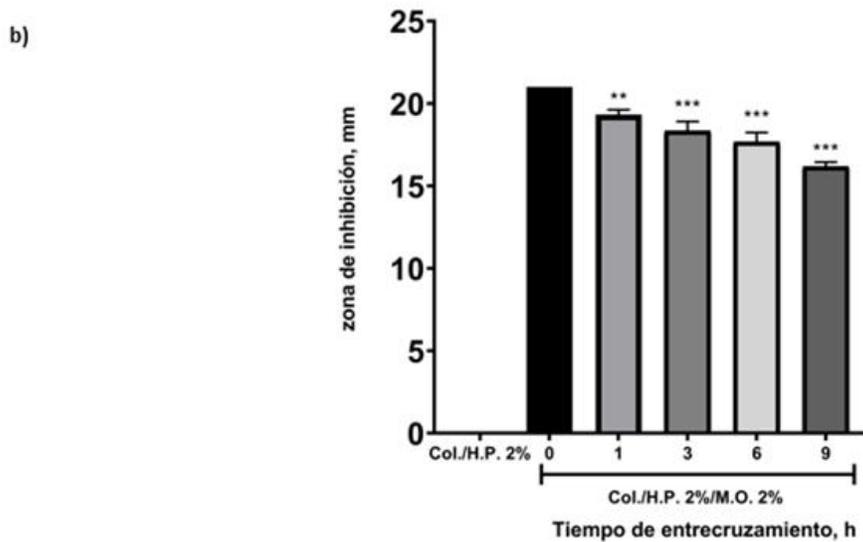
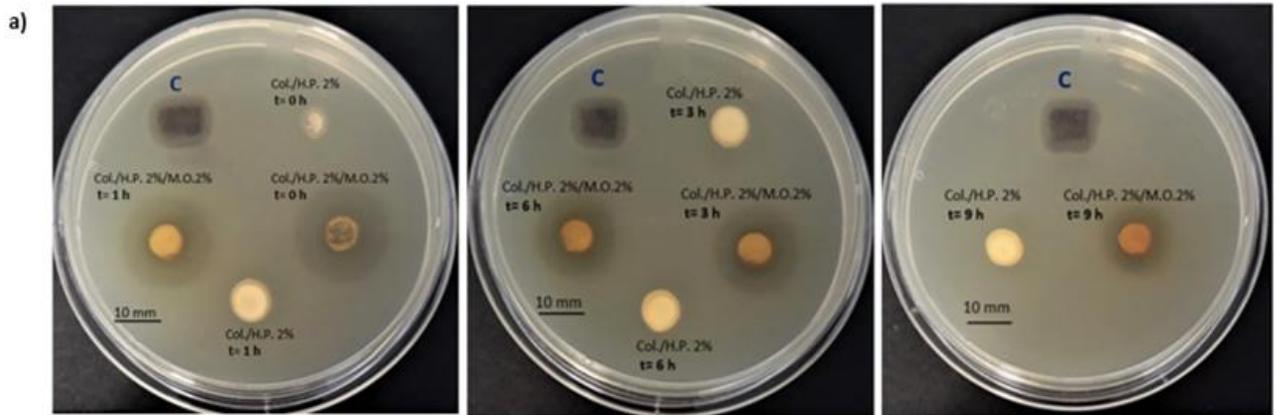


Fig. 22. Efecto del tiempo de entrecruzamiento por calor a 100 °C, de andamios de Col./H.P. 2% y Col./H.P. 2%/M.O. 2% en actividad antimicrobiana, frente a *Klebsiella pneumoniae*. a) Ensayo realizado con el método de difusión de disco en agar. Se utilizó un apósito comercial como control positivo (C). b) Gráfica donde se muestran los resultados de dicho ensayo. M.O. (*Moringa oleifera*), H.P. 2% (HEMA-PEGMA 2%) Col./H.P. 2% t=0 (andamio de colágeno/ H.P. 2% sin entrecruzar), Col./H.P. 2% t= 1-9 h (andamios de colágeno entrecruzado a diferentes tiempos), Col./H.P. 2%/M.O. 2% t=0 (andamio de colágeno/H.P. 2%/M.O. 2% sin entrecruzar), Col./M.O. t= 1-9 h (andamios de colágeno/H.P. 2%/M.O. 2% entrecruzado a diferentes tiempos). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Los niveles de significancia están dados como ** (p < 0.01) y *** (p < 0.001).

3.5.2. Actividad antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria se determinó mediante un ensayo para medir la capacidad de los compuestos liberados de los andamios después de 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 8 y 24 h de inmersión en 1 ml de agua destilada, para remover óxido nítrico (NO) donado por nitroprusiato de sodio. El NO se cuantificó con el reactivo Griess, a 540 nm. Los resultados de este ensayo se muestran en la Fig. 23.

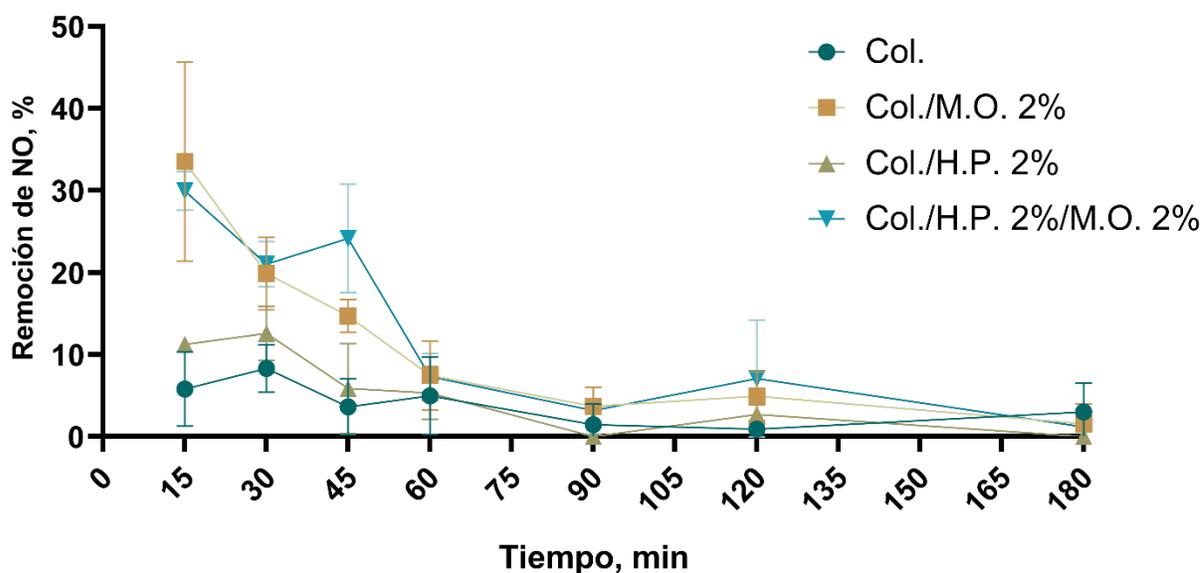


Fig. 23. Actividad antiinflamatoria de los andamios compuestos. Col. (Colágeno), Col./M.O. 2% (Colágeno/*Moringa oleifera* 2%), Col./H.P. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%), Col./H.P. 2% /M.O. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%/ *Moringa oleifera* 2%). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3).

Con base en los resultados obtenidos, se encontró que la mayoría de la remoción de NO es llevada a cabo en la primera hora de liberación de los compuestos, los cuales estaban contenidos en andamios con extracto de *M. oleifera*. En el caso de los andamios de Col./M.O. 2% y Col./H.P. 2%/M.O. 2%, el porcentaje de remoción de NO alcanzó un 33.5 % y 29.95% respectivamente, en los primeros 15 min de liberación de los compuestos. Por otro lado, los resultados mostraron que los andamios de Col. y Col./H.P. 2%, presentaron porcentajes de inhibición de 5.7% y 11.2% respectivamente, a este periodo de liberación.

3.5.3 Actividad antioxidante

Para determinar la capacidad antioxidante de los andamios, las alícuotas de liberación obtenidas a diferentes periodos (sección 2.6.2), fueron utilizadas como muestra para medir la capacidad de los compuestos liberados de los andamios para neutralizar el radical $ABTS^{*+}$. Los resultados fueron expresados en nmol de TEAC por cada mg de peso de andamio. La Fig. 24 muestra los resultados de este ensayo.

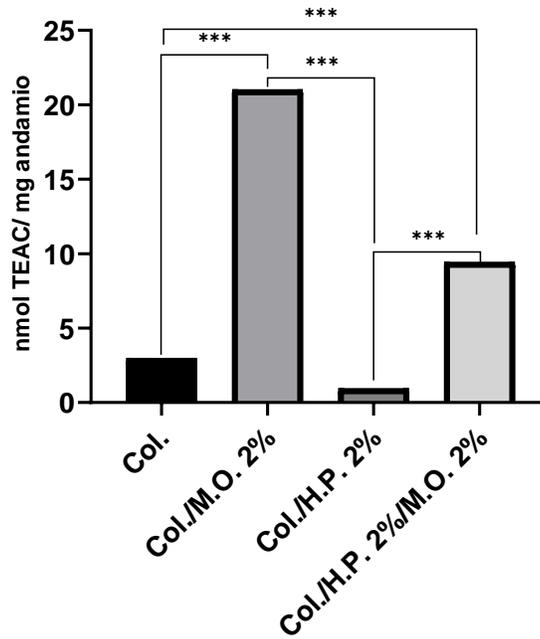


Fig.24. Actividad antioxidante de extractos de andamios expresado en nmol Trolox equivalentes a capacidad antioxidante (TEAC) por 1 mg de andamio. Col. (Colágeno), Col./M.O. 2% (Colágeno/*Moringa oleifera* 2%), Col./H.P. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%), Col./H.P. 2%/M.O. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%/Moringa oleifera 2%). (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía. Los niveles de significancia están dados como *** ($p < 0.001$).

Aquellos andamios que no contenían extracto de *M. oleifera* en su formulación tuvieron valores muy bajos de actividad antioxidante, 2.97 y 0.94 nmol TEAC/mg andamio, para el caso de andamios de Col. y Col./H.P. 2% respectivamente. Se encontraron diferencias significativas con respecto a aquellos andamios que contenían el extracto y los que no lo presentan en su formulación. En el caso de los andamios de Col./M.O. 2%, la capacidad antioxidante alcanzó el valor más alto con respecto a los otros andamios, con un valor de 21.01 nmol TEAC/mg andamio; y en el caso de andamios constituidos de Col./H.P. 2%/M.O. 2% el valor de nmol TEAC/mg andamio fue de 9.42.

3.5.4. Inhibición de la actividad de elastasa

Para conocer la capacidad de inhibición de elastasa de los andamios, se evaluaron las alícuotas de liberación obtenidas a diferentes intervalos de tiempo (0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 8 y 24 h). Sin embargo, la inhibición de esta enzima encontrada a partir de los 15 min de liberación fue por debajo de 2% (Fig.25). Los datos de actividad de elastasa obtenidos en este intervalo de tiempo son de 98.29 %, en el caso de andamios de Col./M.O. 2% y 99.14 % en el caso de andamios constituidos de Col./H.P. 2%/M.O. 2%. Los andamios sin presencia de extracto, Col. y Col./H.P. 2%, no mostraron inhibición de esta enzima, dado que los porcentajes de actividad de elastasa muestran una actividad de 100%.

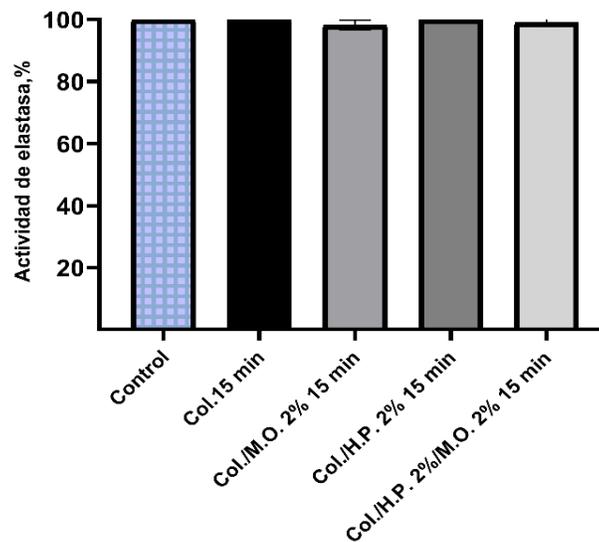


Fig. 25. Efecto de las alícuotas de liberación de los andamios en la actividad de elastasa. Datos correspondientes a alícuota de liberación de 15 min. Control: agua destilada. Col. (Colágeno), Col./M.O. 2% (Colágeno/*Moringa oleifera* 2%), Col./H.P. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%), Col./H.P. 2% /M.O. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%/ *Moringa oleifera* 2%). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3).

3.5.5. Viabilidad celular

Los fibroblastos de la línea CCD-112Sk, se trabajaron en el pase 9, se activaron y cultivaron en una placa de 150 mm en medio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) suplementado, según se describió en la metodología. A los días 6-7 de cultivo alcanzaron la confluencia requerida y se subcultivaron en relación 1:4. El medio de cultivo se renovó cada tres días.

En este ensayo se analizó la viabilidad y proliferación celular de los fibroblastos en presencia de los diferentes andamios obtenidos. Se llevó a cabo una evaluación a 3, 6 y 10 días, y en todos los casos se encontraron diferencias significativas al comparar los andamios constituidos de solo colágeno (Col.) con los de las otras condiciones, como se muestra en la gráfica (Fig.26).

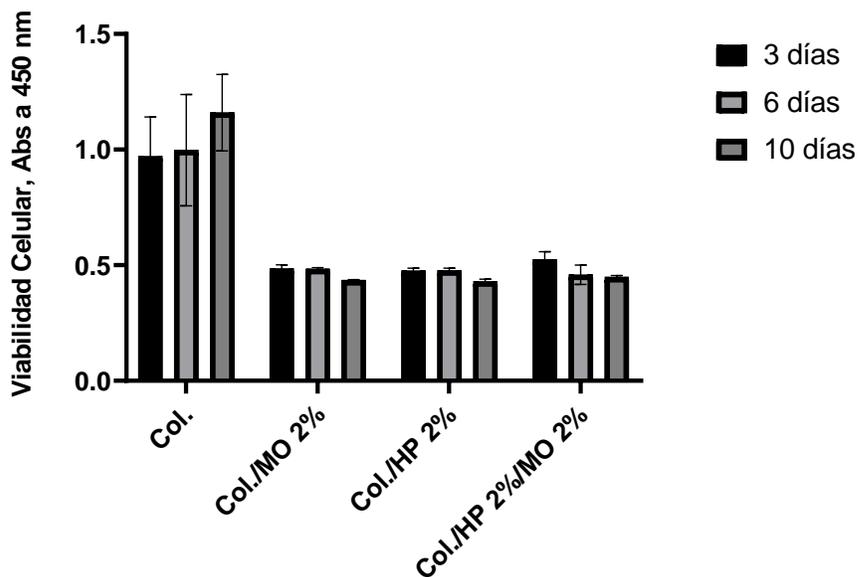


Fig.26. Viabilidad celular de fibroblastos humanos (línea celular CCD- 1112sk) en presencia de andamios compuestos. Col. (Colágeno), Col./M.O. 2% (Colágeno/*Moringa oleifera* 2%), Col./H.P. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%), Col./H.P. 2% /M.O. 2% (Colágeno/HEMA-PEGMA 2%/ *Moringa oleifera* 2%). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3).

Capítulo 4. Discusión

Se obtuvieron extractos acuosos de cuatro plantas, *Calendula officinalis*, *Hamamelis virginiana*, *Aloe vera* y *Moringa oleifera*, y se evaluaron con respecto a su actividad antimicrobiana, capacidad de remoción de óxido nítrico (NO), la cual está relacionada a sus propiedades antiinflamatorias; y propiedades antioxidantes, evaluada sobre la actividad del radical catión ABTS^{•+}.

Los extractos fueron evaluados en presencia de algunas de las bacterias asociadas a infecciones de heridas crónicas: *Staphylococcus aureus* por parte de las Gram (+); *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* en el caso de las Gram (-), a concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0% (m/v). Los resultados mostraron que el único extracto que tuvo un efecto en el crecimiento de las bacterias fue el de *M. oleifera*. Este extracto mostró actividad antimicrobiana contra *S. aureus* a una concentración de 2.0% (m/v), y contra *K. pneumoniae* en las tres concentraciones a las que fue evaluada, 0.5, 1.0 y 2.0% (m/v), aumentando el efecto de inhibición conforme aumentaba la concentración del extracto. Debido a la composición de los sensidiscos, así como la naturaleza acuosa del extracto utilizado en este trabajo, se permitió la difusión de este último en el medio conteniendo el inóculo. De esta manera, pudo ser evaluada de manera efectiva la actividad antimicrobiana de los extractos, mostrada frente a las bacterias antes mencionadas.

La actividad antiinflamatoria de los extractos se analizó con base en su capacidad de remoción de NO, donado por nitroprusiato de sodio, a concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0% (m/v). En el caso del extracto de *M. oleifera*, la remoción de NO se mantuvo por encima del 85% en la solución al 2.0%. Se empleó el ensayo ABTS que se basa en la capacidad que tiene una sustancia para reaccionar con el radical ABTS^{•+}, para evaluar la capacidad antioxidante de los cuatro extractos. La actividad antioxidante se mantuvo casi en su totalidad al evaluar los extractos a la concentración más baja (0.5% m/v). Dados los resultados obtenidos a partir del análisis de actividad antimicrobiana y antiinflamatoria, así como en concordancia con los presentados por Rubio Elizalde et al. (2019), se infirió que a concentraciones mayores de extracto la actividad antioxidante aumentaría. La razón de este comportamiento pudiera estar relacionado con el contenido fenólico de los extractos, ya que trabajos previos se indicó que el contenido fenólico es uno de los mayores contribuyentes de la capacidad antioxidante, de algunas plantas (Skotti et al., 2014; Zhang et al., 2011).

El criterio principal con respecto a la selección de extracto es que éste presentara actividad antimicrobiana, debido a la correlación que existe entre infecciones y heridas crónicas en tejidos blandos. Además, que

presentara efectos sobre la remoción de NO, lo cual le brindaría efectos antiinflamatorios, y capacidad para neutralizar al radical ABTS^{•+}, relacionado con la actividad antioxidante que pudiera brindar al momento de colocarse en un sitio de interés. El extracto de *Moringa oleifera*, fue el único extracto que cumplió con los parámetros antes mencionados, bajo las condiciones presentadas en este trabajo. Por lo tanto, fue seleccionado para su incorporación en la formulación de los andamios constituidos de Colágeno-HEMA/PEGMA – extracto acuoso.

Una vez obtenidos los cuatro grupos de andamios, Col., Col./M.O.2%, Col./H.P.2% y Col./H.P.2%/M.O.2%, se realizó un análisis para conocer la microestructura de su superficie, por medio de SEM. El objetivo final de la fabricación de estos materiales es que sean aplicados como estructuras tridimensionales que funcionen como templetas para la difusión de nutrientes que permitan la proliferación de células y, por lo tanto, ayuden a la cicatrización del tejido. Para poder considerar a un material como adecuado para su utilización como andamio, este debe poseer características que puedan proveer soporte para la formación de tejido, por lo que una estructura con poros interconectados es de vital importancia (O'Brien, 2011). En todos los casos, se encontraron superficies porosas, sin embargo, el tamaño del poro, así como la distribución de estos fue diferente entre las formulaciones de andamios. En el caso de los andamios constituidos de Colágeno (Col.) y Col./M.O.2%, los poros presentaron diámetros que oscilaron entre los 50-120 μm , mientras que en los andamios a base de colágeno y HEMA/PEGMA el tamaño de poro fue menor a 100 μm . Es decir, el tamaño de poro y su distribución cambiaron al incorporar estos dos polímeros a los andamios a base de colágeno. Se ha reportado que el intervalo adecuado de diámetro de poro para cualquier tipo de andamio depende del tipo de célula a utilizar, así como el tipo de tejido en el que se implantarán los materiales (O'Brien, 2011). En el caso de fibroblastos dérmicos humanos, el tamaño de poro requerido para su crecimiento es por debajo de 160 μm (Yang et al., 2002). En un trabajo previo, realizado en injertos compuestos de colágeno y glicosaminoglicanos se indicó que un tamaño de poro entre 20 y 120 μm , promueve la regeneración de la dermis (Murphy et al., 1990). Por lo que, aunque existen diferencias entre el tamaño de poro de los diferentes tipos de andamios, este parámetro es cumplido por cada uno de los andamios desarrollados en este trabajo. Por otro lado, la distribución de los poros es diferente en cada una de las formulaciones de andamios. Una de las razones de este resultado, pudiera atribuirse a la incorporación de los polímeros sintéticos HEMA/PEGMA, y sus efectos plastificantes en el andamio. Además, la combinación de varios factores, como son el entrecruzamiento, el cual depende de la temperatura y el tiempo al que se someten los materiales a este proceso; la concentración de extracto, que en este caso fue de 2.0 %, o la combinación de estos 3 factores, puede causar estas diferencias entre los materiales.

En los andamios, además de una microestructura porosa, así como la hidrofiliidad de los componentes de los andamios, otro factor importante para promover la proliferación y adhesión de células en estos materiales es una tasa elevada de absorción de agua (Depan et al., 2011). Determinar la capacidad de absorción de agua de los andamios permite predecir si los materiales obtenidos absorberán exudados (Li et al., 2013). Un andamio debe presentar una capacidad de absorción de agua que prevenga una deshidratación excesiva del sitio lesionado, así como la acumulación de exudados provenientes del microambiente (Shojaee et al., 2014; Chen et al., 2018). Los andamios obtenidos, Col., Col./M.O.2%, Col./H.P.2% y Col./H.P.2%/M.O.2%, se evaluaron con respecto a su capacidad de absorción de agua, después de sumergirlos en 1 ml de PBS 1X (pH 7.4), durante diferentes periodos (15, 30, 60, 90, 120 y 150 min). Los andamios constituidos solo de colágeno (Col.), presentaron mayor capacidad de absorción de agua, después de 150 min de inmersión. Lo anterior, concuerda con la alta porosidad mostrada por este andamio al evaluar su microestructura por SEM (80-120 μm). Aunque el andamio de Col./M.O. 2% presenta una microestructura similar a la del andamio constituido solo por colágeno, su capacidad de absorción de agua fue menor. Esto puede relacionarse con los diferentes compuestos fitoquímicos que son parte de su formulación, presentes en el extracto de *M. oleifera*, y que algunos son menos hidrofílicos, como es el caso de quercetina (Kitagawa et al., 2011). El andamio de Col./H.P.2% presentó un porcentaje de absorción de agua mayor con respecto a los de Col./M.O. 2%, aunque este andamio muestra un tamaño de poro más pequeño (40-80 μm), la composición de este pudiera explicar el incremento del valor de la capacidad de absorción de agua, ya que PEGMA, es un polímero hidrofílico. Los andamios con menor absorción de agua fueron aquellos constituidos por Col./H.P.2%/M.O.2% después de 150 min de contacto con medio acuoso. La causa probable a la que se le puede atribuir esta respuesta es la distribución de la porosidad del andamio, la cual difiere significativamente en comparación con las otras formulaciones. Como en el caso anterior, pudiera ser que la combinación de los factores tales como entrecruzamiento, concentración de extracto e incorporación de HEMA/PEGMA hayan afectado al andamio, aunque esté presente en su formulación polímeros hidrofílicos. En promedio la capacidad de absorción de agua de los andamios elaborados se calculó en 1655 %, lo cual es comparable con trabajos previamente reportados. Materiales diseñados para mejorar la cicatrización, basados en alginato y agarosa, presentan una capacidad de absorción de agua entre 2000% y 400-500%, respectivamente (Mogoşanua y Grumezescu, 2014). La capacidad de absorción de agua en las cuatro formulaciones de andamios realizados en este trabajo es mayor a la reportada para andamios de colágeno entrecruzadas con ácido tánico (absorción de agua de 242 %) (Natarajan et al., 2013). Además, en promedio son superiores a los reportados recientemente por Veerasubramanian et al. (2018), quienes desarrollaron andamios constituidos de glucomanano de konjac-queratina con *Avena sativa* para promover la cicatrización de heridas crónicas por diabetes, en donde se reportó un porcentaje de absorción de agua de 1000%.

Para aplicaciones asociadas a cicatrización de heridas, si bien, se espera que los andamios se degraden durante el proceso de cicatrización, también es necesario que la degradación sea en un tiempo suficiente que permita la formación de nueva matriz extracelular, el cual variará dependiendo de la herida. Por lo tanto, se analizó el efecto de la incorporación de HEMA/PEGMA en la estabilidad a la matriz polimérica de colágeno sumergiendo cada grupo de andamios en 1 ml de PBS 1X (pH 7.4), durante 3, 6, 9, 12 y 15 días. La finalidad de este ensayo fue determinar la estabilidad de los materiales en un ambiente similar al fisiológico. Los andamios constituidos de Col./H.P.2%/M.O.2%, presentaron la mayor degradación entre las cuatro formulaciones después de 15 días de inmersión en PBS 1X, seguida por los andamios de Col./M.O. 2%. Los andamios que no tenían extracto en su formulación, Col. y Col./H.P. 2%, mostraron un porcentaje de degradación menores con respecto a aquellos en los que se agregó extracto. Por lo tanto, la incorporación de los polímeros sintéticos HEMA/PEGMA no evitó la degradación de los andamios, bajo las condiciones que se presentan en este trabajo. Sin embargo, después de 15 días estos mantuvieron su forma, ya que en ninguno de los casos se observaron fragmentos o fisuras en los andamios, solo su tamaño se redujo conforme pasaron los días (resultados no mostrados). En general, los polímeros hidrofílicos muestran un incremento en la degradabilidad al estar en medio acuoso, con respecto a polímeros hidrofóbicos (Rubio-Elizalde et al., 2019). Los mayores porcentajes de degradación de andamios correspondieron a aquellos que contenían extracto de *M. oleifera*, lo cual se atribuye a la hidrofiliidad del extracto, ya que los compuestos fitoquímicos contenidos en este son completamente solubles en agua dado el proceso de extracción que se realizó en este trabajo. Por lo tanto, la masa perdida en estos andamios y, por lo tanto, su mayor degradación, se atribuye principalmente a la disolución del extracto acuoso de *M. oleifera* contenida en estos andamios.

Las infecciones de heridas crónicas y tejidos blandos son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad entre pacientes con este tipo de afecciones, debido a que pueden potenciar complicaciones tales como bacteriemia y la formación de abscesos. En casos más graves, pueden producir la necrosis de tejidos, lo que llevará a la destrucción de músculo y grasa subyacente (Amilcar y Cardona, 2015), lo que puede conducir a amputación de extremidades, como en el caso de pacientes diabéticos con complicaciones en úlceras de pie (Abdul-Ghani et al., 2006). Los andamios a base de Col./M.O. 2% y Col./H.P. 2%/M.O. 2%, tuvieron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *K. pneumoniae*, mientras que los andamios que no contenían *M. oleifera* no inhibieron el crecimiento de las bacterias. Por lo anterior, se atribuye la actividad antimicrobiana de los andamios al extracto de *M. oleifera* que fue incorporado a la matriz. En estudios previos se ha correlacionado el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de extractos con su actividad antimicrobiana (Grabek-Lejko et al., 2018; Peixoto et al., 2018; Vázquez-Armenta et al., 2017). En el caso de *M. oleifera*, las hojas de esta planta son ricas en compuestos fenólicos,

descritos y caracterizados previamente, como ácido clorogénico, ácido gálico, kaempferol, ácido rosmarínico y quercetina, (Bennett et al., 2003; Brahma et al., 2009, Chin et al., 2018; Rubio Elizalde et al., 2019). Los flavonoides y fenoles inhiben el crecimiento bacteriano a través de la permeabilización y despolarización de la membrana citoplasmática del agente patógeno (García-García et al., 2011). La permeabilización de la membrana promueve la filtración de protones desde las células, la disrupción del potencial eléctrico de membrana reduce la fuerza motriz de protones y, por último, la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP). Además, la reducción del potencial de membrana promueve la salida de aminoácidos, proteínas, ATP y otros iones desde las células bacterianas. La salida de estos compuestos de las células en general es una clara indicación de daño y muerte celular (Rua et al., 2011). Por otro lado, en un estudio llevado a cabo en 2003, con la finalidad de identificar la prevalencia de los agentes causales de infecciones en heridas crónicas de pacientes diabéticos (ulceraciones en extremidades), los resultados mostraron que *S. aureus* fue la especie bacteriana más recurrentemente aislada, apareciendo en 50% de las muestras colectadas. Mientras que en el caso de *K. pneumoniae*, se encontró en aproximadamente el 17% de las muestras colectadas, siendo la segunda bacteria Gram positiva con mayor aislamiento, solo por debajo de *Proteus* sp. con un 25% (Slater et al., 2004). Los resultados anteriores concuerdan con las observaciones obtenidas en un estudio posterior, en el que se señala que las infecciones de heridas crónicas o en tejidos suaves, son usualmente causadas en su mayoría por bacterias Gram positivas, siendo *S. aureus* una de las bacterias predominantes involucrada en la fase inicial del proceso de infección, mientras que bacterias Gram negativas, como *Klebsiella pneumoniae*, se pueden encontrar con mayor concurrencia en etapas tardías de la infección (Cardona y Wilson, 2015). Dado que en este trabajo los andamios que contienen el extracto de *M. oleifera* inhibieron el crecimiento de *S. aureus* y *K. Pneumoniae*, se considera que los andamios de Col./M.O. 2% y Col./H.P. 2%/M.O. 2% potencialmente ayudarán y complementarán la cicatrización de heridas al inhibir el crecimiento de bacterias que generalmente se han reportado como importantes colonizadoras de heridas de tejidos blandos.

La actividad antiinflamatoria de los andamios se analizó con base a su capacidad de remoción de óxido nítrico (NO), donado por nitroprusiato de sodio (NPS). El NO, es un mediador proinflamatorio el cual cuando es liberado en niveles altos durante condiciones patológicas desencadena la inflamación del tejido (Sharma et al., 2007). El NO se cuantificó con el reactivo Griess. Este reactivo detecta presencia de nitritos orgánicos; si remueve o atrapa NO, forma un complejo que se observa por colorimetría. El nitrito es detectado y analizado por la formación de un color rojo rosado al tratamiento de una muestra conteniendo NO_2^- con el reactivo de Griess (Kavoosi y Amirghofran, 2017; Pardau et al., 2017). Al disminuir la absorbancia a 540 nm, mayor es la remoción de NO en el medio y mayor será su capacidad antiinflamatoria. Los cuatro grupos de andamios exhibieron capacidad de remoción de NO, sin embargo,

se observaron diferencias entre aquellos en los que había presencia de extracto de *M. oleifera* en su formulación. Los resultados mostraron que los compuestos contenidos en los andamios fueron liberados dentro de los primeros 60 min posteriores a estar en contacto con el medio acuoso. Por lo que la liberación de estos, pudieran proveer una respuesta antiinflamatoria en cuanto el andamio fuera colocado en el sitio lesionado. En el caso de andamios constituidos de Col./H.P. 2%, al no contener extracto de *M. oleifera*, su capacidad de remoción de NO puede ser atribuida a la incorporación de PEGMA, ya que se ha reportado previamente que el polietilenglicol (PEG) posee propiedades antiinflamatorias (Ackland et al., 2010). Los resultados en el caso de andamios constituidos solo por colágeno (Col.), mostraron que, si bien su capacidad de remoción de NO no es elevada, la matriz por sí sola, no afecta o inhibe la actividad de los compuestos contenidos en los andamios. En el caso de andamios de Col./M.O. 2% y Col./H.P. 2%/M.O. 2%, la incorporación del extracto de *M. oleifera* incrementó considerablemente la remoción de NO. Se ha reportado que metabolitos de esta planta, como rutina y quercetina, son polifenoles con efectos antiinflamatorios (Kim et al., 2005), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en los andamios que contienen el extracto de *M. oleifera* en su formulación. Los compuestos con propiedades antiinflamatorias actúan reduciendo la infiltración de neutrófilos e inhibiendo la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) por parte de células inflamatorias (Shimizu et al., 2000). Los flavonoides encontrados en extractos acuosos de *M. oleifera*, como rutina, quercetina, kaempferol y kaempferol-3-O glucósido, exhiben fuertes efectos antioxidantes capaces de reducir la inflamación en heridas e incrementar la epitelización *in vivo* (Ambiga et al., 2007; Park et al., 2010; Tran et al., 2011). Es por esto, que la actividad antiinflamatoria de un extracto puede ayudar a mejorar la cicatrización de una herida contribuyendo a modular la respuesta inflamatoria (Dunnill et al., 2017). Por lo que, si estos compuestos que actúan como neutralizadores además poseen propiedades antimicrobianas, pueden tener una función importante en el mejoramiento del proceso de cicatrización de heridas.

Para determinar la capacidad antioxidante de los andamios, se empleó el ensayo ABTS, el cual se basa en la capacidad que tiene una sustancia para reaccionar con el radical catión ABTS^{•+}. La adición de los antioxidantes al radical preformado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración, como porcentaje de inhibición del radical ABTS^{•+}, está determinado en función de la concentración y el tiempo, así como el valor correspondiente usando el 6- hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox). Trolox es conocido por su alta capacidad antioxidante y, por lo tanto, es utilizado como compuesto de referencia y la actividad antioxidante es expresada como equivalentes Trolox (Oehlke et al., 2011). Los resultados mostraron que los andamios que no contenían extracto en su formulación, Col. y Col./H.P. 2%, no presentaron actividad antioxidante. En el caso de andamios de Col./M.O. 2% y Col./H.P. 2%/M.O. 2%, los valores expresados en nmol TEAC/mg andamio, incrementaron significativamente con

respecto a las formulaciones sin extracto. Con base en lo anterior, así como en el caso de la actividad antiinflamatoria, se atribuye la actividad antioxidante de los andamios al extracto de *M. oleifera* contenido en la formulación de estos andamios. En investigaciones llevadas a cabo en diferentes plantas, se ha indicado que los compuestos fenólicos contenidos en los extractos de éstas, es el mayor contribuyente de la actividad antioxidante que presentan (Skotti et al., 2014; Zhang et al., 2011). Estos resultados concuerdan con los presentados por Rubio-Elizalde et al. (2019), donde se encontró un incremento importante de la actividad antioxidante de andamios constituidos de alginato-PEGMA-extractos acuosos de *A. vera* y *M. oleifera*, con respecto a aquellos que no presentaban extracto de *M. oleifera* en su composición (Rubio-Elizalde et al., 2019). La producción de ROS es un mecanismo de defensa contra microorganismos invasores. Sin embargo, una producción excesiva de ROS puede causar efectos negativos en la cicatrización. Los niveles altos de ROS se asocian con la falta de cicatrización en heridas crónicas (Dunhill et al., 2017). Se ha reportado que, en estudios *in vivo* e *in vitro*, los extractos de hojas de *M. oleifera* exhiben capacidad antioxidante; lo anterior debido al abundante contenido de fenoles y flavonoides de esta planta (Chumark et al., 2008; Verma et al., 2009). En un estudio realizado para la estandarización de diferentes tipos de extractos de *M. oleifera*, se confirmó la presencia de ácido clorogénico, ácido gálico, ácido rosmarínico, quercetina, kaempferol, vicenin-2 y rutina, utilizando espectrometría de masas (Chin et al., 2018). El ácido clorogénico, un polifenol hidrofílico, ha sido descrito como un protector de la piel debido a los efectos contra el daño oxidativo inducido por UV, posiblemente mediante un mecanismo de reducción de ROS (Kitagawa et al., 2011). Los polifenoles como rutina (quercetin-3-rutinósido) y su metabolito quercetina, han sido descritos como protectores de la piel, debido a que no mostraron propensión a formar ulceraciones en heridas en un modelo *in vivo* (Lauro et al., 2002), además de mostrar propiedades antiinflamatorias. Con base en los resultados, así como en los múltiples reportes antes mencionados, se espera que la capacidad antioxidante de los andamios promueva la cicatrización de heridas al reducir la concentración de ROS hasta niveles adecuados para este proceso.

Un exceso de proteasas en heridas ocasiona la degradación de la MEC recién formada y de otras proteínas, como factores de crecimiento y sus receptores. En consecuencia, se producen trastornos de la cicatrización debido a los daños en la MEC y a la prolongación anormal de la fase inflamatoria de la cicatrización, que impide que la herida avance hacia la fase proliferativa (Gibson y Schultz, 2009). Se ha reportado que los compuestos fitoquímicos contenidos en algunas plantas pueden inhibir la actividad de esta enzima (Melzig et al., 2001; Alasbahi y Melzig, 2008; Wittenauer et al., 2015), por lo que en este trabajo se evaluó el efecto de los compuestos liberados por los materiales formulados en la actividad de elastasa. Los resultados obtenidos no mostraron evidencia significativa en la inhibición de esta enzima, en ninguna de las cuatro formulaciones de andamios; incluso en muestras tomadas a los 15 min de inmersión de cada andamio en

agua, donde en resultados de experimentos de actividad antioxidante y antiinflamatoria, se evidenció la presencia de compuestos fitoquímicos. Una causa probable puede estar relacionada al tipo de extracción realizada. La polaridad de los solventes influye significativamente en los efectos inhibitorios de un extracto (Alasbahi y Melzig, 2008). Realizar la extracción utilizando solventes no polares pudo haber producido extractos con efecto inhibitorio de metaloproteasas (Lee et al., 1999), tales como elastasa. Sin embargo, para los fines de este trabajo, la utilización de un extracto acuoso era de crucial importancia, debido a las características deseadas en los materiales diseñados, ya que la hidrofiliidad del andamio tiene una función crucial para su aplicación en tejidos lesionados.

Se determinó la viabilidad celular de fibroblastos dérmicos humanos de la línea CCD-1112 sk, en presencia de los cuatro tipos de andamios, mediante el ensayo colorimétrico del (3-[4,5, dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio) (MTS). El ensayo MTS mide la actividad metabólica de las células, la cual se ve reflejada en la conversión de la sal de tetrazolio de MTS a cristales de formazán. Cualquier incremento o decremento en el número de células viables puede ser detectada midiendo su concentración, la cual puede cuantificarse mediante densidad óptica a una longitud de onda de 450 nm (van Meerloo et al., 2011). La viabilidad celular de los fibroblastos, en los cuatro tipos de andamios, se expresó como la absorbancia a 450 nm de las muestras remanentes después de los diferentes periodos de incubación. En el caso de los andamios constituidos solo de colágeno, al tercer día de incubación se observó un incremento en el porcentaje de viabilidad celular con respecto a los tres grupos de andamios evaluados (Col./M.O. 2%, Col./H.P. 2% y Col./H.P. 2%) bajo las mismas condiciones. Después de 6 y 10 días de incubación, esta respuesta se mantuvo, mientras las células viables incrementaron en el caso de los andamios de colágeno (Col.). Se ha propuesto que la capacidad de absorción de agua presentada en andamios es una característica crucial para promover la proliferación y adhesión de células en estos materiales (Depan et al., 2011). Nuestros resultados concuerdan con lo anterior, ya que los andamios constituidos solo de colágeno presentaron la mayor capacidad de absorción de agua, después de 150 min de inmersión en un medio acuoso, para conocer como pudiera responder en condiciones fisiológicas. Se ha reportado que el extracto acuoso de hojas de *M. oleifera* promueven la proliferación de fibroblastos dérmicos humanos (Chin et al., 2018). Sin embargo, en el caso de los andamios formulados con este extracto, los resultados de proliferación fueron menores en comparación con aquellos que no tenían el extracto de esta planta. Una de las causas de esto pudiera deberse a la concentración a la que fue utilizado este extracto. Estudios realizados en apósitos de alginato-PEGMA, con la misma concentración de extracto de *M. oleifera*, mostraron resultados similares después de 10 días de incubación (Rubio-Elizalde et al., 2019). Sin embargo, aunque la viabilidad celular no incremento, la actividad antimicrobiana mostró resultados favorables a esta concentración, ya que inhibe el crecimiento de bacterias asociadas a

infecciones de heridas crónicas, lo que en el caso de ser colocado en un sitio lesionado pudiera ayudar a la cicatrización.

Capítulo 5. Conclusiones

En este trabajo se prepararon andamios a base de colágeno-HEMA/PEGMA y compuestos fitoquímicos, provenientes de una planta con propiedades medicinales, para promover la cicatrización de heridas. De las cuatro plantas evaluadas (*M. oleifera*, *H. virginiana*, *C. officinalis* y *A. vera*), el extracto acuoso de *M. oleifera* fue el único que mostró actividades antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana contra *S. aureus* y *K. pneumoniae*, bajo las condiciones de preparación de los extractos utilizadas en este trabajo. Por lo tanto, se seleccionó el extracto de *M. oleifera* al 2% (m/v) y se fabricaron cuatro grupos de andamios: (1) Col., (2) Col./M.O.2%, (3) Col./H.P.2% y (4) Col./H.P.2%/M.O.2%.

Todos los materiales obtenidos fueron porosos, sin embargo, el tamaño de poro y su distribución cambiaron al incorporar HEMA/PEGMA a los andamios a base de colágeno. En el caso de los andamios constituidos de Colágeno (Col.) y Col./M.O.2%, los poros presentaron diámetros que oscilaron entre los 50-120 μm . Mientras que en los andamios a base de colágeno y HEMA/PEGMA el tamaño de poro fue menor a 100 μm . Por lo tanto, disminuyó el tamaño de poro de los andamios al incorporar estos polímeros a la formulación.

Los andamios a base de Col./M.O. 2% y Col./H.P. 2%/M.O. 2%, tuvieron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *K. pneumoniae*. Mientras que los andamios que no contenían *M. oleifera* no inhibieron el crecimiento de las bacterias. Los cuatro grupos de andamios exhibieron capacidad de remoción de NO, la cual se relaciona con la capacidad antiinflamatoria de los materiales. En el caso de andamios de Col./M.O. 2% y Col./H.P. 2%/M.O. 2%, la incorporación del extracto de *M. oleifera* incrementó considerablemente la remoción de NO. Con respecto a la actividad antioxidante, los andamios que no contenían extracto en su formulación, Col. y Col./H.P. 2%, no presentaron actividad antioxidante. En el caso de andamios de Col./M.O. 2% y Col./H.P. 2%/M.O. 2%, los valores expresados en nmol TEAC/mg andamio, incrementaron significativamente con respecto a las formulaciones sin extracto. Por lo tanto, la actividad antimicrobiana, capacidad de remoción de NO, asociada a su capacidad antiinflamatoria, y actividad antioxidante de los materiales fabricados se atribuyen al extracto de *M. oleifera* incorporado.

Con respecto a la biocompatibilidad de los materiales obtenidos, en el caso de los andamios constituidos solo de colágeno, al tercer día de incubación se observó un incremento en el porcentaje de viabilidad celular con respecto a los tres grupos de andamios evaluados (Col./M.O. 2%, Col./H.P. 2%/M.O. 2% y Col./H.P. 2%) bajo las mismas condiciones. Después de 6 y 10 días de incubación, esta respuesta se mantuvo, mientras las células viables incrementaron en el caso de los andamios de colágeno (Col.).

Aunque la viabilidad celular no incrementó en los materiales de los grupos que contenían el extracto de *M. oleifera*, i.e., Col./M.O. 2%, y Col./H.P. M.O.2%, estos andamios sí mostraron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *K. pneumoniae*, dos de las principales bacterias asociadas a infecciones de heridas crónicas y de tejidos blandos.

Con base en los resultados obtenidos, en este trabajo se optimizaron las condiciones de fabricación de los andamios al punto en que se obtuvieron materiales con estabilidad estructural modificada, sin afectar las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, ni antimicrobianas del extracto de *M. oleifera* contenido en los andamios. Por lo tanto, los materiales fabricados son una excelente opción para continuar su evaluación para su aplicación en la cicatrización de heridas.

Literatura citada

- Abdul-Ghani, M., Nawaf, G., Nawaf, F., Itzhak, B., Minuchin, O. Vardi, P. 2006. Increased prevalence of microvascular complications in type 2 diabetes patients with the metabolic syndrome. *Israel Medical Association Journal*. 8, 378-382.
- Ackland, G.L., Gutierrez Del Arroyo, A., Yao, S.T., Stephens, R.C., Dyson, A., Klein, N.J., Singer, M., Gourine, A. 2010. Low-molecular weight polyethylene glycol improves survival in experimental sepsis. *Critical Care Medicine*. 38 (2), 629-636.
- Agricert, México (2016). Recuperado en septiembre/2018 de: <http://www.agricert.mx>.
- Ahmad, Z., Shepherd, J.H., Shepherd, D.V., Ghose, S., Kew, S.J., Cameron, R.E., Best, S.M., Brooks, R.A., Wardale, J., Rushton, N. 2015. Effect of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and N-hydroxysuccinimide concentrations on the mechanical and biological characteristics of cross-linked collagen fibres for tendon repair. *Regenerative Biomaterials*. 2, 77-85.
- Akerele, O. 1993. Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. WHO. *Foro Mundial de la Salud*. 14 (4), 390-395.
- Alasbahi, R., Melzig, M. 2008. The *in vitro* inhibition of human neutrophil elastase activity by some yemeni medicinal plants. *Scientia Pharmaceutica*. 76 (3), 471-484.
- Altankov, G., Thom, V., Groth, T., Jankova, K., Jonsson, G., Ulbricht, M. 2000. Modulating the biocompatibility of polymer surfaces with poly (ethylene glycol): effect of fibronectin. *Journal of Biomedical Materials Research*. 52, 219-30.
- Ambiga, S., Narayanan, R., Gowri, D., Sukumar, D., Madhavan, S. 2007. Evaluation of wound healing activity of flavonoids from *Ipomoea carnea*. *Ancient Science of Life*. 26 (3), 45-51.
- Ayello, E. A., Baranoski, S. 2014. Wound care and prevention: 2014 survey results. *Advances in Skin and Wound Care*. 27, 371-380.
- Balaji, A., Vignesh, M., John A.A., Subramanian, A.P., Jaganathan, S.K., Selva, Kumar, M., Mohd Faudzi, A.A., Suprianto, E., Yusof, M. 2015. Biomaterials based nano-applications of *Aloe vera* and its perspective: a review. *The Royal Society of Chemistry Advances*. 5, 86199-862313.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S.K. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6, 71-19.
- Barrantes, E., Guinea, M. 2003. Inhibition of collagenase and metalloproteinases by aloins and aloe gel. *Life Sciences*. 72, 843-850.
- Basu, B., Ghosh, S. 2017. *Biomaterials for Musculoskeletal Regeneration: Concepts*. Ed. Springer.
- Bennett, R.N., Mellon, F.A., Foidl, N., Pratt, J.H., Dupont, M.S., Perkins, L., Kroon, P.A. 2003. Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (Horseradish tree) and *Moringa stenopetala* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 3546-3553.

- Berlanga-Acosta, J., Garcia del Barco, D., Cibrian-Vera, D., Savigne, W., López-Saura, P., Guillen-Nieto, G., Schultz, G.S. 2008. The pro-inflammatory environment in recalcitrant diabetic foot wounds. *International Wound Journal*. 5, 530-539.
- Bijina, B., Chellappan, S., Krishna, J.G., Basheer, S.M., Elyas, K.K., Bahkali, A.H., Chandrasekaran, M. 2001. Protease inhibitor from *Moringa oleifera* with potential for use as a therapeutic drug and as a seafood preservative. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 18, 273-281.
- Blakytyn, R., Jude, E.B. 2009. Altered molecular mechanisms of diabetic foot ulcers. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*. 8, 95-104.
- Bloomgarden, Z.T. 2008. The diabetic foot. *Diabetes Care*. 31, 372-376.
- Brahma, N.S., Singh, B.R., Singh, R.L., Prakash, D., Dhakarey, R., Upadhyay, G., Singh, H.B. 2009. Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. *Food and Chemical Toxicology*. 47, 1109-1116.
- Brem, H., Tomic-Canic, M. 2007. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *Journal of Clinical Investigation*. 117, 1219-22.
- Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie. Phytochimie, plantes medicinales* (2da ed.). Tec et Doc., Lavoisier. Paris, France. 915.
- Budovsky, A., Yamolinsky, L., Ben-Shabat, S. 2015. Effect of medicinal plants on wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 23, 171-183.
- Campbell, J.J., Botos, L.A., Sargeant, T.J., Davidenko, N., Cameron, R.E., Watson, C.J. 2014. A 3-D *in vitro* co-culture model of mammary gland involution. *Integrative Biology*. 6, 618-626.
- Canton, R., García-Sánchez, J.E., Gómez-Lus, M.L., Martínez-Martínez, L., Rodríguez-Avial, C., Vila, J. 2000. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad de antimicrobianos. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Cañada-Rodríguez, A., Antúnez-Coca, J., Escalona-Arranz, J.C. 2018. Estandarización de parámetros para el control de la calidad del extracto blando de *Calendula officinalis*. *Revista Cubana de Tecnología de la Salud*. 9 (2), 65-76.
- Cardona, A.F., Wilson, S.E. 2015. Skin and soft-tissue infections: a critical review and the role of Telavancin in their treatment. *Antimicrobials for Skin Structure Infections*. 61 (Supp. 2), 69-78.
- Castro-Ceseña, A.B., Sánchez-Saavedra, M., Ruíz-Güereca, D.A. 2016. Optimization of entrapment efficiency and evaluation of nutrient removal (N and P) of *Synechococcus elongatus* in novel core-shell capsules. *Journal of Applied Phycology*. 28 (4), 2343-2351.
- Cervantes, M. y Martín, F. 2011. Una nueva visión del patrimonio cultural. *Academia Mexicana de la Ciencia*. 52 (1-2), 58-61.
- Chakraborty, G.S., Arora, R., Majee, C. 2011. Antidiabetic and antihyperlipidaemic effects of hydroalcoholic extract of *Calendula Officinalis*. *International Research Journal of Pharmacy*. 2, 61-65.

- Chakraborty, A., Saralaya, V., Adhikari, P., Shenoy, S. 2017. Virulence property, phylogenetic background, and resistance pattern of *Escherichia coli* isolates from wound infections. *Christian Medical College Journal of Health and Research*. 4 (4), 248-252.
- Chang, S.J., Huang, Y.T., Yang, S.C., Kuo, S.M., Lee, M.W. 2012. *In vitro* properties of gellan gum sponge as the dental filling to maintain alveolar space. *Carbohydrate Polymers*. 88, 684-689.
- Chen, H., Lan, G., Ran, L., Xiao, Y., Yu, K., Lu, B., Dai, F., Wu, D., Lu, F. 2018. A novel wound dressing based on Konjac glucomannan/silver nanoparticle composite sponge effectively kills bacteria and accelerates wound healing. *Carbohydrate Polymers*. 183, 70-80.
- Chen, P.C., Wheeler, D.S., Malhotra, V., Odoms, K., Denenberg, A.G., Wong, H. 2002. A green tea-derived polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits I κ B kinase activation and IL-8 gene expression in respiratory epithelium. *Inflammation*. 26, 233-241.
- Chin, C.-Y., Jalil, J., Ng, P. Y., Ng, S.-F. 2018. Development and formulation of *Moringa oleifera* standardized leaf extract film dressing for wound healing application. *Journal of Ethnopharmacology*. 212, 188-199.
- Chumark, P., Khunawat, P., Sanvarinda, Y., Phornchirasilp, S., Phumala-Morales, N., Phivthong-ngam, L., Ratanachamnong, P., Srisawa, S., Pongrapeeporn, K.S. 2008. The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 116 (3), 439-446.
- Davidenko, N., Schuster, C.F., Bax, D.V., Farndale, R.W., Hamaia, S., Best, S.M., Cameron, R.E. 2016. Evaluation of cell binding to collagen and gelatin: a study of the effect of 2D and 3D architecture and surface chemistry. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 27, 148.
- Davidenko, N., Schuster, C.F., Bax, D.V., Raynal, N., Farndale, R.W., Best, S.M., Cameron, R.E. 2015. Control of crosslinking for tailoring collagen-based scaffolds stability and mechanics. *Acta Biomaterialia*. 25, 131-42.
- Depan, D., Girase, B., Shah, J. S., Misra, R. D. K. 2011. Structure-process-property relationship of the polar graphene oxide-mediated cellular response and stimulated growth of osteoblasts on hybrid chitosan network structure nanocomposite scaffolds. *Acta Biomaterialia*. 7, 3432-3445.
- Dissemond, J., Goos, M., Wagner, S.N. 2002. The role of oxidative stress in the pathogenesis and therapy of chronic wounds. *Der Hautarzt*. 53, 718-723.
- Dunnill, C., Patton, T., Brennan, J., Barret, J., Dryden, M., Cooke, J., Leaper, D., Georgopoulos, N.T. 2017. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International Wound Journal*. 14, 89-96.
- Eshra, K.A., Shalaby, M.M. 2017. Efflux pump inhibition effect of curcumin and phenylalanine arginyl β naphthylamide (PA β N) against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn infections in Tanta University hospitals. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*. 26 (1), 113-119.
- Falanga, V. 2005. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet*. 366, 1736-1743.

- Fronza, M., Heinzmann, B., Hamburger, M., Laufer, S., Merfort, I. 2009. Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*. 126, 463-467.
- García-García, R. M., Palou García, E. 2008. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas Selectivos de Ingeniería de Alimentos*. 2 (2), 41-51.
- Gibson, D.J., Schultz, G. 2009. Chronic wound diagnostic for matrix metalloproteinase: chronic wounds. *Wound Healing Southern Africa*. 2 (2), 68-70.
- Grabek-Lejko, D., Słowik, J., Kasprzyk, I. 2018. Activity of selected honey types against *Staphylococcus aureus* methicillin susceptible (MSSA) and methicillin resistant (MRSA) bacteria and its correlation with hydrogen peroxide and antioxidant capacity. *Farmacia*. 66 (1), 37-43.
- Grover, C.N., Cameron, R.E., Best, S.M. 2012. Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. *Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 10, 62-74.
- Guo, S., Dipietro, L.A. 2010. Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*. 89, 219-29.
- Habtemariam, S. 2002. Hamamelitannin from *Hamamelis virginiana* inhibits the tumour necrosis factor- α (TNF)-induced endothelial cell death *in vitro*. *Toxicol*. 40 (1), 83-88.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *The Lancet*. 344 (8924), 721-724.
- Harding, K., Armstrong, D.G., Barrett, S., Kaufman, H., Lázaro-Martínez, J.L., Mayer, D., Moore, Z., Romanelli, M., Queen, D., Schultz, G., Serena, T., Sibbald, G., Snyder, R., Strohal, R., Vowden, K., Vowden, P., Zamboni, P. 2011. Función de las proteasas en el diagnóstico de heridas: Revisión de un grupo de trabajo de expertos. *Wounds International*. Londres, Inglaterra.
- Harding, K.G., Morris, H.L., Patel, G.K., 2002. Clinical review. Healing chronic wounds: science, medicine, and the future. *British Medical Journal*. 324, 160-3.
- Hasan, A., Murata, H., Falabella, A., Ochoa, S., Zhou, L., Badiavas, E. 1997. Dermal fibroblasts from venous ulcers are unresponsive to the action of transforming growth factor-beta 1. *Journal of Dermatological Science*. 16, 59-66.
- Hedberg, E.L., Shiha, C.K., Lemoinea, J.J., Timmera, M.D., Liebschner, M.A.K., Jansenb, J.A., Mikosa, A.G. 2005. *In vitro* degradation of porous poly (propylene fumarate) / poly (D L-lactic-co-glycolic acid) composite scaffolds. *Biomaterials*. 26, 3215-3225.
- Hinderer, S., Lee-Layland, E., Schenke-Layland, K. 2016. ECM and ECM-like materials-Biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 97, 260-269.
- Hirth, D. A., Singer, A. J., Clark, R. A. F., McClain, S. A. 2012. Histopathologic staining of low temperature cutaneous burns: Comparing biomarkers of epithelial and vascular injury reveals utility of HMGB1 and hematoxylin phloxine saffron. *Wound Repair and Regeneration*. 20, 918-927.

- Hostettmann, K., Marston, A., Maillard, M., Hamburger, M. 1995. Phytochemistry of plants used in traditional medicine. Clarendon Press. Oxford.
- Huie, C. W. 2002. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 373, 23-30.
- Jansen, A., Cheffer, J., Svendsen, A. 1987. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of test methods. *Planta Medica*. 40, 395-398.
- Kaufman, P.B., Csake, L.J., Warber, S., Duke, J.A., Brielmann, H.L. 1999. Natural products from plants (1era Ed). CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Kavoosi, G. , Amirghofran, Z. 2017. Chemical composition, radical scavenging and antioxidant capacity of *Ocimum basilicum* essential oil. *Journal of Essential Oil Research*. 29 (2), 189-199.
- Kim, H., Kong, H., Choi, B., Yang, Y., Kim, Y., Lim, M. J., Neckers, L., Jung, Y. 2005. Metabolic and pharmaceutical properties of rutin, a dietary quercetin glycoside, for treatment of inflammatory bowel disease. *Pharmaceutical Research*. 22 (9), 1499-1509.
- Kim, S. S., Park, M.S., Gwak, S.J., Choi, C.Y., Kim, B.S. 2006. Accelerated bonelike apatite growth on porous polymer/ceramic composite scaffolds *in vitro*. *Tissue Engineering*. 12 (10), 2997-3006.
- Kitagawa, S., Yoshii, K., Morita, S-Y., Teraoka, R. 2011. Efficient topical delivery of chlorogenic acid by an oil-in-water micro emulsion to protect skin against UV-induced damage. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 59 (6), 793-796.
- Klouček-Popova, E., Popov, A., Pavlova, N., Krusteva, S. 1982. Influence of the physiological regeneration and epithelialization using fractions isolated from *Calendula officinalis*. *Acta Physiologica et Pharmacologica Bulgarica*. 8, 63-67.
- Knight, C.G., Morton, L.F., Onley, D.J., Peachey, A.R., Messent, A.J., Smethurst, P.A., Tuckwell, D.S., Farndale, R.W., Barnes, M.J. 1998. Identification in collagen type I of an integrin alpha2beta1-binding site containing an essential GER sequence. *Journal of Biological Chemistry*. 273, 33287-94.
- Korting, H.C., Schäder-Korting, M., Klövekorn, W., Klövekorn, G., Martin, C., Laux, P. 1995. Comparative efficacy of hamamelis distillate and hydrocortisone cream in atopic eczema. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 48, 461-465.
- Kumar-Ramadass, S., Perumal, S., Gopinath, A., Nisal, A., Subramanian, S., Madhan, B. 2014. Sol-gel assisted fabrication of collagen hydrolysate composite scaffold: A novel therapeutic alternative to the traditional collagen scaffold. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 6, 15015-15025.
- Labia, R., Fabre, C., Masson, J.M., Barthelemy, M., Pitton, J.S. 1979 *Klebsiella pneumoniae* strains moderately resistant to ampicillin and carbenicillin: characterization of a new beta-lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 5 (4), 375-82.
- Lauro, R. M., Torre, M. L., Maggi, L., De Simone, F., Conte, U., Aquino, R. T. 2002. Fast- and slow-release tablets for oral administration of flavonoids: rutin and quercetin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 28 (4), 371-379.

- Lee, B.Y. 2005. The Wound Management Manual. McGraw-Hill, Medical Pub. Division.
- Lee, C-H., Singla-A, A., Lee, Y. 2001. Biomedical applications of collagen: A review. International Journal of Pharmaceutics. 22, 1-22.
- Lee, K.K., Kim, J.H., Cho, J.J., Choi, J.D. 1999. Inhibitory effects of 150 plant extracts on elastase activity, and their anti-inflammatory effects. International Journal of Cosmetic Science. 21, 71-82.
- Li, B., Shan, C., Zhou, Q., Fang, Y., Wang, Y., Xu, F., Sun, G. 2013. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of cross-linked chitosan-glutaraldehyde. Marine Drugs. 11, 1534-1552.
- Liu, J., Xiao, J., Li, F., Shi, Y., Li, D., Huang, Q. 2018. Chitosan-sodium alginate nanoparticle as a delivery system for H-polylysine: preparation, characterization and antimicrobial activity. Food Control. 91, 302-310.
- Liu, Y., Min, D., Bolton, T., Nube, V., Twigg, S.M., Yue, D.K., McLennan, S.V. 2009. Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. Diabetes Care. 32, 137.
- Lobmann, R., Zemlin, C., Motzkau, M., Reschke, K., Lehnert, H. 2006. Expression of matrix metalloproteinases and growth factors in diabetic foot wounds treated with a protease absorbent dressing. Journal of Diabetes and its Complications. 2, 329-35.
- Maeda, M., Tani, S., Sano, A., Fujioka, K. 1999. Microstructure and release characteristics of the mini pellet, a collagen based drug delivery system for controlled release of protein drugs. Journal of Controlled Release. 62, 313-324.
- Maniatis, T., Fritsh, E.F., Sambrook, J. 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Martin, P. .1997. Wound Healing—Aiming for perfect skin regeneration. Science. 276, 75-81.
- Martinelli, D.J., Pavelka, M. S. 2016. The RipA and RipB peptidoglycan endopeptidases are individually non-essential to *Mycobacterium smegmatis*. Journal of Bacteriology. 198 (9), 1464-1475.
- Martínez-González, C.L., Martínez, L., Martínez-Ortiz, E.J., González-Trujano, M.E., Déciga-Campos, M., Ventura Martínez, R. Díaz-Reval, I. 2017. *Moringa oleifera*, a species with potential analgesic and anti-inflammatory activities. Biomedicine and Pharmacotherapy. 87, 482-488.
- Masaki, H., Atsumi, T., Sakurai, H. 1995. Protective activity of hamamelitannin on cell damage of murine skin fibroblast induced by UVB radiation. Journal of Dermatological Science. 10 (1), 25-34.
- McPherson, J.M., Sawamura, S., Armstrong, R. (1986). An examination of the biologic response to injectable, glutaraldehyde cross-linked collagen implants. Journal of Biomedical Materials Research. 20, 93-107.
- Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O.G. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chemistry. 91, 571-577.
- Melzig, M.F., Loser, B., Ciesielski, S. 2001. Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants. Pharmazie. 56, 967-970.

- Moghazy, A.M., Shams, M.E., Adly, O.A., Abbas, A.H., El-Badawy, M.A., Elsakka, D.M., Hassan, S.A., Abdelmohsen, W.S., Ali, O.S., Mohamed, B.A. (2010) The clinical and cost effectiveness of bee honey dressing in the treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 89, 276-281.
- Mogoşanua, G.D., Grumezescu, A.M. 2014. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *International Journal of Pharmaceutics*. 463, 127-136.
- Montheard, J.P., Chatzopoulos, M., Chappard, D. 1992. 2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA): chemical properties and applications in biomedical fields. *Journal of Macromolecular Science. Part C*. 32 (1), 1-34.
- Moura, L.I.F., Dias, A.M.A., Carvalho, E., de Sousa, E.C. 2013. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment-A review. *Acta Biomaterialia*. 9, 7093-7114.
- Mueller, M., Hobiger, S., Jungbauer, A. (2010) Anti-inflammatory activity from extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chemistry*. 122, 987-996.
- Muhammad, A.A., Arulselvan, P., Cheah, P.S., Abas, F., Fukarazi, S. 2016. Evaluation of wound healing properties of bioactive aqueous fraction from *Moringa oleifera* Lam on experimentally induced diabetic animal model. *Drug Design, Development and Therapy*. 10, 1715-1730.
- Muley, B.P., Khadabadi, S.S., Banarase, N.B. 2009. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 8, 455-465.
- Mullen, L.M., Best, S.M., Ghose, S., Wardale, J., Rushton, N., Cameron, R.E. 2015. Bioactive IGF-1 release from collagen–GAG scaffold to enhance cartilage repair *in vitro*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 26, 1-8.
- Muller, M., Trocme, C., Lardy, B., Morel, F., Halimi, S., Benhamou, P.Y. 2008. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 as predictor of wound healing. *Diabetic Medicine*. 25, 419-26.
- Murphy, G.F., Orgill, D.P., Yannas, I.V. 1990. Partial dermal regeneration is induced by biodegradable collagen-glycosaminoglycan grafts. *Laboratory Investigation*. 62, 305-13.
- Nascimento, G., Locatelli, J., Freitas, P.C., Silva, G.L. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31, 247-256.
- Natarajan, V., Krithica, N., Madhan, B., Sehgal, P.K. 2013. Preparation and properties of tannic acid cross-linked collagen scaffold and its application in wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*. 101 (B), 560-567.
- O'Brien, F.J. 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 14 (3), 88-95.
- O'Brien, T.F., Mayer, K.H., Hopkins, J.D., Farrell, J.J., Chao, L., Kent, R.L. 1985. Resistance to antibiotics in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *American Journal of Infection Control*. 6 (2), 64-67.
- Oehlke, K., Heins, A., Stöckmann, H., Sönnichsen, F., Schwarz, K. (2011). New insights into the antioxidant activity of Trolox in o/w emulsions. *Food chemistry*. 124 (3), 781-787.

- Pamfil, D., Vasile, C., Tarțău, L., Vereștiuc, L., Poiată, A. 2017. pH-Responsive 2-hydroxyethyl methacrylate/citraconic anhydride–modified collagen hydrogels as ciprofloxacin carriers for wound dressings. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 32 (4), 355-381.
- Pardau, M.D., Pereira, A.S.P., Apostolides, Z., Serem, J.C. y Bester, M.J. 2017. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Ilex guayusa* tea preparations: a comparison to *Camellia sinensis* tea. *Food and Function*. 8, 4601-4610.
- Parente, L.M., Lino Junior, R. de S., Tresvenzol, L.M., Vinaud, M.C., De Paula, J.R., Paulo, N.M. 2012. Wound healing and antiinflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012, 1-7.
- Park, B.K., Lee, S., Seo, J.N., Rhee, J.W., Park, J.B., Kim, Y.S., Choi, I.G., Kim, Y.E., Lee, Y., Kwon, H.J. 2010. Protection of burn-induced skin injuries by the flavonoid kaempferol. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*. 43 (1), 46-51.
- Peixoto, C. M., Dias, M. I., Alves, M. J., Calhelha, R. C., Barros, L., Pinho, S. P., Ferreira, I.C.F.R. 2018. Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry*. 253, 132-138.
- Pommier, P., Gomez, F., Sunyach, M.P., D'Hombres, A., Carrie, C., Montbarbon, X. 2004. Phase III randomized trial of *Calendula officinalis* compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 22, 1447-1453.
- Poole-Warren, L., Martens, P., Green, R. 2016. Biosynthetic polymers for medical applications. *Biomaterials*. 107, 18-27.
- Ratanavaraporn, J., Damrongsakkul, S., Sanchavanakit, N., Banaprasert, T., Kanokpanont, S. 2006. Comparison of gelatin and collagen scaffolds for fibroblast cell culture. *Journal of Metals, Materials and Minerals*. 16, 31-36.
- Rathi, B.S., Bodhankar, S.L., Baheti, A.M. 2006. Evaluation of aqueous leaves extract of *Moringa oleifera* Linn for wound healing in albino rats. *Indian Journal of Experimental Biology*. 44, 898-901.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26 (9-10), 1231-1237.
- Rubio-Elizalde, I., Bernáldez-Sarabia, J., Moreno-Ulloa, A., Vilanova, C., Juárez, P., Licea-Navarro, A.F., Castro-Ceseña, A.B. 2019. Scaffolds based on alginate-PEG methyl ether methacrylate-*Moringa oleifera*-*Aloe vera* for wound healing applications. *Carbohydrate Polymers*. 206, 455-467.
- Saxena, G., McCutcheon, A., Farmer, S., Towers, G.H.N., Hancock, R.E.W. 1994. Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*. *Journal of Ethnopharmacology*. 42, 95-99.
- Shah, A., Amini-Nik, S. 2017. The role of phytochemicals in the inflammatory phase of wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*. 18, 1068.
- Sharma, J.N., Al-Omran, A., Parvathy, S.S. 2007. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*. 15, 252-259.

- Shimizu, N., Watanabe, T., Arawaka, T., Fujiwara, Y., Higuchi, K., Kuroki, T. 2000. Pentoxifyline accelerates gastric ulcer healing in rats: roles of tumor necrosis factor Alpha and neutrophils during the early phase of ulcer healing. *Digestion*. 61, 157-164
- Shojaee, M., Navaee, F., Jalili-Firoozinezhad, S., Faturechi, R., Majidi, M., Bonakdar, S. 2015. Fabrication and characterization of ovalbumin films for wound dressing applications. *Materials Science and Engineering C*. 48, 158-164
- Singer, A.J., Clark, R. A. F. 1999. Cutaneous wound healing- Review article. *The New England Journal of Medicine*. 341, 738-746.
- Singha, N.P., Rani, M., Gupta, K., Sagarb, T., Kaura, I.R. 2017. Changing trends in antimicrobial susceptibility pattern of bacterial isolates in a burn unit. *Burns*. 43, 1083-1087.
- Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., Tarantilis, P.A. 2014. Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*. 53, 46-54.
- Slater, R. A., Lazarovitch, T., Boldur, I., Ramot, Y., Buchs, A., Weiss, M., Hindi, A., Rapoport, M. J. 2004. Swab cultures accurately identify bacterial pathogens in diabetic foot wounds not involving bone. *Diabetic Medicine*. 21, 705-709.
- Stanley, A.C., Park, H.Y., Phillips, T.J., Russakovsky, V., Menzoian, J.O. 1997. Reduced growth of dermal fibroblasts from chronic venous ulcers can be eliminated with growth factors. *Journal of Vascular Surgery*. 26, 994-999.
- Summerfield, A., Meurens, F., Ricklin, M.E. 2015. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Molecular Immunology*. 66, 14-21.
- Sun, S., Wang, G.-l., Huang, Y., Diwu, H.-l., Luo, Y.-C., Su, J., Xiao, Y.-H. 2017. The effects of 2-hydroxyethyl methacrylate on matrix metalloproteinases 2 and 9 in human pulp cells and odontoblast-like cells *in vitro*. *International Endodontic Journal*. 51, 157-166.
- Taboas, J.M., Maddox, R.D., Krebsbach, P.H., Hollister S.J. 2003. Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds. *Biomaterials*. 24 (1), 181-194.
- Tavakoli, J. 2016. Physico-mechanical, morphological and biomedical properties of a novel natural wound dressing material. *Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 65, 373-382.
- Thring, S., Hili, P., Naughton, D.P. 2009. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 9, 27.
- Thring, T., Hili, P., Naughton, D.P. 2011. Antioxidant and potential anti-inflammatory activity of extracts and formulations of white tea, rose, and witch hazel on primary human dermal fibroblast cells. *Journal of Inflammation*. 8, 27.
- Tran, N.Q., Joung, Y.K., Lih, E., Park, K.D. 2011. *In situ* forming and rutin-releasing chitosan hydrogels as injectable dressings for dermal wound healing. *Biomacromolecules*. 12 (8), 2872-2880.

- Tziampazis, E., Kohn, J., Moghe, P.V. 2000. PEG-variant biomaterials as selectively adhesive protein templates: model surfaces for controlled cell adhesion and migration. *Biomaterials*. 21, 511-520.
- van Meerloo, J., Kaspers, J.L., Cloos, J. 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, 2nd Edition. Ian A. Cree (ed.). *Methods in Molecular Biology*. Cap. 20, 731.
- Varaprasad, K., Vimala, K., Ravindra, S., Narayana-Reddy, N., Venkata-Subba-Reddy, G., Mohana-Raju, K. 2011. Fabrication of silver nanocomposite films impregnated with curcumin for superior antibacterial applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 22, 1863-1872.
- Vázquez-Armenta, F. J., Silva-Espinoza, B. A., Cruz-Valenzuela, M. R., González-Aguilar, G.A., Nazzaro, F., Fratianni, F. 2017. Antibacterial and antioxidant properties of grape stem extract applied as disinfectant in fresh leafy vegetables. *Journal of Food Science and Technology*. 54(10), 3192-3200.
- Veerasubramanian, P. K., Thangavel, P., Kannan, R., Chakraborty, S., Rachandran, B., Suguna, L., Muthuvijayan, V. 2018. An investigation of konjac glucomannan-keratin hydrogel scaffold loaded with *Avena sativa* extracts for diabetic wound healing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 165, 92-102.
- Verma, A.R., Vijayakumar, M., Mathela, C.S., Rao, C.V. 2009 *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food and Chemical Toxicology*. 47, 2196-2201.
- Villar del Fresno, A.M. 2001 *Hamamelis virginiana*: Fitoquímica, farmacología y terapéutica. *Farmacia Profesional*. 15, 86-9.
- Wade, R.J., Burdick, J.A. 2012. Engineering ECM signals into biomaterials. *Materials today*. 15 (10), 454-459.
- Wang, H., Feng, Y., An, B., Zhang, W., Sun, M., Fang, Z., Yuan, W., Khan, M. 2012. Fabrication of PU/PEGMA cross-linked hybrid scaffolds by *in situ* UV photopolymerization favoring human endothelial cells growth for vascular tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 23, 1499-1510.
- Wang, M. 2003. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials*. 24, 2133.
- Wilgus, T.A. 2008. Immune cells in the healing skin wound: influential players at each stage of repair. *Pharmacological Research*. 58, 112-116.
- Wittenauer, J., Mäckle, S., Sußmann, D., Schweiggert-Weisz, U., Carle, R. 2015. Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. *Fitoterapia*. 101, 179-187.
- Wu, W., Feng, X., Mao, T., Feng, X., Ouyang, H.W., Zhao, G., Chen, F. 2007. Engineering of human tracheal tissue with collagen-enforced poly-lactic-glycolic acid non-woven mesh: A preliminary study in nude mice. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 45, 272-278.

- Yang, J., Shi, G., Bei, J., Wang, S., Cao, Y., Shang, Q., Yang, G., Wang, W. 2002. Fabrication and surface modification of microporous poly (L-lactic acid) and poly (L-lactic-co-glycolic acid) (70/30) cell scaffolds for human skin fibroblasts cell culture. *Journal of Biomedical Materials Research*. 62, 438-446.
- Yunoki, S., Ikomab, T., Tanakab, J. 2010. Development of collagen condensation method to improve mechanical strength of tissue engineering scaffolds. *Materials Characterization*. 61, 907-911.
- Zhang, L., Ravipati, A. S., Koyyalamudi, S. R., Jeong, S. C., Reddy, N., Smith, P. T., Bartlett, J., Shanmugam, K., Munch, G., Wu, M.J. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 12361-12367

ANEXO 1.

Actividad antimicrobiana de extractos acuosos.

Selección de controles. Se utilizó carbenicilina como control positivo frente a cepas de *S. aureus*, *E. coli*, y *P. aeruginosa*. Se realizaron diferentes ensayos para lograr determinar la concentración idónea de carbenicilina a utilizar. Tomando como referencia la concentración de este antibiótico utilizada en varios artículos (Singha, 2017; Eshra y Shalaby, 2017; Martinelli y Pavelka, 2016), se colocaron en discos Whatman® de 6 mm estériles, 100 µg/disco de carbenicilina. Los halos obtenidos oscilaron entre los 19 y 21 mm, lo cual concuerda con el diámetro descrito en la bibliografía (Canton et al., 2000). Cabe mencionar que esta es la concentración estándar manejada por distintas casas comerciales (Bio-rad, BD, entre otros), para su utilización en ensayos de diagnóstico clínico.

Se utilizó tetraciclina (30 µg/disco), como control positivo para los ensayos frente a *K. pneumoniae*, dado que la mayoría de las cepas de esta bacteria son resistentes a carbenicilina, como se ha descrito en múltiples artículos desde hace algunos años (Labia et al., 1979; O'Brien et al., 1985).

Utilizamos agua destilada estéril como control negativo (30 µl/disco), debido a que las extracciones de compuestos fitoquímicos a partir de plantas se realizaron en medio acuoso.

ANEXO 2.

Entrecruzamiento por calor de andamios

Una vez desmoldados, los andamios resultantes fueron sometidos a un entrecruzamiento por deshidratación por calor. Andamios de cada una de las condiciones antes descritas, se sometieron a este entrecruzamiento a diferentes temperaturas, entre 100 y 140 °C y en vacío (88 kPa) (Horno Lab Line, Thermo Fischer Scientific).

Inicialmente los andamios obtenidos fueron entrecruzados a 140 °C durante 24 h, sin embargo, después de efectuar pruebas de actividad antimicrobiana (sección 2.3.1.), se determinó que el entrecruzamiento no era el adecuado, por lo que se procedió a entrecruzar a esta misma temperatura a diferentes periodos de tiempo (1, 4, 8, 16 y 20 h). Los datos obtenidos de este procedimiento se presentan en la sección de resultados.

Posteriormente, los andamios fueron sometidos a un entrecruzamiento por calor a diferentes temperaturas (100, 110, 120, 130 °C). Encontrando que la temperatura ideal para entrecruzamiento, para las condiciones presentadas en este trabajo, era de 100 °C. Una vez obtenido este dato, se procedió a revisar el tiempo de entrecruzamiento a esta temperatura, encontrando que el periodo ideal para las condiciones que tenemos es de 1 h. En la sección de resultados se amplía la información antes descrita.