



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

CENTRO DE NANOCIENCIAS Y
NANOTECNOLOGÍA

**DESARROLLO DE UN MATERIAL BIOACTIVO A
BASE DE ALGINATO - METIL ÉTER
METACRILATO PEG - *Moringa oleifera* - *Aloe vera*
PARA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS**

T E S I S

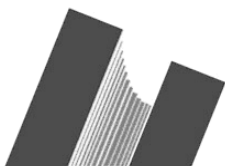
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

ITZEL RUBIO ELIZALDE

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ANA BERTHA CASTRO CESEÑA



ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, ENERO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

Itzel Rubio Elizalde

Ensenada B.C., enero 2019

*A mis padres, Olga y Oswaldo, y a mi hermana, Mayra,
por su amor, dedicación y ejemplo.*

*A todas las personas que ayudaron a sanarme
para retomar mis estudios y disfrutar de la vida.*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana Bertha Castro Ceseña por acogerme en su grupo de investigación, todo su apoyo y sus invaluable enseñanzas al guiarme por este trabajo.

A la Dra. Johanna Bernáldez-Sarabia por su dedicación y disponibilidad durante los experimentos.

A mis compañeras de grupo Dany, Lesly y Ale por los momentos que pasamos juntas en el laboratorio.

A “los Chichos”, “las Marielas”, “los Richards”, “los amigos de Jairo” y a mis demás amigos y compañeros de la licenciatura, por haber compartido mi vida en Ensenada, haciendo de ella algo inolvidable que siempre atesoraré.

A David y Cristo por formar parte de mi vida y enseñarme a amar.

Programa de Apoyo Complementario de Cátedras-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Cátedras-CONACYT) (No. 266145; 2015)

Ing. Luis Gradilla de Ciencias de la Tierra, CICESE por su ayuda con las imágenes SEM. Dr. Enrique Iñiguez-Pacheco de Centro Mexicano de Innovación en Energía Geotérmica (CeMIEGeo) por su ayuda con XRD.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES

Publicación de artículo

Rubio-Elizalde, I., Bernáldez-Sarabia, J., Moreno-Ulloa, A., Vilanova, C., Juárez, P., Licea-Navarro, A., y Castro-Ceseña, A.B. (2018). Scaffolds based on alginate-PEG methyl ether methacrylate-Moringa oleifera-Aloe vera for wound healing applications. *Carbohydrate polymers*, 206, 455-467.

Presentaciones

Rubio-Elizalde, I., Castro-Ceseña, A.B. “Development and characterization of *A. vera* multifunctional dressings”. 31st Annual Undergraduate Research Conference, UC San Diego, Estados Unidos, 2018.

Rubio-Elizalde, I., Castro-Ceseña, A.B. POSTER: “Development and characterization of multifunctional *Aloe vera* wound dressings”. IV Simposio Internacional de Nanociencias y Nanotecnología, CNyN-UNAM, México, 2018.

CONTENIDO

Resumen	1
1. Introducción	2
2. Marco Teórico	4
2.1. Heridas	5
2.2. Andamios	5
2.3. Alginato	6
2.4. Plantas Medicinales	8
2.4.1. <i>Aloe vera</i>	8
2.4.2. <i>Moringa oleifera</i>	9
2.5. Revisión de literatura	9
Hipótesis	14
Objetivos	15
3. Materiales y Métodos	
3.1. Materiales	16
3.2. Preparación de extractos acuosos de <i>A. vera</i> y <i>M. Oleifera</i>	16
3.3. Preparación del material matriz plastificado	17
3.4. Preparación de materiales bioactivos	17
3.5. Caracterización espectroscópica	18
3.6. Caracterización microscópica	19

3.7. Manejo y estabilidad	19
3.8. Absorción de agua de los materiales bioactivos	20
3.9. Pruebas colorimétricas de los extractos liberados	20
3.9.1. Contenido fenólico	20
3.9.2. Actividad antioxidante	21
3.9.3. Neutralización de óxido nítrico	21
3.10. Actividad antibacteriana de los materiales bioactivos	22
4. Resultados y Discusión	23
4.1. Efecto de PEGMA en el material Alginato-Ca	23
4.2. Apariencia y microestructura de materiales bioactivos	27
4.3. Absorción de agua y liberación de extractos de los materiales bioactivos	30
4.4. Contenido fenólico, actividad antioxidante y anti-inflamatoria de los materiales bioactivos	33
4.5. Actividad antibacteriana de los materiales bioactivos	35
5. Conclusiones	38
Recomendaciones	39
Bibliografía	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. <i>Entrecruzamiento de alginato con Ca²⁺. Bloques de ácidos glucurónico (G) y mannurónico (M). (Fuente: Khalil, Tye, ... & Syakir, 2017)</i>	7
2. <i>Fabricación de materiales bioactivos. (A) Obtención de extractos. (B) Entrecruzamiento de alginato con Ca. (C) Incorporación de extractos y enmoldamiento.</i>	18
3. <i>Espectros FT-IR de alginato-Na en polvo, material alginato-Ca, material alginato-Ca-PEGMA y PEGMA.</i>	24
4. <i>Patrones de difracción de alginato-Na en polvo, material alginato-Ca, material alginato-Ca-PEGMA y PEGMA.</i>	25
5. <i>Efecto de PEGMA en la retención de forma entre alginato-Ca y alginato-Ca-PEGMA. La circunferencia original se muestra con una línea roja punteada y con flechas se señalan los cambios de forma.</i>	26

6.	<i>Efecto de PEGMA en la degradación del material en medio acuoso. El contorno de los fragmentos se delineó con blanco para mostrar los cambios de forma y con flechas rojas se señalan pequeños segmentos.</i>	27
7.	<i>Fotografías (A-D) y micrografías SEM de materiales bioactivos de vista superior (a-d) y corte transversal (a'-d').</i>	29
8.	<i>Tamaño de poro de los materiales bioactivos en vista superior (S) y corte transversal (T). Las barras verticales representan los errores estándar de las medias (n≥18).</i>	30
9.	<i>Absorción de agua de los materiales compuestos. Las barras verticales representan las desviaciones estándar de las medias (n=3).</i>	32
10.	<i>Liberación de extractos en AV, AV-MO, AV-2MO. Las barras verticales representan las desviaciones estándar de las medias (n=3).</i>	32
11.	<i>Actividad antibacteriana de los materiales bioactivos utilizando como control positivo (C+) un disco de D=0.6mm con carbenicilina. A) Actividad contra S. aureus. B) Actividad contra E. coli. Las barras verticales representan las desviaciones estándar de las medias y los asteriscos señalan las diferencias entre medias (n=3, Tukey p≤0.05).</i>	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
<i>I.</i>	<i>Contenido fenólico, actividad antioxidante y neutralización de NO de los materiales bioactivos.</i>	33

RESUMEN

En este trabajo se desarrollaron materiales bioactivos sintetizados a partir de la gelificación, congelación y liofilización de alginato-Ca con la incorporación de metil éter metacrilato PEG (PEGMA) y extractos de *Aloe vera* y *Moringa oleifera* para aplicación como andamios para la cicatrización de heridas. Los materiales tuvieron una estructura porosa con tamaño de poro de ~100µm. El PEGMA plastificó el material, mejorando su manejo y retardando la degradación en agua, sin comprometer su porosidad, que es un requisito indispensable para su aplicación como andamio. Mientras que el *A. vera* contribuyó a la absorción de agua y *M. oleifera* proporcionó actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, actividad antioxidante y actividad anti-inflamatoria (relacionada a remoción de óxido nítrico). Debido a dichas propiedades favorables para la cicatrización de heridas, los materiales creados con *A. vera* y *M. oleifera* son prometedores para aplicaciones como andamios.

INTRODUCCIÓN

El tratamiento de heridas es una de las patologías más frecuentes en la medicina, ya sean heridas abiertas, quirúrgicas, quemaduras, úlceras, etc., éstas deben recibir tratamiento para su cicatrización completa. Se estima que en países desarrollados el peso económico del tratamiento de heridas ocupa del 3-6 % del gasto de los sistemas nacionales de salud (Järbrink et al., 2017). Por ello, se buscan materiales que mejoren y aceleren la cicatrización y de ser posible, mantengan bajos costos de producción.

Las heridas pueden clasificarse en agudas y crónicas. Las primeras son aquellas cuya cicatrización no sufre algún impedimento o retraso en las distintas etapas (inflamación, proliferación celular, desarrollo de matriz extracelular y re-epitelización). Por otro lado, las heridas crónicas se definen como aquellas que se encuentran detenidas en alguna de las etapas de la cicatrización sin poder completar el proceso. Las heridas crónicas comúnmente son a causa de condiciones o enfermedades del paciente tales como diabetes, enfermedades vasculares o autoinmunes, y presentan características como hinchamiento prolongado, infecciones (e.g. *S. aureus*), exceso de exudado, etc. (Eming, Martin, & Tomic-Canic, 2014).

Entre los materiales de curación, los andamios son un tipo de estructura que permite la adhesión y proliferación celular en su interior, sirviendo de soporte

para éstas y mimetizando el sitio de implantación. Andamios fabricados a partir de biopolímeros tales como alginato, colágeno, celulosa, gelatina, quitosano, etc., han mostrado propiedades beneficiosas para la cicatrización de heridas y son favorables debido a su biocompatibilidad. Entre ellos, el alginato es un biopolímero que es de fácil manejo y gelificación, mientras que permite la carga y liberación de fármacos u otros compuestos activos y posee una alta disponibilidad comercial.

Los materiales gelificados, llamados hidrogeles, han sido objeto de extensas investigaciones en las últimas décadas, ya que se ha observado que al mantener un ambiente húmedo en la herida mejora su cicatrización. No obstante, para aplicaciones de andamios es necesario que estos tengan ligandos para la adhesión celular, los cuales no tiene el alginato puro y es necesaria su modificación o complementación con proveedores de dichos ligandos (Augst, Kong, & Mooney, 2006).

En la medicina tradicional las heridas se tratan haciendo uso de plantas medicinales, cuyas propiedades incluyen actividades anti-inflamatoria, antioxidante, antibacteriana, además, en algunas plantas se ha reportado la estimulación de proliferación celular. *Aloe vera* es una de las plantas más reconocidas y utilizadas por sus propiedades curativas, especialmente las de su gel interno. Por otra parte, *Moringa oleifera* es una planta en creciente uso por las amplias propiedades terapéuticas de sus compuestos activos.

En el presente trabajo de tesis se describe la metodología de preparación de andamios a base de alginato para su aplicación en cicatrización de heridas, al igual que su caracterización de propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y antibacterianas.

2.1 Heridas

La cicatrización de heridas conlleva varios eventos biológicos y moleculares. Inmediatamente tras una herida se activa la hemostasis e inflamación. Posteriormente ocurre la proliferación y migración celular (principalmente queratinocitos y fibroblastos), el desarrollo de matriz extracelular (MEC) y angiogénesis. Por último se lleva a cabo el proceso de re-epitelización y remodelación de MEC, durante el cual se forma la cicatriz (Falanga, 2005; Eming et al., 2014). Una herida que cicatriza completando estos pasos se denomina aguda.

Cuando el proceso de cicatrización se queda arrestado en una etapa sin concluir las demás correctamente la herida se determina herida crónica, las cuales comúnmente se deben a enfermedades vasculares o diabetes, aunque también influye la edad del paciente o la existencia de una deficiencia nutricional o inmunológica (Eming et al., 2014). Las heridas crónicas comparten algunas características como inflamación prolongada o excesiva, infecciones persistentes, exceso de proteasas, especies de oxígeno reactivo (ROS) y células senescentes (Frykberg & Banks, 2015).

La etapa que más frecuentemente se encuentra desregularizada en heridas crónicas es la inflamación, durante la cual se infiltran células del sistema inmune tales como neutrófilos. En heridas agudas los neutrófilos liberan ROS y proteasas para prevenir y combatir infecciones, sin embargo, en heridas crónicas se encuentran sobre-expresados, lo cual destruye la MEC y ocasiona daño celular, afectando la viabilidad y movilidad de fibroblastos y otras células para la regeneración de la herida (Frykberg & Banks, 2015). Altos niveles de ROS también han sido relacionados al desarrollo de infecciones polimicrobianas (Dhall et al., 2014).

Las infecciones en heridas tanto agudas como crónicas regularmente son polimicrobianas, siendo las bacterias Gram-positivas las más comunes. *Staphylococcus aureus* es la bacteria Gram-positiva de mayor prevalencia, seguida por *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativa), *Enterococcus spp.* (Gram-positiva), y *Escherichia coli*, también Gram-negativa. En heridas crónicas la incidencia de bacterias Gram-negativas aumenta en comparación con heridas agudas (Bowler, Duerden, & Armstrong, 2001; Cardona & Wilson, 2015).

Otro factor de importancia es el exudado, el cual es un líquido derivado del suero sanguíneo que supuran las heridas. Se produce durante la inflamación y contiene componentes inflamatorios, así como alto contenido proteico y de proteasas, contribuyendo a la cicatrización de heridas al servir de transporte de nutrientes y al proveer un ambiente húmedo. No obstante, debido a la inflamación prolongada en heridas crónicas, el exudado es más abundante, lo cual puede macerar el tejido y aumenta el riesgo de infecciones (Cutting & White, 1977).

2.2 Andamios

Los andamios son matrices biocompatibles para regeneración celular que imitan la MEC en composición y estructura para que las células puedan adherirse y proliferar. La mayoría tiene la función de degradarse tras un tiempo, para que la MEC pueda tomar su lugar. Los andamios deben poseer las propiedades mecánicas adecuadas para resistir el proceso de implantación y asemejarse al sitio de funcionamiento. Además, para la regeneración celular es necesaria una estructura a base de poros interconectados para que sea posible el crecimiento de células, vascularización y difusión de nutrientes y metabolitos (Freyman, Yannas, & Gibson, 2001).

Entre los métodos para crear estructuras porosas se encuentra la técnica de liofilización. Esta técnica consiste en dos pasos: primero se congela la suspensión del material a producir para crear cristales de solvente. Posteriormente el solvente es sublimado, dejando huecos/poros en la estructura final (Freyman et al., 2001).

2.3 Alginato

El alginato es un biopolímero descubierto en 1881 por E. C. C. Stanford, quien lo extrajo de las algas pardas (*Phaeophyceae spp.*). Desde entonces sus aplicaciones se han extendido a la industria alimentaria, textil y farmacéutica, mientras que también se ha logrado aislar de bacterias y producir sintéticamente (Augst et al., 2006). Ha presentado ser un material multiusos gracias a sus propiedades de alta biocompatibilidad y fácil gelificación, la cual es consecuencia de su estructura molecular.

El alginato está compuesto por bloques de ácidos glucurónico (G) y mannurónico (M) unidos covalentemente en distintas secuencias cuya

proporción depende de la fuente (Fig. 1) (Rehm, 2009). Los bloques de G uniones entre cadenas de alginato, entrecruzando iónicamente el material y resultando en un hidrogel (Fig. 1). El nivel de entrecruzamiento determina sus características físicas, a mayor entrecruzamiento del hidrogel, mayor dureza y estabilidad pero menor flexibilidad y porosidad (Rehm, 2009).

Los hidrogeles de alginato son comunes gracias a que su proceso de fabricación es sencillo y de bajo costo, resultando en un material biocompatible, especialmente al utilizar CaCl_2 como entrecruzante. Es por ello que los hidrogeles de alginato han sido utilizados como andamios para ingeniería de tejidos, sistemas de transporte para acarreo y liberación de fármacos y como modelos de MEC para investigaciones biológicas *in vitro* (Augst et al., 2006).

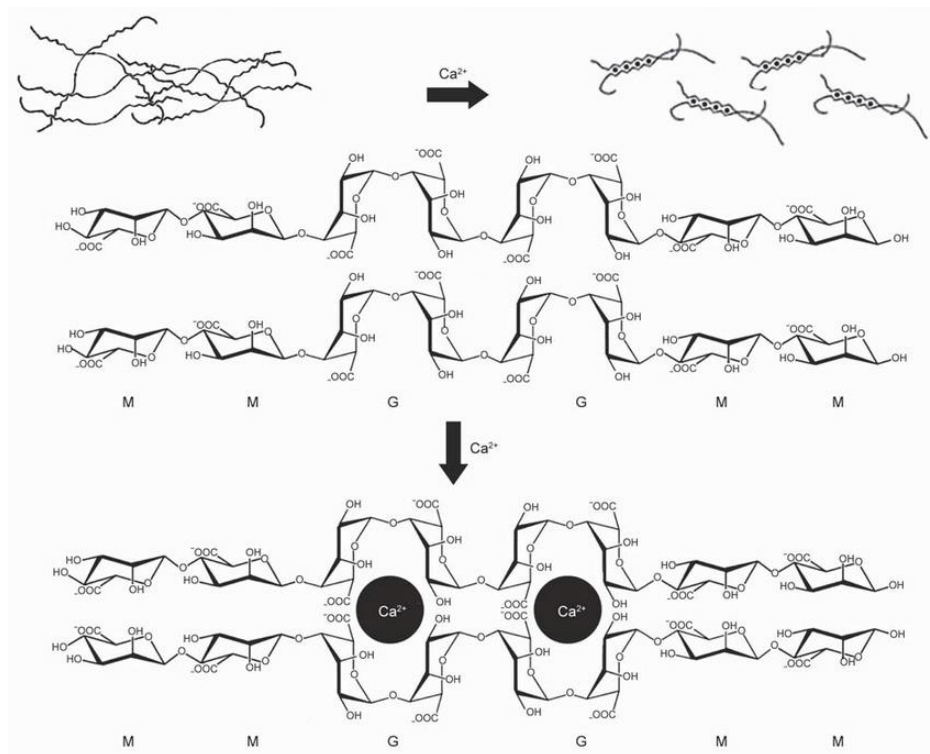


Fig. 1. Entrecruzamiento de alginato con Ca^{2+} . Bloques de ácidos glucurónico (G) y mannurónico (M). (Fuente: Khalil, Tye, ... & Syakir, 2017)

2.4 Plantas medicinales

La medicina tradicional hace uso de diversas plantas medicinales, de las cuales se han realizado una gran cantidad de investigaciones para comprobar y cuantificar sus efectos, así como distinguir los compuestos activos que proveen las propiedades medicinales. El estudio y uso de plantas medicinales ha llevado al desarrollo de métodos de curación y fármacos, siendo un importante motor de los avances en medicina y cuidado de la salud.

En las plantas medicinales se han identificado compuestos fitoquímicos tales como fenoles, flavonoides, taninos, quinonas, diferentes azúcares, proteínas, péptidos, etc., a los cuales se les han atribuido propiedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatorias, aumento de proliferación celular y producción de colágeno (Ghosh & Gaba, 2013). Además, se ha encontrado que varios de los efectos son debidos a sinergias entre los compuestos mencionados.

2.4.1 *Aloe vera*

Entre las plantas más estudiadas y utilizadas para fines terapéuticos se encuentra *Aloe vera*, la cual contiene glicoproteínas, antraquinonas, vitaminas, polisacáridos, etc., relacionados con propiedades anti-alérgicas, antioxidantes, anti-inflamatorias, estimulación de angiogénesis y proliferación celular (Choi & Chung, 2003). En las aplicaciones tópicas de *A. vera*, se ha observado que los componentes activos de *A. vera* mejoran la proliferación y migración de fibroblastos y formación de matriz extracelular (Balaji et al., 2015; Li et al., 2017). Casi el 90% de los componentes activos del *A. vera* se encuentran en el gel del interior de las hojas, el cual es 99% agua (Balaji et al., 2015).

2.4.2 *Moringa oleifera*

La *Moringa oleifera* es una planta de gran valor medicinal en India, de donde es originaria. Se utilizan distintas partes de la planta, tal como las hojas, las semillas, las flores y las raíces, ya que éstas varían en composición y por lo tanto en propiedades (Anwar, Latif, Ashraf, & Gilani, 2007). Las hojas contienen fenoles, flavonoides, taninos, alcaloides, esteroides, saponinas, vitaminas y minerales, a los cuales se les atribuyen propiedades antimicrobianas, antioxidantes y anti-inflamatorias (Gopalakrishnan, Doriya, & Kumar, 2016). Además, el extracto acuoso de *M. oleifera* ha demostrado inducir un aumento en la adhesión y proliferación de fibroblastos y queratinocitos humanos (Chin, Jalil, Ng, & Ng, 2018).

2.5. Revisión de literatura

En la investigación de Pereira et al., 2012 titulada “Development of novel alginate based hydrogel films for wound healing applications” se preparó y caracterizó un material en forma de película compuesto de alginato y *Aloe vera* para aplicaciones dermales.

Fueron probadas soluciones de alginato/*A. vera* en proporciones de 95:5, 85:15 y 75:25 (alginato:*A.vera*, v/v). Además, los autores utilizaron glicerol como plastificante en concentración de 15 % m/m en relación al alginato. El método de fabricación consistió en la mezcla de soluciones y secado a temperatura ambiente para su posterior gelificación con CaCl₂.

Los autores declaran su interés en incorporar *A. vera* a su material debido a sus propiedades antimicrobianas, estimulación de proliferación de fibroblastos y síntesis de colágeno. No estudiaron ninguna de estas características en su material, sin embargo encontraron que el *A. vera* disminuye la transmisión de

rayos UV, protegiendo la herida, al igual que aumenta la absorción de agua del material y su estabilidad térmica. Por lo tanto, hace falta una caracterización de los efectos terapéuticos que pueda proporcionar el *A. vera* ya incorporado en un material de alginato.

Otra característica de interés en este trabajo es que utilizaron glicerol como plastificante. El plastificante mejoró las propiedades mecánicas del material, disminuyendo la rigidez y aumentando su elasticidad. Ambas son características deseables para aplicaciones de materiales de curación, ya que permiten que el material sea capaz de amoldarse a la herida. Por lo tanto la incorporación de un plastificante resulta de gran utilidad para la investigación en curso.

Hrynyk et al., 2012, en su trabajo “Alginate-PEG Sponge Architecture and Role in the Design of Insulin Release Dressings” también incorporaron un polímero a una matriz de alginato, logrando mantener una estructura tridimensional.

En su investigación probaron dos tipos de alginato, uno con alto contenido de M y otro con alto contenido de G, además de utilizar dos concentraciones distintas de cada uno, 2 y 4 % (m/v), para preparar las esponjas. De manera similar, utilizaron poli-etilenglicol (PEG) con masa molecular de 1.45 o 10 kDa a concentraciones de 0.1-10 % (m/m). Las variaciones permitieron observar la diferencia en la estructura del material resultante.

Los autores encontraron que entre las esponjas de alginato M y alginato G hubo una diferencia en la forma de poro, ya que las de tipo M tuvieron poros más definidos y espaciosos. Al incrementar la concentración de alginato (ya fuese M o G), incrementó el grosor de las paredes de los poros y el módulo de Young, lo cual se encuentra en acuerdo con estudios anteriores (Shapiro & Cohen, 1997).

La adición de PEG también contribuyó al grosor de las paredes de los poros, sin embargo, al aumentar la concentración de PEG, éste llenó los poros eliminando la microestructura. Además, encontraron que el PEG de menor masa fue mejor para la creación de esponjas, ya que las esponjas con PEG 10 kDa fueron demasiado frágiles para ser estiradas.

La esponja de alginato con PEG fue preparada por el método de liofilización, para lo cual previamente se congelaron las soluciones a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hr. La liofilización permitió obtener una estructura tridimensional con microestructura porosa, como comúnmente se observa al utilizar este método. La relevancia de este trabajo fue que demostraron posible la incorporación de PEG manteniendo una estructura tridimensional porosa, aunque con propiedades físicas variables.

Los autores no mencionaron una gelificación del alginato, por lo que se asume que no se llevó a cabo. La gelificación tiene un efecto drástico en la degradación del material ya que el material no gelificado se disuelve en agua. Es por ello que hace falta investigar si se puede llevar a cabo un material similar al de este trabajo pero a base de alginato gelificado (entrecruzado).

En el trabajo de Catanzano et al., 2017, "Composite Alginate-Hyaluronan Sponges for the Delivery of Tranexamic Acid in Postextractive Alveolar Wounds", se desarrolló y caracterizó extensivamente un material a base de alginato y hialuronano capaz de cargar y liberar ácido tranexámico.

La matriz fue sintetizada a partir de una solución de alginato de sodio 2 % (m/v) y hialuronano (HA) 10 o 20 % respecto al alginato. La gelificación se realizó utilizando carbonato de calcio y glucono delta-lactona a T_{amb} durante 24 hrs. Posteriormente, se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante la noche y se liofilizó.

La caracterización del material incluyó porosidad, densidad, dureza, degradación en gelatina, liberación del fármaco, viabilidad celular de keratinocitos en el material, índice de coagulación y absorción de agua. Éste último fue calculado sumergiendo el material en agua a 37 °C, y eliminando el exceso de agua con un pañuelo en periodos de tiempo definidos y comparando la diferencia de la masa del material húmedo respecto a la masa inicial.

El material obtenido fue tridimensional con poros interconectados de 300 ± 70 μm para alginato sin HA y 310 ± 14 μm , 320 ± 25 μm para alginato-HA 10 % y alginato-HA 20 % respectivamente. Ya que la muestra sin HA mostró la arquitectura deseada, ésta no es causa del HA si no del alginato. La absorción de agua de este material a base de alginato fue de alrededor de 5000 % para las tres condiciones: sin HA, HA 10 % y HA 20 %, a pesar de que aquellos con HA presentaron una mayor rapidez en alcanzar su máxima absorción. Además, se encontró que el material fue biocompatible y con buena actividad pro-coaguladora gracias al ácido tranexámico, por lo cual los autores lo consideran un material prometedor como sistema de liberación de fármacos en heridas alveolares.

Este trabajo da pauta a la investigación planteada, ya que demuestra la posibilidad de desarrollar estructuras tridimensionales con poros interconectados a base de alginato llevando a cabo el proceso de gelificación y liofilización. No obstante, para aplicaciones dermales es necesario modificar el tamaño de poro, ya que al ser otro tipo de células su crecimiento se verá favorecido sobre poros más pequeños que los del material desarrollado en este trabajo.

Adicionalmente, propone una concentración de alginato de la cual partir, conociendo que con ella el material podrá soportar la incorporación de otros

materiales o sustancias y aun así obteniendo la arquitectura deseada. En este trabajo se presenta un método factible para la cuantificación de absorción de agua en un material altamente absorbente, además de servir como punto de comparación para la presente investigación.

Los trabajos de la literatura consultada muestran estudios en biomateriales, incluyendo aspectos individuales como la síntesis de materiales porosos a base de alginato, la incorporación de agentes activos y la plastificación del material en películas delgadas. Sin embargo, en los trabajos mencionados no se ha investigado la plastificación de un material a base de alginato manteniendo una estructura tridimensional porosa, lo cual podría mejorar el manejo y estabilidad de un andamio durante su implantación. Asimismo, mejorar el material con la incorporación de extractos de *A. vera* y *M. oleifera* favorecería su uso como andamios para cicatrización de heridas.

En consecuencia, la hipótesis y objetivos del trabajo se presentan en la siguiente sección.

HIPÓTESIS

En consideración de las propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y antimicrobianas reportadas de *Aloe vera* y *Moringa oleifera*, en el presente trabajo de tesis se hipotetiza que la incorporación de *A. vera* y *M. oleifera* proveerán a los andamios a base de alginato propiedades que favorecen la cicatrización, mediante los efectos biológicos asociados al contenido polifenólico de éstas plantas. Mientras que la incorporación de un plastificante, como metil éter metacrilato-PEG, en la proporción óptima, mejorará las propiedades de manejabilidad y estabilidad en medio acuoso de los andamios sin comprometer la arquitectura porosa requerida para su aplicación como andamios.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un material bioactivo a base de alginato, con un mejor manejo y estabilidad en medio acuoso, al igual que propiedades para la cicatrización de heridas proporcionadas por *Aloe vera* y *Moringa oleifera*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Observar el efecto de plastificación con PEGMA del material alginato-Ca en términos de su manejo y estabilidad en medio acuoso.
- Distinguir la microestructura y corroborar la composición química del material creado.
- Evaluar las propiedades del material bioactivo en actividad antioxidante, actividad anti-inflamatoria y actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

3.1. Materiales

Hojas de *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) recolectadas en el Ecoparque del Colegio de la Frontera Norte, Tijuana, México. Hojas secas de *Moringa Oleifera* que se compraron a Stevia San Martín (certificado orgánico por Agricert México).

Sal sódica de ácido algínico de peso molecular 120,000 - 190,000 g / mol, proporción de ácido manurónico a ácido glucónico (M/G) de 1.56 (Sigma-Aldrich, No. cat. 180947). Metil éter metacrilato de polietilenglicol (PEGMA) Mn~500 (Sigma-Aldrich, No. cat. 447943). Cloruro de calcio (CaCl₂), reactivo de Folin-Ciocalteu, Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®), ácido gálico, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), nitroprusiato de sodio (SNP), reactivo de Griess y nitrito de sodio (NaO₂) se adquirieron de Sigma-Aldrich, México.

Las bacterias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Escherichia coli* (ATCC 25922) se obtuvieron de American Type Culture Collection, ATCC.

3.2. Preparación de extractos acuosos de *A. vera* y *M. Oleifera*

Hojas recién cortadas de *A. vera* se dejaron drenar durante la noche a 4 ° C para eliminar el látex amarillento. Se removió el exterior de la hoja y se recolectó el líquido espeso del gel interior, se congeló a -80 ° C y se liofilizó (Labconco FreeZone, 1 L) (Fig. 2.A).

Las hojas secas de *M. oleifera* se pulverizaron, el polvo se solubilizó en agua destilada a 75 °C durante 5 minutos y posteriormente se filtró la suspensión utilizando un filtro de 0.2 µm para obtener el extracto acuoso. El extracto se congeló a -80 °C y se liofilizó (Fig. 2.A).

Los extractos liofilizados se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

3.3. Preparación del material plastificado

Para la preparación del material alginato-Ca se solubilizó ácido algínico (3 % m/v) en agua destilada, para el material plastificado alginato-Ca-PEGMA se le agregó PEGMA (0.75 % v/v). El alginato se entrecruzó con CaCl₂ 1.5 % (m/v) en solución 1:1, mezclando con un homogenizador manual para obtener una solución final de alginato 1.5 % m/v, CaCl₂ 0.75 % m/v (PEGMA 0.375 % v/v) (Fig. 2.B). Esta metodología es una modificación de Shapiro & Cohen, 1997.

Las soluciones se vertieron en moldes de poliestireno (placas de cultivo celular de 24 pozos) con 600 µl en cada uno, se congelaron a -4 °C durante 48 h y se liofilizaron durante 24 h.

3.4. Preparación de materiales bioactivos

Basándose en resultados preliminares de actividad antibacteriana se seleccionó una concentración de *M. oleifera* 1 % ya que fue la mínima

concentración probada en sensibilizadores que presentó una inhibición a *S. aureus* similar al blanco de 15 µg de carbenicilina® (antibiótico comercial). En previsión de que la actividad antibacteriana del extracto se viese afectada al estar incorporado al material matriz, también se decidió probar *M. oleifera* 1 %. La concentración de *A. vera* se definió en 1 % ya que fue la máxima soportada por el material.

Los extractos se incorporaron a la matriz tras haberse entrecruzado las soluciones de alginato-PEGMA con CaCl₂ como se describió previamente, en condiciones AV (*A. vera* 1 %), AV-MO (*A. vera* 1 %, *M. oleifera* 1 %) y AV-2MO (*A. vera* 1 %, *M. oleifera* 2 %). Posteriormente, se vertieron en moldes, congelaron y liofilizaron de la manera descrita (Fig. 2.C).

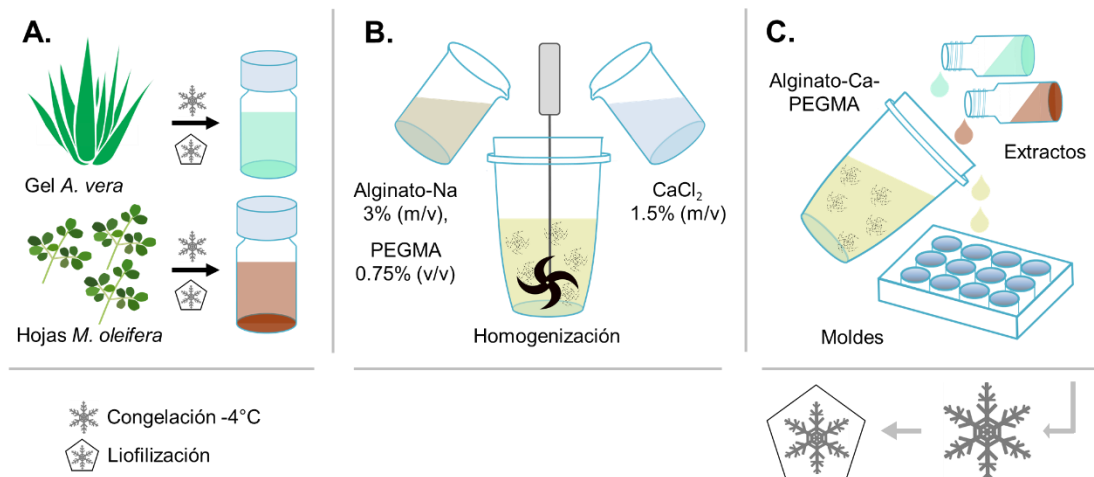


Fig. 2. Fabricación de materiales bioactivos. **(A)** Obtención de extractos. **(B)** Entrecruzamiento de alginato con Ca. **(C)** Incorporación de extractos y enmoldamiento.

3.5. Caracterización espectroscópica

Se analizaron los materiales alginato-Ca y alginato-Ca-PEGMA en un espectrofotómetro FT-IR (Agilent Cary 630, celda ATR) en el rango de 600 a 4000 cm^{-1} . De los mismos materiales se obtuvieron difractogramas superficiales en un microdifractómetro D8 ADVANCE (Bruker, Alemania) con radiación de $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$) de 5° a 70° , en el modo de exploración escalonada con escalones de 0.01° (2θ), 2 s por escalón con una dimensión de punto de 0,3 mm. Se utilizó un voltaje y corriente del tubo de rayos X de 40 kV y 40 mA, respectivamente.

3.6. Caracterización microscópica

Los materiales bioactivos AV, AV-MO, AV-2MO y el blanco de alginato-Ca-PEGMA se visualizaron de vista superior y corte transversal vertical en un microscopio electrónico de barrido de presión variable (SEM) EVO/MA15 ZEISS a un voltaje de 15 kV, magnificación de 100x. Únicamente se tomó una imagen por vista/condición, sobre la cual se midió el tamaño de poro por promedio del diámetro mayor y menor de todos los poros (mínimo 18 poros). No fue posible realizar un análisis estadístico del tamaño de poro debido a la falta de repeticiones de imágenes.

3.7. Manejo y estabilidad

Para estudiar el efecto de la plastificación con PEGMA se realizó una comparación en el manejo y estabilidad de los materiales alginato-Ca y alginato-Ca-PEGMA. En el manejo ambos materiales se flexionaron por completo dentro de pinzas cerradas, observando su capacidad de recuperación de la forma al compararse antes y después de ser flexionados.

La estabilidad se evaluó sobre la integridad de los materiales a los 0, 23, 86, 94 y 110 h de ser sumergidos en buffer de fosfatos (PBS) 1X a 37°C. No se reemplazó la solución de PBS durante el ensayo para evitar la perturbación de los materiales.

3.8. Absorción de agua de los materiales bioactivos

Utilizando los materiales alginato-Ca-PEGMA (Blanco), AV, AV-MO y AV-2MO, cada muestra de 15 mm de diámetro y 3 mm de altura se sumergió en 2 ml de agua destilada a 37°C tras haberse registrado su masa inicial. Las muestras permanecieron sumergidas durante 30, 60, 90 y 120 min, quitando el exceso de agua delicadamente con un pañuelo libre de pelusa (marca Kimwipe) y volviendo a pesar tras cada periodo para después volver a poner 2 ml de agua. Cada prueba se realizó por triplicado. La absorción de agua se calculó con la fórmula:

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

Donde M_t es la masa de la muestra al tiempo t ($t = 30, 60, 90, 120$) y M_0 la masa al tiempo $t = 0$.

3.9. Pruebas colorimétricas de los extractos liberados

De manera similar a medición de absorción de agua, cada muestra por triplicado de materiales Blanco, AV, AV-MO y AV-2MO se sumergió en agua destilada durante 30, 60, 90 y 120 min, cambiando el agua tras cada periodo y guardando cada alícuota de extractos liberados a 4°C para las pruebas colorimétricas.

3.9.1 Contenido fenólico

Se determinó el contenido fenólico de las liberaciones de materiales bioactivos AV, AV-MO y AV-2MO por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventos, 1999). De forma resumida, se mezcló 100 μ l de reactivo Folin-Ciocalteu 0.2 N con 20 μ l de muestra en una placa de 96 pozos y se incubó 5 minutos. Posteriormente se agregó 80 μ l de Na_2CO_3 700 mM y se incubó en oscuridad durante dos horas, a 22 °C, tras lo cual se midió la absorbancia en un lector de placas BioTek Epoch a 760 nm. Se calculó el contenido fenólico utilizando una curva estándar de ácido gálico (0-125 μ g/ml) por lo que los resultados se expresan en nmol de equivalente de ácido gálico por 10 mg de material. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

3.9.2 Actividad antioxidante

Se realizó un ensayo de DPPH (Skotti, Anastasaki, Kanellou, Polissiou, & Tarantilis, 2014) con la liberación de los materiales bioactivos AV, AV-MO y AV-2MO. Primeramente se mezclaron 50 μ l de alícuotas de liberación con 150 μ l de DPPH 60 μ M (solución etanólica) en una placa de 96 pozos. Se incubó la mezcla en oscuridad durante 30 min, 22 °C, tras lo cual se midió la absorbancia en el lector de placas a 517 nm. La capacidad antioxidante se calculó utilizando una curva estándar de Trolox® (0-100 mol/ml) y los resultados se expresaron en Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox® (TEAC por sus siglas en inglés). Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

3.9.3 Actividad anti-inflamatoria (relacionada a remoción de óxido nítrico)

Se determinó la capacidad de remoción de óxido nítrico (NO) de las liberaciones de los materiales Blanco, AV, AV-MO y AV-2MO por el ensayo de nitroprusiato de sodio (SPN) (Kavoosi & Amirghofran, 2017; Pardau, Pereira, Apostolides, Serem, & Bester, 2017). En una placa de 96 pozos se mezcló 80 µl de SNP 5 mM y 20 µl de muestra. Se incubó en oscuridad 60 min a 22 °C, tras lo cual se agregaron 100 µl de reactivo de Griess 1X y se volvió a incubar en oscuridad 15 min. La absorbancia se leyó a 540 nm y se calculó la remoción de NO con la siguiente fórmula:

$$\text{Remoción NO, \%} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

Donde $\text{Abs}_{\text{control}}$ es la absorbancia de reactivo de Griess con SNP y $\text{Abs}_{\text{sample}}$ es la absorbancia de reactivo de Griess con muestra.

3.10 Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de los materiales Blanco, AV, AV-MO y AV-2MO se determinó *in vitro* por Ensayo de Difusión en placas Petri de LB_{agar} (Collins, Lyne, & Grange, 1989). Se crecieron precultivos de *S. aureus* y *E. coli* en medio LB a 37 °C, 7 x g, hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) 1.0 a 600 nm. Éstos se utilizaron para inocular medio LB_{agar} a 1x10⁶ unidades formadoras de colonias (CFU) ml⁻¹ de *S. aureus* ó 0.5x10⁶ CFU ml⁻¹ de *E. coli*. Se seleccionó una densidad menor para *E. coli* ya que en pruebas preliminares fue posible obtener una capa homogénea de bacterias a esta concentración. Discos de 15 mm de diámetro de cada material se colocaron en placas de LB_{agar}, sobre los cuales se vertieron 10 ml de los cultivos *S. aureus* o *E. coli* en

3. Materiales y métodos

LB_{agar} mientras se encontraba líquido (alrededor de 40 °C). Se utilizó como control positivo un sensidisco Whatman de papel (diámetro de 6 mm) conteniendo 30 µl de carbenicilina 500 µg/ml. Las placas se incubaron a 37 °C durante 12 h para *S. aureus* y 6 h para *E. coli*. La actividad antibacteriana se determinó midiendo el diámetro de la zona de inhibición. Cada prueba se realizó por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de PEGMA en el material Alginato-Ca

La incorporación de PEGMA en el material a base de Alginato-Ca se analizó por FT-IR, mientras que la interacción entre ellos se estudió por Difracción de Rayos-X.

En el espectro FT-IR de PEGMA (Fig. 3) se observan sus picos característicos a 2868 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento del enlace C-H de CH_3 y a 1717 cm^{-1} ocasionado por estiramientos de C=O (X. Zhang et al., 2012).

En el espectro de alginato (Fig. 3) se encuentran los picos característicos a 3208 cm^{-1} correspondientes a enlaces O-H, al igual que picos a 1593 cm^{-1} y 1404 cm^{-1} que se atribuyen a las vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas de grupos COO^- , respectivamente. Los picos a 1078 y 1021 cm^{-1} se atribuyen a los enlaces C-O-C del alginato (Gao, Pollet, & Avérous, 2017).

Los materiales de alginato-Ca y alginato-Ca-PEGMA presentan espectros similares a los del alginato en polvo (Fig. 3). No obstante, se confirma la integración del plastificante en el segundo material debido a la aparición del pico característico de PEGMA a 1717 cm^{-1} en el espectro de alginato-Ca-PEGMA. Adicionalmente, se observa una mayor intensidad en el pico a 2868

cm^{-1} correspondiente a enlaces C-H, ocasionado por un aumento de grupos C-H proporcionados por el PEGMA.

En el espectro de alginato-Ca-PEGMA es posible apreciar que los picos encontrados a 1593 y 1404 cm^{-1} en el alginato en polvo, se desplazaron a frecuencias ligeramente mayores. Esto es inesperado ya que la incorporación de un plastificante regularmente debilita los enlaces del material, lo cual se observa como un desplazamiento de los picos a frecuencias menores. Una posible explicación es que los enlaces de hidrógeno iniciales entre agua y alginato hayan sido reemplazados por enlaces de hidrógeno entre PEGMA y alginato, los cuales son más débiles (Gao et al., 2017; Ping, Nguyen, Chen, Zhou, & Ding, 2001). Debido a que PEGMA es hidrofílico, el pico de 1593 cm^{-1} se desplazó a una mayor frecuencia.

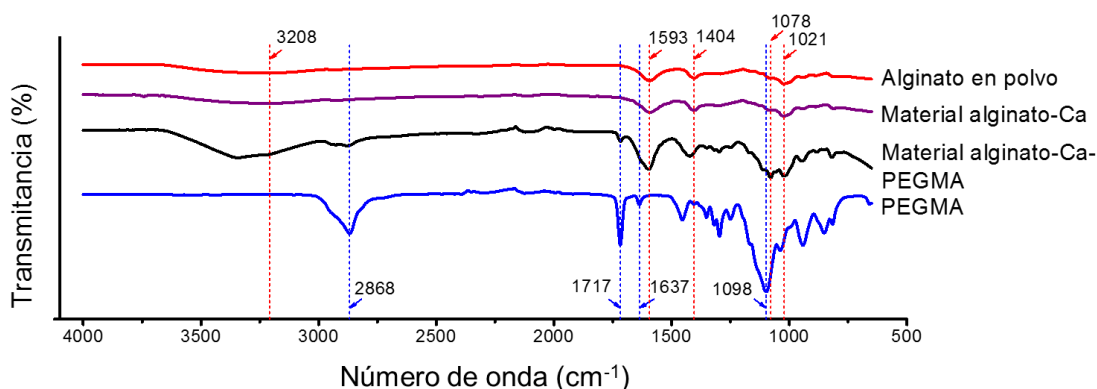


Fig. 3. Espectros FT-IR de alginato-Na en polvo, material alginato-Ca, material alginato-Ca-PEGMA y PEGMA.

En el análisis por Difracción de Rayos-X se observa la estructura cristalina del alginato-Na (Fig. 4), determinando la existencia de picos a 2θ de 13.8°, 22.3° y 38.4° correspondientes a (100), (200) y a la naturaleza amorfa de alginato-Na (Thakur & Arotiba, 2018).

Es posible apreciar que el pico a 2θ de 13.8° aumentó de intensidad y se amplió en el patrón de difracción del material alginato-Ca-PEGMA en comparación con el de alginato-Ca, indicando un mayor amorfismo en el material plastificado. El pico observado en el patrón de difracción de PEGMA no se encuentra en el material alginato-Ca-PEGMA. Esto indica que el PEGMA no se incorpora de manera cristalina, sino que se encuentra intercalado entre las cadenas de alginato, alterando la estructura y plastificando el material.

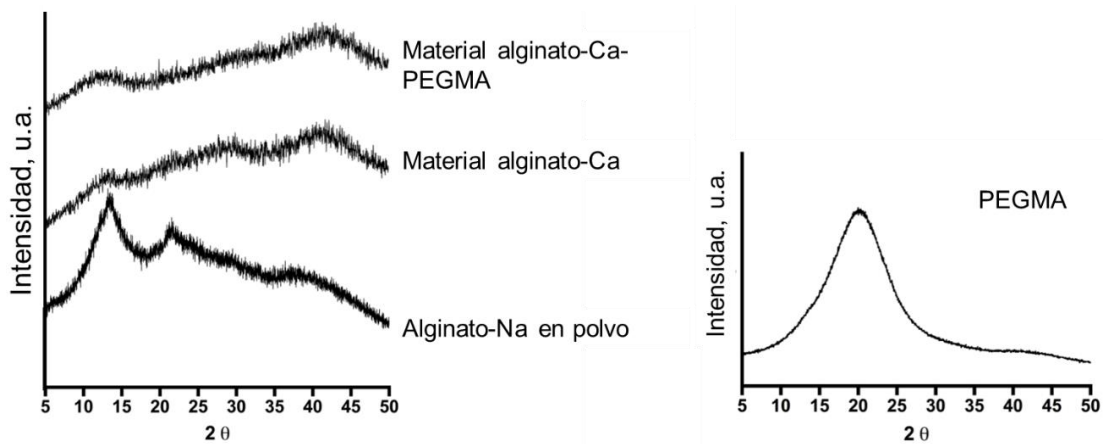


Fig. 4. Patrones de difracción de alginato-Na en polvo, material alginato-Ca, material alginato-Ca-PEGMA y PEGMA.

El efecto de plastificación al material es apreciable visiblemente, ya que el alginato-Ca-PEGMA presenta mayor flexibilidad que alginato-Ca, mostrando una mejor retención de forma tras ser doblados por completo (Fig. 5). Esto representa una mejora en el manejo del material que resulta importante al momento de utilizarse como andamio, ya que facilita la implantación sin comprometer su forma.

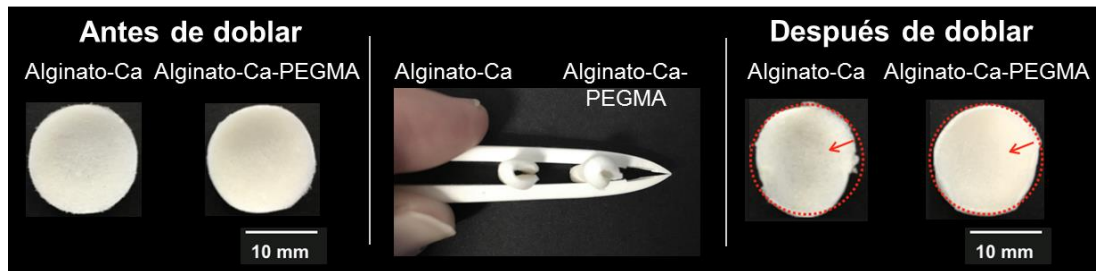


Fig. 5. Efecto de PEGMA en la retención de forma entre alginato-Ca y alginato-Ca-PEGMA. La circunferencia original se muestra con una línea roja punteada y con flechas se señalan los cambios de forma.

Para aplicaciones de andamios en ingeniería de tejidos, se espera que el material sea degradable durante el proceso de remodelación, por lo que se probó la degradación en medio acuoso de los materiales con y sin PEGMA (Fig. 6). La degradación del material alginato-Ca-PEGMA inició previo a las 23 h, a las 86 h ya se encontraba separado en dos partes y continuó progresivamente de manera que a las 110 h se encontró dividido en varios fragmentos.

En comparación, el material alginato-Ca-PEGMA mostró una degradación retardada, atribuible a la incorporación de PEGMA ya que la degradación de polímeros depende de su naturaleza química y las propiedades físicas del material (W.-J. Li, Cooper Jr., Mauck, & Tuan, 2006). La hidrofobicidad y amorfismo regularmente disminuyen la degradación en medios acuosos. Como ya se comentó, alginato-Ca-PEGMA tiene mayor amorfismo que alginato-Ca por lo cual era esperado que tuviera una menor degradación. Asimismo, a pesar que PEGMA y alginato son polímeros hidrofílicos, los grupos metil y metacrilato del PEGMA hacen que sea menos hidrofílico que el alginato, lo cual pudo haber contribuido al retraso en degradación del material con PEGMA.

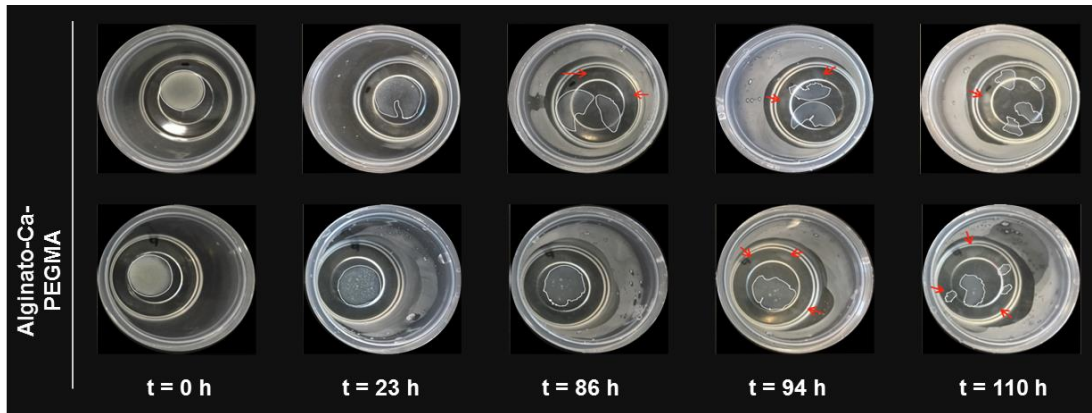


Fig. 6. Efecto de PEGMA en la degradación del material en medio acuoso. El contorno de los fragmentos se delineó con blanco para mostrar los cambios de forma y con flechas rojas se señalan pequeños segmentos.

4.2. Apariencia y microestructura de materiales bioactivos

Todos los materiales tomaron la forma del molde por lo que resultaron en discos de 15 mm de diámetro, 3 mm de altura (Fig. 7.A-D). Los materiales bioactivos presentan distinto color dependiendo de su contenido de extractos de plantas (Fig. 7.A-D). El Blanco de alginato-Ca-PEGMA sin extractos es de color pálido, casi blanco. *A. vera* proporciona un color verdoso al material AV, mientras que en los materiales AV-MO y AV-2MO es notorio el color café oscuro del extracto de *M. oleifera*, el cual aumenta conforme la concentración.

La microestructura de la vista superior (Fig. 7.a-d) y del corte transversal (Fig. 7.a'-d') visualizada por SEM muestra una composición porosa en todos los materiales analizados. Los poros, aleatorios e interconectados tienen una forma más definida en la vista superior que en el corte transversal, ya que en éste último se observan espacios abiertos en todos los materiales.

Este efecto posiblemente se deba a la existencia de burbujas dentro de las soluciones para cada condición en los moldes antes del congelamiento. Debido a la homogenización por liquefacción se le incorporó mucho aire a las soluciones, el cual se intentó eliminar al batir con la espátula. A pesar de haber eliminado todas las burbujas visibles, es posible que haya permanecido aire en las soluciones que haya interferido con la estructura del material causando los espacios vacíos. De ser así, la superficie no sería interrumpida debido a la tensión superficial de las soluciones en los moldes.

El tamaño de poro en todos los materiales en corte transversal es de alrededor de 100 μm . Parece existir una diferencia entre el tamaño de poro en superficie y corte transversal (Fig. 8), donde los poros en superficie son mayores posiblemente debido a la diferencia en morfología discutida, sin embargo esto no se pudo soportar estadísticamente debido a la falta de más imágenes SEM para realizar un análisis estadístico. De igual manera, el estudio sugiere una variación de tamaño de poro entre los materiales, donde AV presenta el mayor, pero es necesario ampliar el tamaño de muestras para poder afirmarse.

Las observaciones hechas indican que todos los materiales presentaron tamaño de poro menor a 160 μm , lo cual según Yang et al., 2002, es el rango adecuado para el crecimiento de fibroblastos. Por lo tanto, la adición de extractos no afectó la arquitectura del material de forma que impida su uso como andamios.

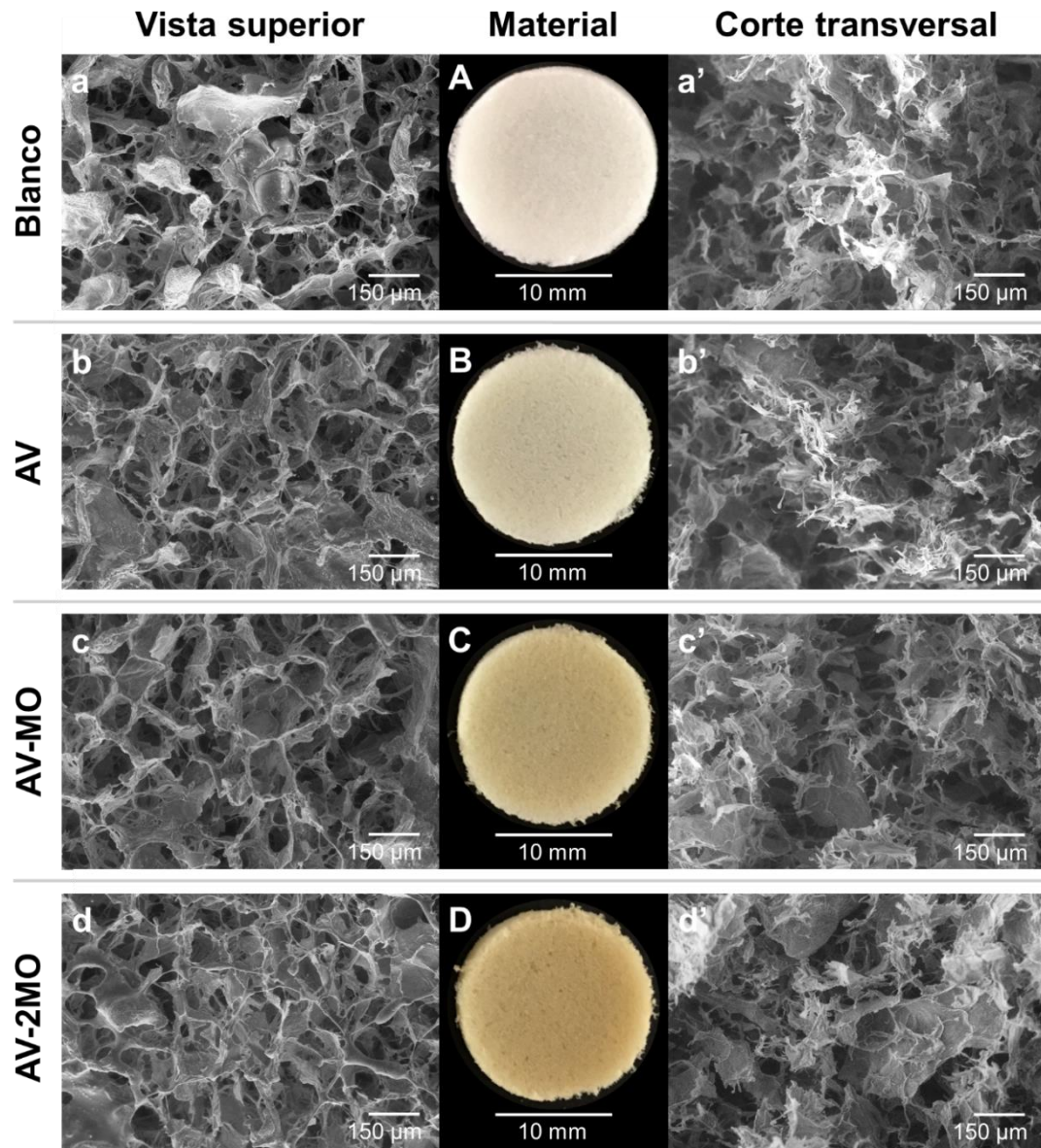


Fig. 7. Fotografías (A-D) y micrografías SEM de materiales bioactivos de vista superior (a-d) y corte transversal (a'-d').

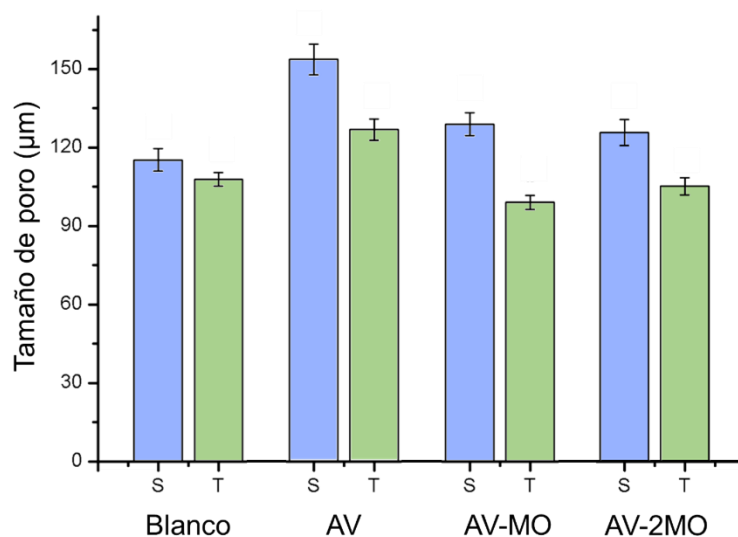


Fig. 8. Tamaño de poro de los materiales bioactivos en vista superior (S) y corte transversal (T). Las barras verticales representan los errores estándar de las medias ($n \geq 18$).

4.3. Absorción de agua y liberación de extractos de los materiales bioactivos

Se midió la absorción de agua de los materiales bioactivos ya que es una propiedad favorable que se relaciona con la capacidad de un material aplicado para absorber el exudado de una herida. Además, debido a que se supone que los extractos incorporados son solubles en agua, se estudió la liberación de extractos en agua de los materiales bioactivos desarrollados.

De los materiales bioactivos, AV tuvo la mayor absorción de agua con 1512 ± 132 % (m/m). Los otros dos materiales con *M. oleifera* (AV-MO y AV-2MO) presentan menor capacidad de absorción de agua, reduciéndose a 1172 ± 69 y 918 ± 26 % (m/m) respectivamente, lo cual demuestra que existe una diferencia causada por los extractos contenidos (Fig. 9). El que *A.vera* haya

sido el extracto que aportara un cambio positivo en la capacidad de absorción de agua del material está en acuerdo con estudios anteriores (Pereira et al., 2012).

Los distintos efectos de los extractos en el material alginato-Ca-PEGMA se deben a las diferencias en composición de éstos, posiblemente dependiendo de la hidrofobicidad de los metabolitos que componen a los extractos. Se conoce que *M. oleifera* tiene presentes metabolitos como quercitina, el cual es relativamente hidrofóbico (Kitagawa, Yoshii, Morita, & Teraoka, 2011) y pudo haber ocasionado la diferente capacidad de absorción de agua de AV-MO y AV-2MO.

En comparación con los materiales bioactivos, el blanco presentó una mayor capacidad de absorción de agua, siendo de 1515 ± 114 % (m/m) (Fig. 9). Esto coincide con lo esperado, ya que al ser todas las muestras del mismo volumen pero de distinta composición, el volumen de extractos en AV, AV-MO y AV-2MO se encuentra reemplazando volumen de alginato-Ca-PEGMA en el blanco. Previéndose que los extractos sean solubles en agua, se espera que éstos se liberen del material, causando una disminución de masa reflejada en la medición de absorción de agua.

Los materiales bioactivos exhibieron una absorción de agua entre 918 y 1515 % (m/m) lo cual es similar a lo encontrado en otros trabajos con materiales compuestos de alginato para aplicaciones de hemostasis (1200–1400 % hinchamiento) (Cheng et al., 2017). Se consideran materiales superabsorbentes, propiedad que puede ser derivada no solo de la naturaleza altamente hidrofílica del alginato, sino también de la estructura porosa de los materiales sintetizados (Ramadass et al., 2014).

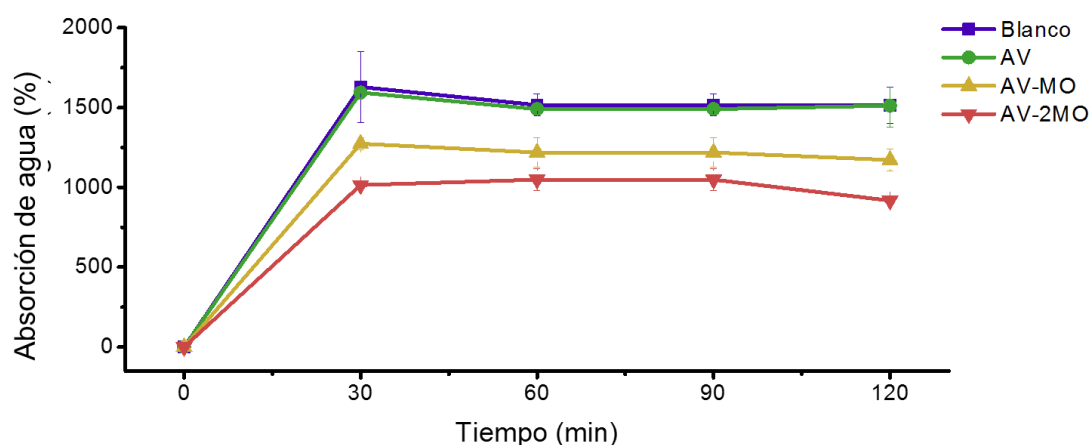


Fig. 9. Absorción de agua de los materiales compuestos. Las barras verticales representan las desviaciones estándar de las medias ($n=3$).

Como se tenía planteado, los extractos de *A. vera* y *M. oleifera* fueron solubles en agua y se liberaron del material. Todos los materiales bioactivos evaluados liberaron completamente los compuestos fenólicos antes de las 2 h (Fig. 10). Se encontró que el extracto en el material AV se liberó más lentamente que los contenidos en los materiales AV-MO y AV-2MO, lo cual indica que la liberación es dependiente del tipo de extracto antes que de su concentración.

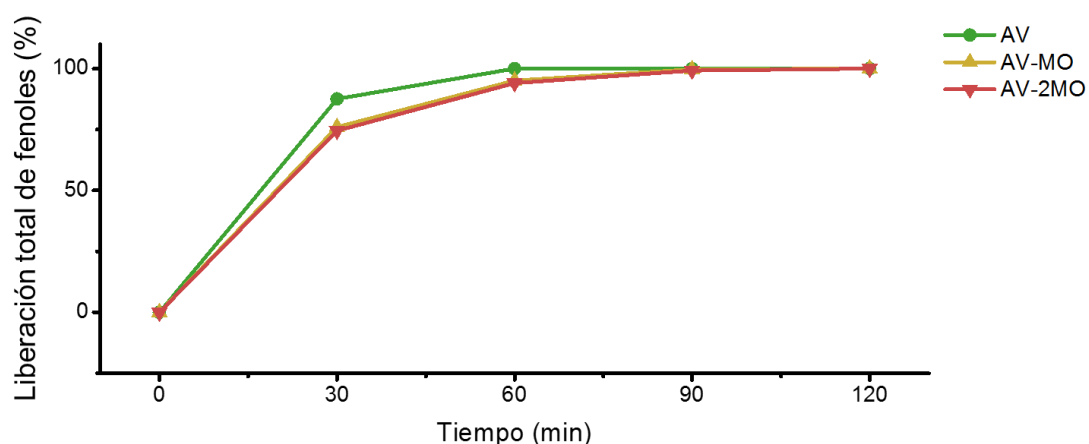


Fig. 10. Liberación de extractos en AV, AV-MO, AV-2MO. Las barras verticales representan las desviaciones estándar de las medias ($n=3$).

4.4. Contenido fenólico, actividad antioxidante y anti-inflamatoria de los materiales bioactivos

Se midieron algunas propiedades de los extractos incorporados en los materiales bioactivos para confirmar su presencia y su actividad tras la síntesis del material (tabla I), determinando así su utilidad futura como andamio para cicatrización de heridas.

Tabla I. Contenido fenólico, actividad antioxidante y actividad anti-inflamatoria de los materiales bioactivos.

Material	Contenido fenólico (nmolGAE/10 mg material)	Actividad Antioxidante (equivalentes a nmol Trolox/10 mg material)	Actividad anti-inflamatoria (%)
Blanco	0	0	17.9 ± 0.5
AV	16.1 ± 2.0	22.3 ± 0.9	11.5 ± 3.3
AV-MO	203.4 ± 4.4	175.4 ± 2.7	22.3 ± 2.2
AV-2MO	287.9 ± 8.5	207.6 ± 5.1	30.4 ± 4.2

Al medir el contenido fenólico se encuentra que de los materiales bioactivos, AV es quien tiene menor contenido. Evidentemente el extracto de *M. oleifera* proporciona un mayor contenido de compuestos fenólicos al material en comparación con el extracto de *A. vera*, ya que en el material AV-MO el contenido fenólico aumenta 12.7 veces respecto a AV. Al incrementar la concentración de *M. oleifera* al doble en AV-2MO, el contenido fenólico aumenta 1.4 veces respecto a AV-MO y 18 veces respecto a AV.

En la medición de actividad antioxidante se observa la misma tendencia, aumentando 7.9 veces con la incorporación de *M. oleifera* de AV a AV-MO y 1.2 veces de AV-MO a AV-2MO (9.3 veces de AV a AV-2MO). Por lo tanto, se confirma la relación entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante reportada en otros trabajos (Skotti et al., 2014; Zhang et al., 2011).

La actividad antioxidante de un material de curación interviene en el proceso de cicatrización, disminuyendo el nivel de ROS que regularmente se encuentra sobreproducido en heridas crónicas y causando estrés oxidativo. En un trabajo anterior (Vongsak, Sithisarn, & Mangmool, 2013) se reportó que utilizando un extracto de hojas de *M. oleifera* 0.01 % (m/v) con actividad antioxidante de $EC_{50}=62.94 \mu\text{g/ml}$, se redujo el nivel de ROS intracelular de 540 a 408 % en células HEK-293 (Vongsak et al., 2013). Considerando que el EC_{50} del extracto de *M. oleifera* utilizado en el presente trabajo es de $300 \mu\text{g/ml}$ (es decir que fue necesario una mayor concentración para neutralizar el 50 % de los radicales libres del DPPH), es razonable que sea necesaria una mayor concentración de extracto para reducir ROS a niveles adecuados para la cicatrización de heridas.

En el ensayo bioquímico de neutralización de NO por SNP, un alto porcentaje indica que en una herida estos materiales servirían como antiinflamatorios debido a inhibición de NO, el cual es un estimulador de la respuesta inflamatoria. Todos los materiales estudiados presentan neutralización, inclusive el blanco, indicando que es una característica de la matriz de alginato-Ca-PEGMA. Esto probablemente se deba a un efecto del PEGMA, ya que en reportes previos se han atribuido propiedades antiinflamatorias al PEG (Ackland et al., 2010). No obstante, los materiales con *M. oleifera* son los que alcanzaron a neutralizar un mayor porcentaje del NO donado por el SNP, sugiriendo una relación entre propiedades inflamatorias y contenido fenólico,

lo cual también ha sido reportado en algunas plantas medicinales (Pardau et al., 2017; Zhang et al., 2011).

4.5. Actividad antibacteriana de los materiales bioactivos

La actividad antimicrobiana de los materiales bioactivos se evaluó utilizando *S. aureus* y *E.coli* como bacterias representativas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, respectivamente, ambas bacterias se encuentran comúnmente en heridas infectadas (Fig. 11).

Como era esperado, el blanco de alginato-Ca-PEGMA no presenta actividad antibacteriana para ninguna de las bacterias utilizadas. El material AV tampoco demostró actividad, lo cual concuerda con un estudio anterior que compara la actividad antibacteriana de extractos acuoso, etanólico y acetónico de *A.vera* para *S. aureus*, *Streptococcus pyogens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli*. Mientras que los extractos etanólico y acetónico mostraron actividad ante *S. aureus* y *E.coli*, el extracto acuoso no lo hizo, a pesar de haber sido efectivo contra *S. pyogens* (Arunkumar & Muthuselvam, 2009).

A diferencia de *A. vera*, el extracto de *M. oleifera* sí proporcionó actividad antibacteriana al material, aunque únicamente contra *S. aureus*. Esto fue evidente en el halo de inhibición alrededor de AV-MO y AV-2MO, y reiterado en el hecho de que el diámetro del halo de AV-2MO (es decir aquel que tuvo mayor concentración de *M. oleifera*) fue mayor al de AV-MO.

En estudios anteriores ya se ha encontrado una correlación entre el contenido fenólico y actividad antioxidante con la actividad antibacteriana (Peixoto et al., 2018; Vázquez-Armenta et al., 2017), por lo cual es admisible asumir que éste fue el caso de *M. oleifera*. Una posible explicación para esta correlación es que

los polifenoles pueden formar compuestos con proteínas y adherirse a adhesinas bacterianas, interfiriendo en la señalización de los receptores de superficie y así inhibiendo el crecimiento bacteriano (Brantner & Grein, 1994).

A pesar de la falta de actividad antibacteriana contra *E.coli* de los materiales AV-MO y AV-2MO, su actividad contra *S. aureus* les confiere utilidad en cicatrización de heridas, ya que *S. aureus* es una de las principales bacterias Gram-positivas encontradas en la etapa inicial de heridas, mientras que *E.coli* se encuentra comúnmente en etapas avanzadas al desarrollarse una herida crónica.

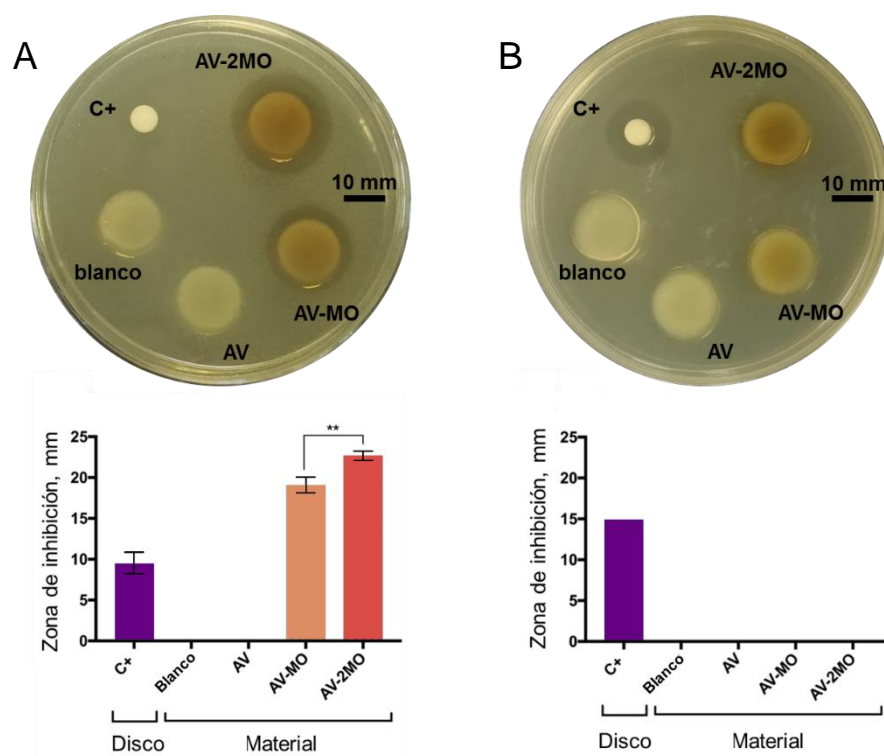


Fig. 11. Actividad antibacteriana de los materiales bioactivos utilizando como control positivo (C+) un disco de $D=0.6\text{mm}$ con carbenicilina. A) Actividad contra *S. aureus*. B) Actividad contra *E. coli*. Las barras verticales representan las desviaciones estándar de las medias y los asteriscos señalan las diferencias entre medias ($n=3$, Tukey $p\leq 0.05$).

CONCLUSIONES

La optimización de la plastificación de la matriz logró un mejor manejo y estabilidad en medio acuoso retardando su degradación sin comprometer la microestructura porosa requerida para el crecimiento celular en andamios.

La incorporación de *A. vera* contribuyó a la absorción de agua de los materiales bioactivos, mientras que el extracto de *M. oleifera* otorgó actividad antioxidante, anti-inflamatoria (relacionada con la remoción de NO) y antibacteriana contra *S. aureus* en AV-MO y AV-2MO. Dichas propiedades benéficas para la cicatrización de heridas se le atribuyen a los polifenoles de las plantas, ya que las tres propiedades aumentaron conforme el contenido fenólico fue mayor.

Entre AV-MO y AV-2MO no hubo diferencia en la liberación de extractos, sin embargo el primero tuvo una mejor absorción de agua que el segundo, mientras que el segundo presentó mayor actividad antibacteriana.

Todos los materiales mantuvieron una estructura tridimensional y porosa, por esto y por lo antes mencionado, AV-MO y AV-2MO son materiales prometedores para andamios. No obstante, todavía es necesario determinar la viabilidad celular afectada por los materiales, así como si ésta es mejorada por la adición de extractos.

RECOMENDACIONES

- Cuantificar las propiedades mecánicas de los materiales.
- Estudiar la respuesta *in vivo* de los materiales bioactivos.
- Ajustar los materiales para lograr una liberación controlada de los extractos en un mayor periodo de tiempo.
- Evaluar la incorporación de otros compuestos que incrementen las propiedades antibacterianas de los andamios.

BIBLIOGRAFÍA

-
- Ackland, G. L., Gutierrez Del Arrollo, A., Yao, S. T., Stephens, R. C., Dyson, A., Klein, N. J., ... Gourine, A. V. (2010). Low-molecular-weight polyethylene glycol improves survival in experimental sepsis. *Critical Care Medicine*, 38(2), 629–636.
- Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., & Gilani, A. H. (2007). Moringa oleifera : A Food Plant with Multiple Medicinal Uses. *Phytotherapy Research*, 21, 17–25.
- Arunkumar, S., & Muthuselvam, M. (2009). Analysis of Phytochemical Constituents and Antimicrobial Activities of Aloe vera L . Against Clinical Pathogens. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5(5), 572–576.
- Augst, A. D., Kong, H. J., & Mooney, D. J. (2006). Alginate Hydrogels as Biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, 6(8), 623–633.
- Balaji, A., Vellayappan, M. V., John, A. A., Subramanian, P. A., Jaganathan, S. K., SelvaKumar, M., ... Yusof, M. (2015). Biomaterials based nano-applications of Aloe vera and its perspective: A review. *RSC Advances*, 5(105), 86199–86213.
- Bowler, P. G., Duerden, B. I., & Armstrong, D. G. (2001). Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), 244–269.
- Brantner, A., & Grein, E. (1994). Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 44(1), 35–40.

- Cardona, A. F., & Wilson, S. E. (2015). Skin and Soft-Tissue Infections: A Critical Review and the Role of Telavancin in Their Treatment. *Clinical Infectious Diseases*, 61(Suppl 2), 69–78.
- Cheng, F., Liu, C., Wei, X., Yan, T., Li, H., He, J., & Huang, Y. (2017). Preparation and Characterization of 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO)-Oxidized Cellulose Nanocrystal/Alginate Biodegradable Composite Dressing for Hemostasis Applications. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(5), 3819–3828.
- Chin, C., Jalil, J., Ng, P. Y., & Ng, S. (2018). Development and formulation of Moringa oleifera standardised leaf extract film dressing for wound healing application. *Journal of Ethnopharmacology*, 212, 188–199.
- Choi, S., & Chung, M.-H. (2003). A review on the relationship between Aloe Vera components and their biologic effects. *Seminars in Integrative Medicine*, 1(1), 53–62.
- Collins, P. H., Lyne, P. M., & Grange, J. M. (1989). *Collins and Lyne's microbiological methods*. (6th ed.). London: Butterworth & Co (Publishers) Ltd.
- Cutting, K. F., & White, R. J. (1977). Maceration of the skin and wound bed 1: its nature and causes. *Journal of Wound Care*, 11(7), 275–278.
- Dhall, S., Do, D. C., Garcia, M., Kim, J., Mirebrahim, S. H., Lyubovitsky, J., ... Martins-Green, M. (2014). Generating and Reversing Chronic Wounds in Diabetic Mice by Manipulating Wound Redox Parameters. *Journal of Diabetes Research*, 2014.
- Eming, S. A., Martin, P., & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling and translation. *Science Translational Medicine*, 6(265), 265sr6.
- Falanga, V. (2005). Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet*, 366(9498), 1736–1743.

-
- Freyman, T. M., Yannas, I. V., & Gibson, L. J. (2001). Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Progress in Materials Science*, 46(3–4), 273–282.
- Frykberg, R. G., & Banks, J. (2015). Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in Wound Care*, 4(9), 560–582.
- Gao, C., Pollet, E., & Avérous, L. (2017). Innovative plasticized alginate obtained by thermo-mechanical mixing: Effect of different biobased polyols systems. *Carbohydrate Polymers*, 157, 669–676.
- Ghosh, P. K., & Gaba, A. (2013). Phyto-Extracts in Wound Healing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 16(5), 760–820.
- Gopalakrishnan, L., Doriya, K., & Kumar, D. S. (2016). Moringa oleifera: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness*, 5(2), 49–56.
- Järbrink, K., Ni, G., Sönnergren, H., Schmidtchen, A., Pang, C., Bajpai, R., & Car, J. (2017). The humanistic and economic burden of chronic wounds : a protocol for a systematic review. *Systematic Reviews*, 6(1).
- Kavoosi, G., & Amirghofran, Z. (2017). Chemical composition, radical scavenging and anti-oxidant capacity of Ocimum Basilicum essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 29(2), 189–199.
- Kitagawa, S., Yoshii, K., Morita, S., & Teraoka, R. (2011). Efficient Topical Delivery of Chlorogenic Acid by an Oil-in-Water Microemulsion to Protect Skin against UV-Induced Damage. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59(6), 793–796.
- Li, L., Gao, S., Peng, L., Wang, X., Zhang, Y., Hu, Z., & Gao, J. (2017). ScienceDirect Evaluation of efficacy of aloin in treating acute trauma in vitro and in vivo. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 88, 1211–1219.
- Li, W.-J., Cooper Jr., J. A., Mauck, R. L., & Tuan, R. S. (2006). Fabrication and characterization of six electrospun poly(α -hydroxy ester)-based fibrous
-

- scaffolds for tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, 2(4), 377–385.
- Pardau, M. D., Pereira, A. S. P., Apostolides, Z., Serem, J. C., & Bester, M. J. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory properties of Ilex guayusa tea preparations: a comparison to Camellia sinensis teas. *Food & Function*, 8(12), 4601–4610.
- 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.
- Ping, Z. H., Nguyen, Q. T., Chen, S. M., Zhou, J. Q., & Ding, Y. D. (2001). States of water in different hydrophilic polymers - DSC and FTIR studies. *Polymer*, 42(20), 8461–8467.
- Ramadass, S. K., 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 & Interfaces*, 6(17), 15015–15025.
- Rehm, B. H. A. (Ed.). (2009). *Alginates: biology and applications*. Springer Science & Business Media.
- Shapiro, L., & Cohen, S. (1997). Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. *Biomaterials*, 18(8), 583–590.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
- Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., & Tarantilis, P. A. (2014). Total phenolic content, antioxidant activity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops &*

Products, 53, 46–54.

- Thakur, S., & Arotiba, O. A. (2018). Synthesis, swelling and adsorption studies of a pH-responsive sodium alginate–poly(acrylic acid) superabsorbent hydrogel. *Polymer Bulletin*, 75(10), 4587–4606.
- Vázquez-Armenta, F. J., Silva-Espinoza, B. A., Cruz-Valenzuela, M. R., González-Aguilar, G. A., Nazzaro, F., Fratianni, F., & Ayala-Zavala, J. 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.
- Vongsak, B., Sithisarn, P., & Mangmool, S. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops & Products*, 44, 566–571.
- Zhang, L., Ravipati, A. S., Koyyalamudi, S. R., Jeong, S. C., Reddy, N., Smith, P. T., ... 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(23), 12361–12367.
- Zhang, X., Fu, C., Feng, L., Ji, Y., Tao, L., Huang, Q., ... Wei, Y. (2012). PEGylation and polyPEGylation of nanodiamond. *Polymer*, 53(15), 3178–3184.