BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA

Facultad De Ciencias Biológicas

Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción

Centro de Investigación en Fisicoquímica de Materiales

Instituto de Ciencias, BUAP

“Estudio etnofarmacológico del uso de membranas nanoestructuradas de PVP dopadas con extractos de *Hamelia Patens Jacq*. en el tratamiento de heridas cutáneas”

Tesis para obtener el título de
Licenciado En Biología

Presenta:
Jonathan Hillel Cruz San Juan

Director de Tesis: Dra. Wendy Argelia García Suastegui
Co- Director de Tesis: Dr. Juan Pablo Padilla Martínez

Febrero, 2021

Dedicatoria

A mi madre Jael San Juan Escalona, me amaste como nunca nadie jamás podrá, me enseñaste a salir de mi zona de confort, me enseñaste a amar a los demás, me apoyaste incondicionalmente en cada paso que tomé y fuiste y serás por siempre mi mejor amiga, mi gurú, mi torre fuerte, mi maestra y básicamente mi todo en esta tierra. Debo de confesar que la vida no ha sido fácil desde que te fuiste, pero tu recuerdo me trae gran fortaleza, aquí está la evidencia, solo una pequeña prueba tangible de cómo ha trascendido tu amor y de lo que es capaz de hacer.

A mi padre Rómulo Cruz Cerecedo, me amaste y cuidaste como solo un padre puede, sé que no siempre tenías tiempo ni energía, pero aun así tuviste tiempo para nosotros, me diste siempre todo los necesario para que desarrollara mis habilidades, me inculcaste valores que no solo están grabados en mi mente sino también en mi corazón, me enseñaste a entregar lo mejor de mi en cada nuevo proyecto y más que nada me enseñaste a ser compañero, amigo y como debe de ser un buen padre. Mejor ejemplo no pudo haber existido.

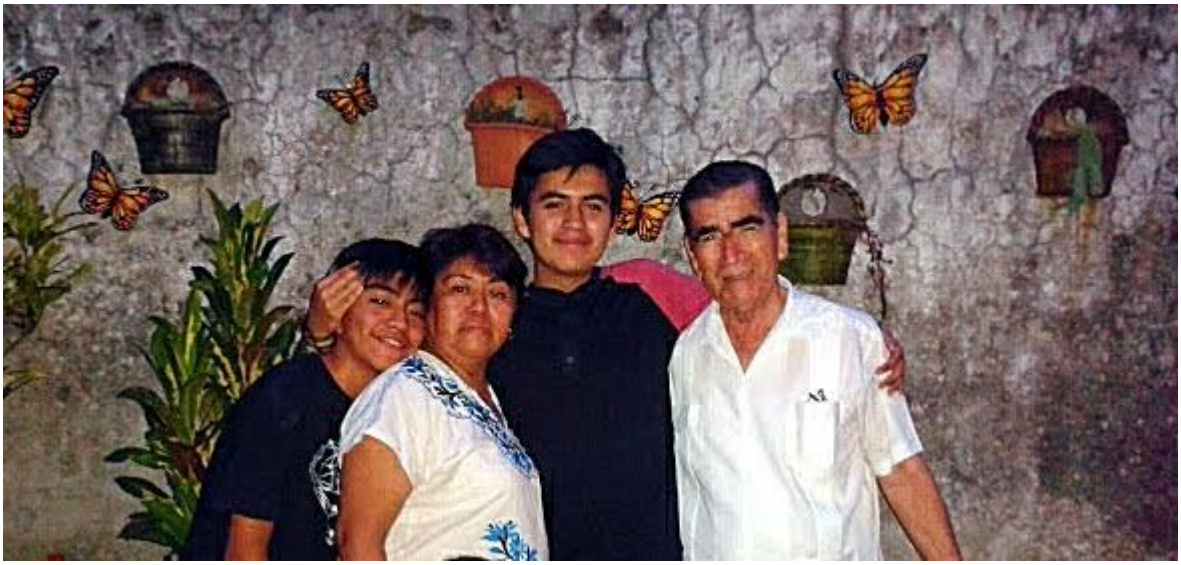
A mi hermano Uriel David Cruz San Juan, desde el momento que supe que existías cambiaste mi vida de una forma radica, estar contigo es revitalizante tienes una forma singular de hacer que me olvide de los problemas de la vida, me has dado tanta fortaleza en los momentos difíciles y sé que contigo tengo un compañero, un amigo, un cómplice, un “bro”.

A mi tía Areli San Juan Escalona, me enseñaste a explorar mi lado creativo, me apoyaste y alentaste a tomar nuevos retos y, sobre todo, me disté amor y comprensión cuando creí que mi mundo se derrumbaba.

A ustedes debería ser el reconocimiento.

Para mí el premio más grande fue haber nacido y crecido en esta perfectamente imperfecta familia, lo demás en esta vida sobra. No hay vocabulario suficiente para

expresarles mi gratitud, cariño y amor solo espero algún día ser una pequeña parte de lo que ustedes son.



Agradecimientos

Agradezco al Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción, al Centro de Investigación en Fisicoquímica de Materiales y al Bioterio “Claude Bernard” de la BUAP por brindarnos los organismos necesarios. Al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, así como al Dr. Orlando Zaca Moran y a la Dra. Celia Lizeth Gómez Muñoz por sus conocimientos e instrucción en el uso de metodologías de extracción, separación y caracterización de extractos vegetales. Al proyecto VIEP con clave 100526492-VIEP2019, por el apoyo recibido para participar en el Congreso Internacional de la Asociación Mexicana del Cuidado Integral y Cicatrización de Heridas 2019. Al Dr. Juan Pablo Padilla Martínez por la beca otorgada la cual ayudo a solventar gastos de congresos. Y a la Red Nacional de Biofotónica, a la cual pertenecen mis asesores: la Dra. Wendy Argelia García Suastegui y el Dr. Juan Pablo Padilla Martínez a los cuales les agradezco por ayudare con cada etapa de este proyecto, por aclararme dudas y mostrarme un panorama mas amplio de lo que es la ciencia mexicana y como tiene el poder de influir en el país y el resto del mundo si los alumnos reciben el apoyo necesario.

También agradezco a “Dios” por conducirme por el camino de la biología, una de las mejores experiencias de mi vida sin duda, a mi familia por proporcionarme la mayor cantidad de recursos tanto materiales como intelectuales para enfrentar la educación superior y a todos mis amigos y futuros colegas: Majo, Andrea, Boni, Ulises, Lili, Javier, Cynthia, Dyanne, Chuy, Brenda, Betty, Diana, Carmen, Karen, Polo, Abby y Katty por darme consejos, palabras de trabajo y aliento, escucharme en mis buenos y malos ratos, por pasar el estrés conmigo, ayudarme con las materias, por reír y llorar conmigo y por el simple hecho de estar presentes en una parte muy pequeña pero muy significativa de mi vida. Cada uno de ustedes son especiales para mí y ocupan un lugar especial en mi corazón, se que lograran todo lo que se propongan porque son los mejores.

Y, por último, pero no menos importante, agradecer a las comunidades y personas que todavía practican la medicina tradicional, sin ellos la ciencia moderna no seria nada. Es necesario que sigamos preservando las tradiciones medicinales de todos pueblos.

Índice

Resumen 1

1. Introducción 2

1.1 Etnofarmacología 2

1.2 *Hamelia patens* 3

1.2.1 Distribución 5

1.2.2 Propiedades y usos 5

1.3 ¿Qué es el electrohilado? 7

1.3.1 Antecedentes del electrohilado en la regeneración de tejido 9

2. La piel y la cicatrización 12

2.1 Estructura de la piel 12

2.1.1 Epidermis 13

2.1.2 Dermis 13

2.1.3 Matriz extracelular 14

2.2 ¿Qué es una herida? 14

2.2.1 Tipos de heridas 15

2.3 Proceso de cicatrización 16

2.3.1 Fase de hemostasis 16

2.3.2 Fase inflamatoria 17

2.3.3 Fase proliferativa 18

2.3.4 Fase de remodelación 19

3. Apósitos para la curación de heridas 20

3.1 ¿Qué es un apósito? 20

3.2 Tipos de apósitos 21
3.2.1 Hidrocoloides 21
3.2.2 Alginatos 21
3.2.3 Hidrogeles 21
3.2.4 Apósitos de colágeno 21
3.2.5 Hidropolieros 22
3.2.6 Espumas 22
3.2.7 Apósitos de control de metaloproteínas 22
3.2.7 Películas no adherentes 23
4. Justificación 24
5. Objetivos 26
5.1 Objetivo general 26
5.2 Objetivos específicos 26
6. Hipótesis 27
7. Metodología 28
7.1 Colecta del material biológico 28
7.2 Procesamiento del material biológico 28
7.3 Caracterización del extracto por Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y por Espectroscopia UV-Vis 29
7.4 Fabricación y caracterización de las membranas 30
7.5 Manejo y uso de animales 31
7.6 Procedimiento quirúrgico 32
7.7 Toma de biopsias y análisis histológico 33
7.8 Identificación de grupos funcionales en los cortes histológicos 35
7.9 Cuantificación del cierre de la herida 36

8. Resultados 37

8.1 Espectros FTIR 37

8.2 Espectros UV-Vis 39

8.3 Caracterización de las membranas por SEM 40

8.4 Monitoreo del proceso de cicatrización 40

8.5 Análisis histológico 42

8.6 Bandas de absorción identificadas en los cortes histológicos 47

9. Discusión de resultados 50

10.Conclusiones 69

Referencias 71

Perspectivas 81

Premios y participaciones en congresos 82

Resumen

Hamelia patens es una planta utilizada en la medicina tradicional mexicana, recientes estudios biológicos reportan su actividad antioxidante, antifúngica, antidiarreica, antiinflamatoria, antihelmíntica y antihiperglucémica. El electrohilado es un método de producción de fibras ultrafinas, con el potencial de crear una membrana y simular una matriz extracelular. El objetivo del presente estudio se divide en tres etapas: i) identificar mediante espectrofotometría infrarroja los grupos funcionales de los extractos de *H. patens*, ii) mediante la técnica de electrohilado, fabricar membranas de PVP dopadas y no dopadas con extractos y iii) en un modelo murino, evaluar las propiedades cicatrizantes de membranas de PVP dopadas y no dopadas. Se colectaron y secaron hojas de *H. patens,* del estado de Veracruz*,* se maceraron en dos solventes (agua y metanol), se realizó una infusión y se caracterizaron los extractos, mediante espectrofotometría IR y UV-Vis. Para evaluar su capacidad cicatrizante se utilizaron 16 ratas macho alopécicas (*Rattus norvegicus*) a las cuales se les realizaron dos heridas quirúrgicas de un centímetro de diámetro en el dorso. Fueron divididas aleatoriamente en 4 grupos: control, membrana, extracto y membrana dopada. Se tomaron biopsias de las heridas en días clave (3, 7, 14 y 21), para evaluar mediante cortes histológicos de 20 µm teñidos la técnica de hematoxilina-eosina el proceso de cicatrización en los distintos grupos. Como resultado, se observó que los grupos membrana y membrana dopada presentan mayor diferenciación de estructuras en las tres capas de piel del tejido cicatricial (epidermis, dermis e hipodermis), una formación anticipada de folículos pilosos con glándulas asociadas y angiogénesis en comparación con el grupo control, particularmente en el grupo membrana dopada. En conclusión, el uso de membranas dopadas con extractos de *H. patens* puede ayudar a acelerar la cicatrización, mejorar la estética de la lesión y recuperar la estructura y función de la piel.

1.Introducción

1.1 Etnofarmacología

Todas las sociedades producen estrategias de acción técnicas y socioideológicas para aliviar sus padecimientos. En determinadas sociedades, debido al desarrollo económico-político y técnico-científicos, se construyen sistemas académicos y/o científicos de explicación y acción sobre los padecimientos. La medicina denominada científica constituye una de las formas institucionalizadas de atención de la enfermedad y, en gran parte de las sociedades, la cual es identificada como la forma más correcta y eficaz de atender el proceso de salud/enfermedad. Sin embargo, cualquier sistema terapéutico es válido si resuelve o ayuda a resolver algún problema de salud. En el caso de las llamadas medicinas tradicionales de las culturas originarias mexicanas, por lo general, miran más allá del cuerpo, intentando re-equilibrar todos los aspectos afectados: espiritual, vivencial y anímico (Brown, 1990). Los Ticitl, nombre en náhuatl que se les daba a los curanderos de la sierra de Orizaba, poseían una considerable capacidad diagnóstica, así como también conocimientos religiosos, ya que se tiene la creencia que ciertos padecimientos estaban relacionados con determinados dioses, por ejemplo, se consideraba que las dermatosis, así como las quemaduras del sol eran enviadas por Tlaloc (Brown, 1990). El proceso de conformación de la medicina tradicional, que actualmente practican los pueblos originarios, es resultado del mestizaje cultural iniciado en el siglo XVI a raíz de la colonización española. Desde entonces se estableció un intercambio de saberes entre los conocimientos terapéuticos tradicionales mesoamericanos y la medicina popular europea (Quezada, 1989). Actualmente existe una mayor demanda por parte de la población para que sistemas como la medicina tradicional mexicana trabajen mano a mano con la medicina occidental (Aparicio, 2005). Como respuesta a dichas demandas, surge la etnofarmacología, la cual es una división de la etnobiología, una disciplina dedicada al estudio de relaciones de plantas y animales con sociedades humanas, presentes o pasadas.

La etnofarmacología se define propiamente como "la exploración científica interdisciplinaria de agentes biológicamente activos tradicionalmente empleados u observados por el hombre" y sirve principalmente como estrategia en la investigación de plantas medicinales. El enfoque etnofarmacológico consiste en combinar la información adquirida por los usuarios de flora medicinal (comunidades y especialistas tradicionales) con estudios químicos, biológicos y farmacológicos. La selección etnofarmacologíca de plantas para investigación y desarrollo, basada en afirmaciones humanas, puede ser un elemento valioso para el descubrimiento de nuevos fármacos. En este contexto, el uso tradicional empírico se puede ver como una evaluación primaria de las propiedades terapéuticas de alguna planta. Constantemente se identifican nuevos objetivos para la acción de medicamentos y remedios tradicionales, que pueden actuar como modificadores del curso natural de las patologías mediante mecanismos fisiológicos que ni siquiera conocemos aun (Elisabetsky, 2003).

1.2 Hamelia patens

Hamelia patens es un arbusto perenne conocido comúnmente como Mazamora, Hierba santa cimarrón, Coralillo, Madura plátano, Maduro zapote y algunos de sus nombres en inglés son Scarletbush y Redhead (Figura 1). Llega a crecer hasta 7 m de altura. Sus hojas son opuestas, elípticas, puntiagudas, con base variable y a veces más anchas hacia el ápice, miden de 5 a 23 cm de largo y posee de 2 a 4 hojas brotando del mismo nudo; los pecíolos son de tamaño muy variable. Sus inflorescencias se encuentran en la punta de las ramas; sus ejes están arqueados y generalmente se dividen en 2, sobre ellos se disponen las flores erguidas. Las flores son de color amarillo oscuro, anaranjado o rojo; el cáliz acampanado y terminado en 5 dientecillos triangulares muy pequeños; la corola es larga, tubular y terminada en 5 lóbulos, a veces cubierta con pelillos que pueden ser erguidos o reclinados. El fruto es carnoso, globoso, de color rojo que al madurar se torna de color negro, miden hasta 1.3 cm de largo y en su interior contienen numerosas semillas angulosas (Hanan y Mondragón, 2009). La Tabla 1, muestra la filogenia de la planta de estudio.

Figura 1. Fotografia de H. patens tomada en el municipio de Orizaba, Veracruz

Tabla1: Filogenia de *Hamelia patens* Jacq.

Reino	Plantae	**Clase**	Magnoliopsida
Subreino	Viridiplantae	**Superorden**	Asteranae
Infrareino	Streptophyta	**Orden**	Gentianales
Supervisión	Embryophyta	**Familia**	Rubiaceae
División	Tracheophyta	**Género**	*Hamelia* Jacq.
Subdivisión	Spermatophytina	**Especie**	*Hamelia patens* Jacq.

1.2.1 Distribución

Su distribución en américa corresponde desde Florida en el sur de los Estados Unidos hasta Argentina y puede encontrarse en algunas regiones del continente africano. Dentro del territorio mexicano se encuentra en los estados de Campeche, Chiapas, Jalisco, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Figura 2) (Hanan y Mondragón, 2009).

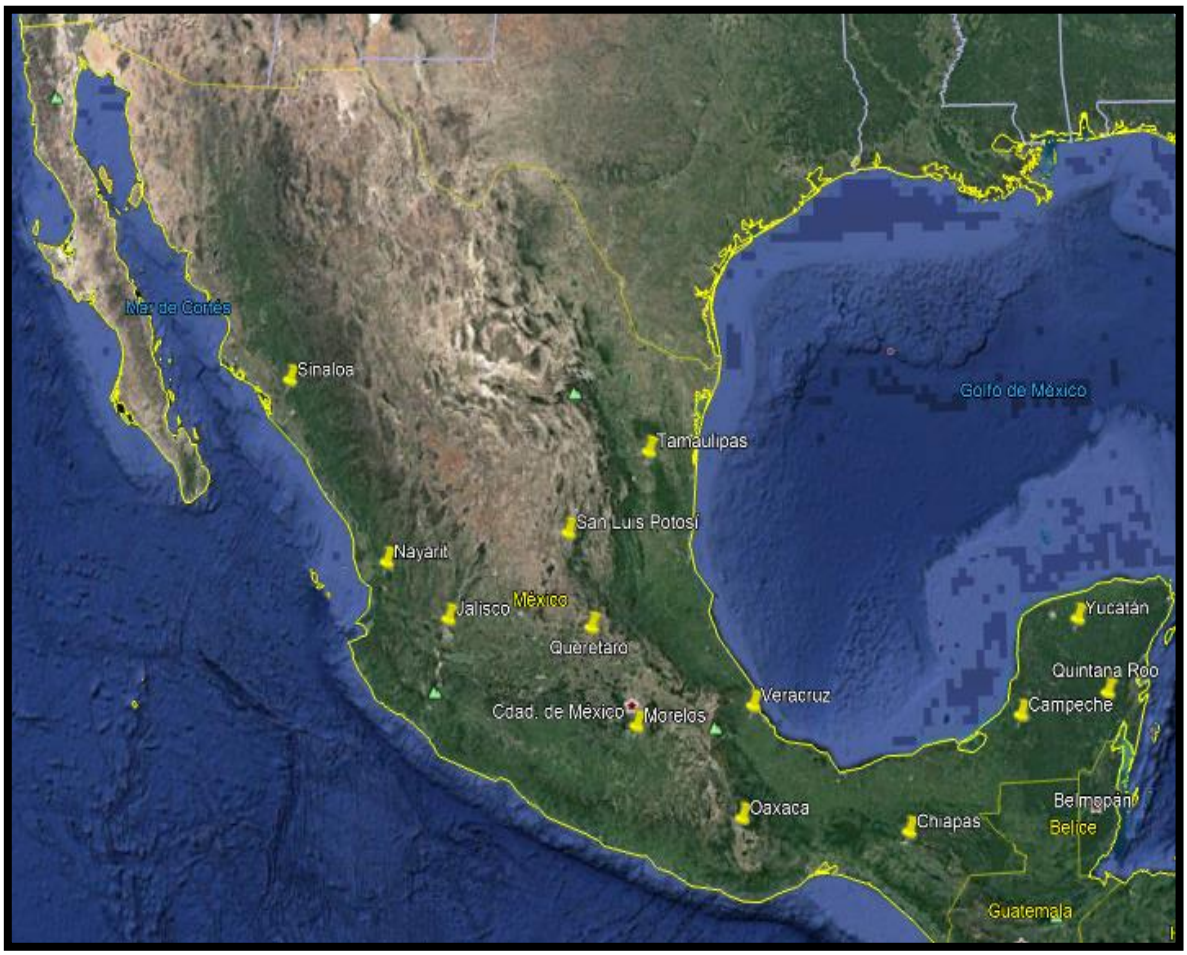


Figura 2. Mapa de distribución de Hamelia patens dentro del territorio nacional. Imagen de Google earth.

1.2.2 Propiedades y usos

En años recientes múltiples investigaciones científicas se han enfocado en *H. patens* ya que posee diversas propiedades, como son: la actividad antidiarreica (Pérez *et. al.*, 1996), antihiperglucémica (Andrade-Cetto *et. al*., 2015; Rugerio *et. al.*, 2017), leishmanicida (Suarez *et. al*., 2008), antihelmíntica y antimicrobiana

(Khandelwal *et. al*., 2012), antiinflamatoria e inhibidor de la actividad de la alfa-glucosidasa (Jiménez-Suarez *et. al*., 2016) y actividad antifúngica (Abubacker *et. al*., 2013). En el estado de Veracruz, en la región de Chicontepec, los pobladores de este municipio utilizan infusiones realizadas con las hojas secas de *H. patens* para calmar el ardor, bajar la inflamación y acelerar el proceso de cicatrización de heridas cutáneas. El método para la curación de la herida consiste en hervir las hojas secas en agua durante 10 minutos aproximadamente, luego se debe lavar la herida con la infusión lo más inmediatamente posible después de haberse ocasionado la lesión. De esta forma, los pobladores han observado que la herida cierra en un tiempo menor en comparación con una herida que sigue el proceso natural de cicatrización. En 2003, Alfredo Gomez-Beloz y colaboradores realizaron un bioensayo de curación de heridas de doble incisión en ratas a las cuales se les administró el extracto crudo de *H. patens*. Los animales se dividieron en tres grupos: grupo I (n = 14) tuvo la incisión izquierda tratada con 5% (p / p*) de H. patens* y el lado contralateral con vaselina (PJ), grupo II (n = 14) tuvo la incisión izquierda tratada con 10% (p / p) ungüento y el lado contralateral con vaselina y el grupo III (n = 10) tuvo la incisión izquierda tratada con vaselina y el lado contralateral no tratado. La resistencia a la rotura de las incisiones se midió los días 7 y 12 usando un tensiómetro. La fuerza de ruptura de la herida se midió como la fuerza mínima requerida para romper la incisión, presentada en Newtons (N), la cual se calculó multiplicando la masa (kg) por la aceleración de la gravedad (9.8 m / s^2). Para los grupos I y II, no hubo diferencia significativa entre incisiones de tratamiento y control en el día 7. En el día 12, hubo una diferencia significativa entre el tratamiento y control de incisiones para los grupos I y II. No hubo diferencias significativas entre la vaselina y las incisiones no tratadas para el Grupo III en los días 7 y 12. Por tanto, se concluyó que *H. patens* aumenta la resistencia a la rotura de las heridas significativamente en comparación con el grupo de control.

1.3 ¿Qué es el Electrohilado?

El electrohilado es un método sencillo, versátil y de bajo costo para fabricar fibras ultrafinas con diámetros que varían de 2 nm a varios micrómetros, es decir, menores al diámetro de un cabello (como se observa en la Figura 3). Dichas fibras pueden llegar a medir varios kilómetros (Li y Xia, 2004) y cuentan con una morfología de superficie controlada (Hu *et. al.*, 2014), las cuales pueden ser fabricadas a partir de una gran variedad de materiales (Li y Xia, 2004) como polímeros, tanto naturales como sintéticos (Bhardwaj y Kundu, 2010).

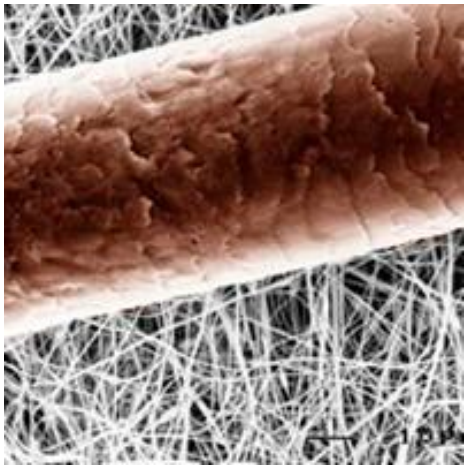


Figura 3. Comparación del diámetro de nanofibras poliméricas con el diámetro de un cabello. [Imagen]. Recuperado de https://www.plastico.com/temas/Desarrollan-nanofibras-de-polimeros-para-uso-medico+99206.

El arreglo experimental para la fabricación de estas nanofibras consiste básicamente en tres componentes principales: *i)* una fuente de energía de alto voltaje, *ii)* una aguja metálica unida a un dispensador (jeringa) y, *iii)* una placa colectora metálica (conectada a tierra), en donde se formará la biopelícula o membrana nanoestructurada (Figura 4). La jeringa, la cual contiene la solución del polímero altamente viscosa, presiona la solución de forma constante y controlada. Mientras tanto el alto voltaje (1-30 kV) suministrado a la aguja metálica provoca la expulsión de la solución la cual es constantemente atraída electrostáticamente a través del espacio. Como resultado la solución experimentará dos tipos de fuerzas electrostáticas: la fuerza electrostática entre las dos superficies cargadas y las fuerzas de Coulomb ejercidas por el campo eléctrico externo (Li y Xia, 2004). Cuando se aplica el voltaje, la gota colgante de solución del polímero se electrifica

y las cargas inducidas se distribuyen uniformemente sobre toda la superficie. La gota del polímero líquido se deformará en un objeto cónico conocido como cono de Taylor. Cuando el voltaje supera el valor umbral, la fuerza eléctrica supera la tensión superficial de la gota y uno o varios chorros cargados de la solución son expulsados de la punta de la gota (Hu *et. al*., 2014).

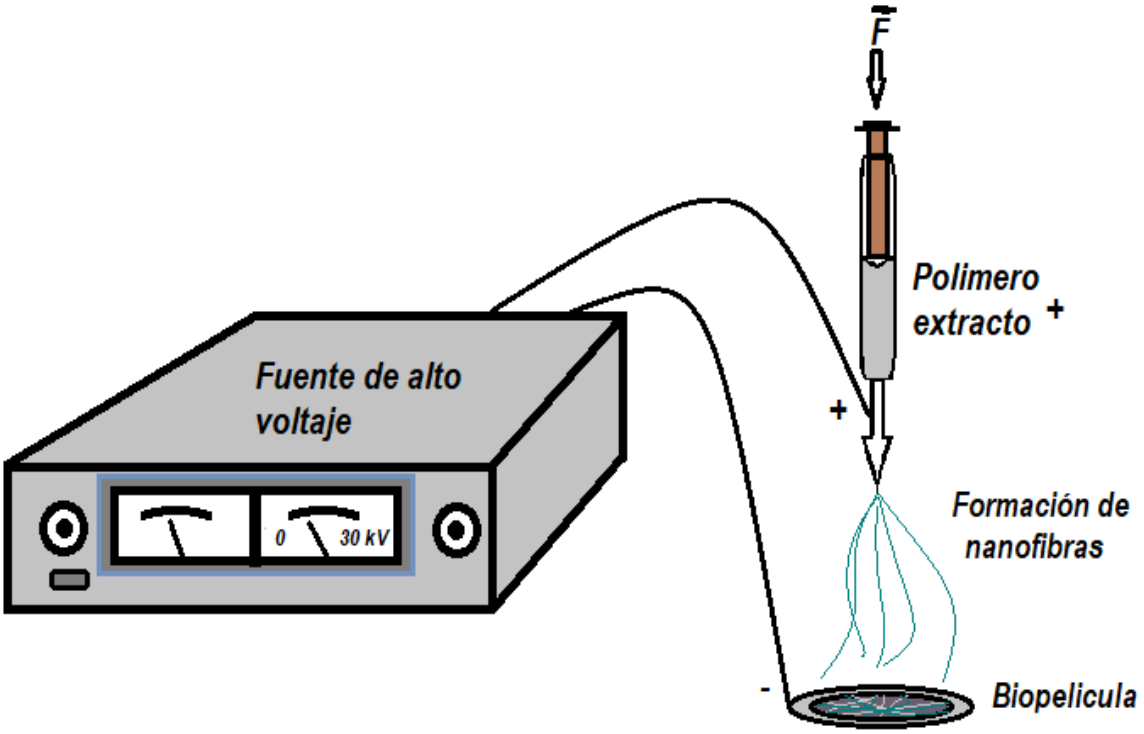


Figura 4. Esquema del arreglo experimental comúnmente usado para la fabricación de membranas nanoestructuradas mediante la técnica de electrohilado

Estas fuerzas eléctricas producen el proceso de flagelación y estiramiento produciendo la formación de una larga y delgada fibra (Li y Xia, 2004). La mayoría de los polímeros sintéticos deben ser disueltos en solventes con buena volatilidad, presión de vapor, punto de ebullición y que pueden mantener la integridad de la solución del polímero (Bhardwaj y Kundu, 2010), ya que estas características son ventajosas para la formación rápida y exitosa de la morfología única de las nanofibras durante el electrohilado. Sin embargo, las macromoléculas hidrofílicas no se mezclan homogéneamente con las soluciones de polímeros sintéticos para un método exitoso de electrohilado (Choi *et. al*., 2015). Conforme el líquido es continuamente elongado y el solvente es evaporado, el diámetro del hilo se ve

reducido a micrómetros e incluso nanómetros. Por último, la fibra cargada es depositada en la placa colectora de forma aleatoria (Li y Xia, 2004). dando como resultado una estructura porosa similar a un segmento de tela. La morfología y diámetro de las fibras se ve afectado por varios parámetros, como son (Choi *et. al*., 2015): a) las propiedades intrínsecas de la solución como el tipo de polímero, la conformación de la cadena del polímero, viscosidad, elasticidad, conductividad eléctrica, y la polaridad y la tensión superficial del solvente; b) las condiciones operacionales tales como la fuerza del campo eléctrico aplicado, la distancia que se encuentra entre la jeringa y la placa colectora y c) la humedad y la temperatura del ambiente juegan un rol importante en determinar la morfología y diámetro de las fibras (Li y Xia, 2004).

1.3.1 Antecedentes del electrohilado en la regeneración de tejido

Desde el año 2000 se ha avanzado mucho en el campo del electrohilado convirtiéndose en la técnica más confiable, simple y barata para la fabricación de nanofibras. Ya se han realizado miles de estudios de investigación utilizando polímeros tanto naturales como sintéticos (Khan *et. al*., 2018). En el campo médico, las nanofibras electrohiladas se han utilizado principalmente en la fabricación de andamios y apósitos para la regeneración y/o reparación de tejidos y órganos, incluyendo: injertos vasculares, nervios, córnea, piel, cartílago, hueso y músculo cardiaco. Existen reportes de nanofibras funcionalizadas con nanopartículas de plata para el tratamiento de heridas o quemaduras con excelentes resultados; sin embargo, el uso de extractos vegetales en el área de electrohilado es relativamente nuevo, solo algunos cuantos trabajos han logrado electrohilar extractos vegetales exitosamente. Yao y colaboradores produjeron nanofibras de gelatina cargadas con *Centella asiática* (yao *et. al*., 2015). La Baicaleína, una hierba china con propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y antioxidantes se incorporó exitosamente en fibras de fibroína de seda y polivinilpirrolidona (Chan *et. al*., 2017). Sadri y colaboradores han analizado el efecto del extracto de té verde electrohilado en un

matriz de quitosano y óxido de polietileno (Sadri *et. al*., 2015). *Garcinia mangostana*, una fruta tropical que se encuentra en el sudeste asiático se electrohilo en una matriz de quitosano (Suwantong *et. al*., 2014). Suganya y colaboradorez han propuesto el uso de nanofibras de policaprolactona e incrustación de polivinilpirrolidona y extractos de corteza de *Tecomella undulata*, una planta medicinal de las regiones del desierto de Thar del noroeste y el oeste de la India, para el tratamiento de infecciones cutáneas (Suganya *et. al*., 2014). Balasubramanian y colaboradores han dirigido su atención hacia el aceite de *Syzygium aromaticum* (clavo), que está compuesto principalmente de eugenol y cariofileno El aceite ha sido encapsulado con éxito en esteras electrohiladas de poliacrilonitrilo. También se han electrohilado aceites esenciales de lavanda en nanofibras de alginato de sodio para la producción de apósitos adecuados para tratar quemaduras cutáneas inducidas por radiación ultravioleta de rango medio (Hajiali *et. al*., 2016). Ganesan P. y Paradeepa P. utilizaron extractos de *Tridax procumbentsis* para preparar con éxito nanofibras con alcohol polivinílico (Ganesan *et. al*., 2017). Un recubrimiento bioactivo preparado de nanofibras con extracto de *Urtica dioica* se mezcló con policaprolactona (Erbay *et. al*., 2017). Otras nanofibras fueron preparadas utilizando aceite esencial de eucalipto y β-ciclodextrina (Antunesa *et. al*., 2017). En un estudio el extracto de manzanilla se cargó en policaprolactona/PS (Motealleh *et. al*., 2014). Otro estudio realizado por Costa y colaboradores prepararon un bionanocompuesto utilizando alcohol polivinílico/nanofibras de piña/extracto de corteza de *Stryphodedron barbatimao* (Costa *et. al*., 2013). Se fabricaron esteras de nanofibras electrohiladas utilizando extracto de hoja de *Lawsonia inermis* (Henna), quitosano y oxido de polietileno (Yousefi *et. al*., 2017). Otro nanocompuesto se elaboró mediante el uso el extracto de *Juniperus chinesis* y alcohol polivinílico (HwaKim *et. al*., 2016). Otra fabricación exitosa son las nanofibras de *Annona muricata* en la que se preparó un material utilizando el extracto de hojas y polímero alcohol polivinílico (Aruan *et. al*., 2017). También se fabricaron con éxito andamios compuestos mediante el uso de extracto de hierbas de *Beta vulgaris* y cultivo de células madre y queratinocitos humanos (Hosseinzadeh *et. al*., 2017). Una incorporación exitosa de curcumina se realizó en

una mezcla de ácido polilactico y poliglicerol hiperramificado (Perumal *et. al*., 2017). Se realizó un esfuerzo en el que se mezcló extracto de *Aloe vera* con ácido poliglicólico y factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (rhEGF) para sinergizar el efecto del rhEGF y el extracto *Aloe vera* (Garcia-Orue et.al., 2017). El extracto de semilla de uva se electrohilo con éxito en SF/óxido de polietileno por Si lin y colaboradores (Lin *et. al*., 2016). Suwantong y colaboradores prepararon un apósito antibacteriano en el que utilizaron extractos de *Garcinia mangostana* linn y ácido polilactico (Suwantong *et. al*., 2014). En otro trabajo se electrohilaron el extracto metanólico de *Grewia mollis* Juss con poli (D, L-lactida-co-glicólido) y ácido pliglicólico (Al-Youssef *et. al*., 2013). Por último, el extracto de *Calendula officinalis*, como cicatrización natural de heridas y agente antiinflamatorio, se mezcló con éxito con poliglicerol hiperramificado para producir una estructura nanofibrosa como sistema activo de suministro de fármacos por Torres Vargas y colaboradores (Vargas *et. al*., 2010). Sin embargo, las publicaciones de nanomembranas dopadas con extractos vegetales para la cicatrización de heridas aún son muy pocas en comparación con el resto de las publicaciones en el campo del electrohilado. Debido a todo lo anterior, la presente tesis de investigación tiene como propósito estudiar los extractos de *Hamelia patens* (una planta utilizada en la medicina tradicional mexicana y en algunas poblaciones latinoamericanas que, pese a los numerosos estudios sobre sus múltiples propiedades, solo cuenta con un estudio publicado de su capacidad cicatrizante) en el tratamiento de heridas cutáneas, empleando un modelo murino. Este trabajo surge de la colaboración de investigadores y alumnos con diferentes formaciones académicas (físicos, biólogos y químicos farmacobiologos) e instituciones de investigación (BUAP, CIBA-IPN), que buscan rescatar un poco del conocimiento de la medicina tradicional y aplicarlo de una forma novedosa utilizando el conocimiento de las investigaciones en el área de nanomateriales.

2. La piel y la cicatrización

2.1 Estructura de la piel

La piel posee un área aproximada de $2m^2$ y un peso de 3 a 4 kg equivalente del 6-12% del peso corporal en un ser humano adulto, siendo así el órgano más extenso del cuerpo al cual envuelve de manera completa y continua (Singer *et. al*., 1999). La piel consiste en dos láminas de tejido: una epidermis estratificada queratinizada y una dermis gruesa subyacente rica en colágeno, la cual sirve de soporte y alimentación (Figura 5A) (Martin, 1997).

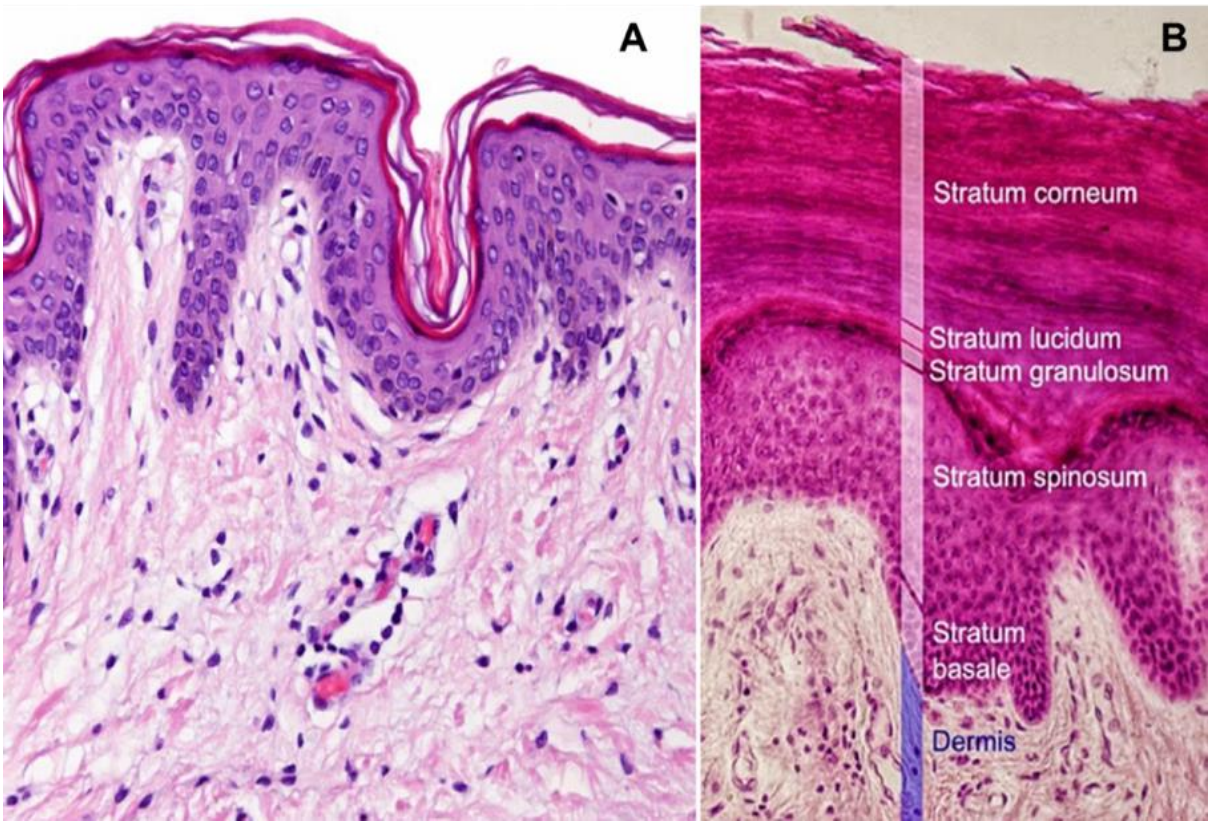


Figura 5. A) Histología de piel humana teñida por técnica de Hematoxilina-Eosina. [Fotografía]. Recuperado de https://www.anatomiatopografica.com/histologia/histologia-de-la-piel/. B) Mikael Häggström. Diferencias histológicas de las capas que componen a la epidermis en una histología de cerdo. Se utiliza la piel de cerdo debido a que su piel es más gruesa y se pueden observar fácilmente las estructuras que la componen. [Fotografía]. Recuperado de http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0.

2.1.1 Epidermis

Es la capa externa de la piel que consiste en densas acumulaciones de células adheridas entre sí, fijadas a una capa no celular subyacente mediante uniones especializadas. Estos contactos producen que las células se adhieran y se comuniquen entre sí y, actúa como barrera frente a agresiones físicas, mecánicas, químicas y biológicas (Karp, 2014). En esta región se reconocen de 4 capas:

- **Estrato basal**, constituido por una sola fila de queratinocitos, poseen un proceso de mitosis activo y dan lugar a las células de estratos superiores (Figura 5B).
- **Estrato espinoso**, formado por 5-10 capas de queratinocitos. Los queratinocitos de capas superiores desarrollan orgánulos redondeados llamados cuerpos lamelares (o cuerpos de Odland) que secretan lípidos al espacio intersticial formando la barrera epidérmica de permeabilidad cuya función es evitar la deshidratación (Figura 5B).
- **Estrato granuloso**, constituido de 1 a 3 capas de queratinocitos que presentan unos orgánulos aplanados llamados gránulos de queratohialina que forman un complejo proteico que refuerza la membrana plasmática con la finalidad de impedir que los queratinocitos se desintegren una vez que han muerto por apoptosis (Figura 5B).
- **Estrato córneo**, representa la fase final de diferenciación epidérmica y sus células llamadas corneocitos solo están constituidos por la membrana plasmática que rodea a una gran cantidad de queratina (Figura 5B).

2.1.2 Dermis

La dermis, situada por debajo de la epidermis, es un tipo de tejido conjuntivo que está formado sobre todo por material extracelular y es por lo menos 10 veces más gruesa (Figura 5B) (Karp, 2014). En esta capa y la capa subyacente, el tejido celular subcutáneo, se localizan los distintos anexos cutáneos; además, de vasos sanguíneos y nervios. La dermis está formada por una red de fibras de colágeno tipo I y tipo III mezcladas con fibras de elastina, entre estas fibras existe una gran

cantidad de matriz intersticial amorfa constituida por ácido hialurónico y proteoglicanos (Singer *et. al*., 1999).

2.1.3 Matriz extracelular

La matriz extracelular (ECM, por sus siglas en ingles), es un material inerte de soporte y adhesión celular inespecífico que tiene una función reguladora para determinar formas y actividades celulares. Las proteinas de la ECM son fibrosas y extendidas, y sirven como andamios, vigas, cables, y pegamento. Estas moléculas se secretan al espacio extracelular donde se autoensamblan en una red tridimensional interconectada. Uno de sus principales es el colágeno, el cual proporciona un marco insoluble que determina muchas de las propiedades mecánicas de la ECM (Karp, 2014). La adherencia a la ECM estimula la metamorfosis de los monocitos hacia macrófagos inflamatorios o reparativos, induce a los monocitos y macrófagos a expresar factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), una citoquina necesaria para la supervivencia de los monocitos y los macrófagos; factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), una potente citocina inflamatoria; y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un potente quimioatrayente y mitógeno para los fibroblastos (Rappolee *et. al*., 1988; Singer *et. al*, 1999).

2.2 ¿Qué es una herida?

A la pérdida de la estructura anatómica y funcional de la piel se le conoce como herida (Figura 6). Este daño puede ser superficial (interrupción de la integridad epitelial) o profunda, extendiéndose a tejidos subcutáneos como tendones, músculos, glándulas, nervios, órganos e incluso el hueso (Velnar et al., 2009).

Figura 6. A) Ejemplo de un tipo de herida aguda causada por un objeto punzocortante. [Fotografía]. Recuperado de https://www.periodicocentral.mx/2018/vida-y-estilo/item/13932-toda-tu-vida-has-utilizado-mal-el-merthiolate-descubre-la-razon. B) Ejemplo de una herida crónica causada por una quemadura. Es necesario retirar la piel necrosada para exponer el lecho de la herida al tratamiento que se desea aplicar.

2.2.1 Tipos de heridas

Agudas

Las heridas agudas (Figura 6A), son aquellas heridas que se reparan a sí mismas en un rango de tiempo de 5-30 días, sin complicaciones en alguna de las etapas del proceso de cicatrización y dan como resultado la restauración del tejido tanto funcional como anatómicamente (Velnar *et. al*., 2009).

Crónicas

Las heridas crónicas (Figura 6B), son aquellas que no pueden ser cicatrizadas en el tiempo correspondiente y el proceso es incompleto debido a que una o más de las fases se ven afectadas. Varios factores intervienen: infección, hipoxia tisular, necrosis, exudados o niveles altos de citocinas inflamatorias (Velnar *et. al*., 2009).

2.3 Proceso de cicatrización

La cicatrización es un proceso dinámico que consiste en cuatro continuas, precisas y sobrepuestas fases: i) fase de hemostasia, ii) fase inflamatoria, iii) fase proliferativa y, iv) fase de remodelación (Gou y DiPietro, 2010), además, involucra múltiples poblaciones celulares, la ECM y la acción de factores de crecimiento y citocinas (Velnar *et. al*., 2009). Este proceso inicia con la discontinuidad del tejido y culmina con la restitución del tejido y la formación de una cicatriz en un periodo de tiempo apropiado (Schreml *et. al*., 2010) (Figura 4).

2.3.1 Fase de hemostasis

Esta fase inicia inmediatamente después de presentarse la lesión y su objetivo principal es evitar la pérdida de fluido sanguíneo mediante el cese de la hemorragia, la constricción vascular y la formación de un coágulo (Guarín-Corredor *et. al*., 2013) (Gou y DiPietro, 2010) (Velnar *et. al*., 2009). El reflejo neural induce la contracción de las células musculares de los vasos provocando que se constriñan con rapidez, posteriormente la cascada de coagulación provoca la agregación plaquetaria formando un coágulo (Figura 7a) (Velnar *et. al*., 2009), el cual controla la fuga de sangre y la formación de una ECM provisional (Schreml *et. al*., 2010). El coágulo consiste en un cúmulo de plaquetas embebidas en una red de fibras de trombina, fibrinógeno, fibronectina, vitronectina y trombospondina (Martin, 1997), tanto el coágulo como el tejido circundante a la herida secretan citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento como factor de crecimiento beta (TGF-β), PDGF, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento epidermal (EGF) (Gou y DiPietro, 2010). Estas moléculas activan y atraen neutrófilos, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos (Velnar *et. al*., 2009). Clínicamente esta fase se correlaciona con los eritemas (enrojecimiento de la piel) (Schreml *et. al*., 2010).

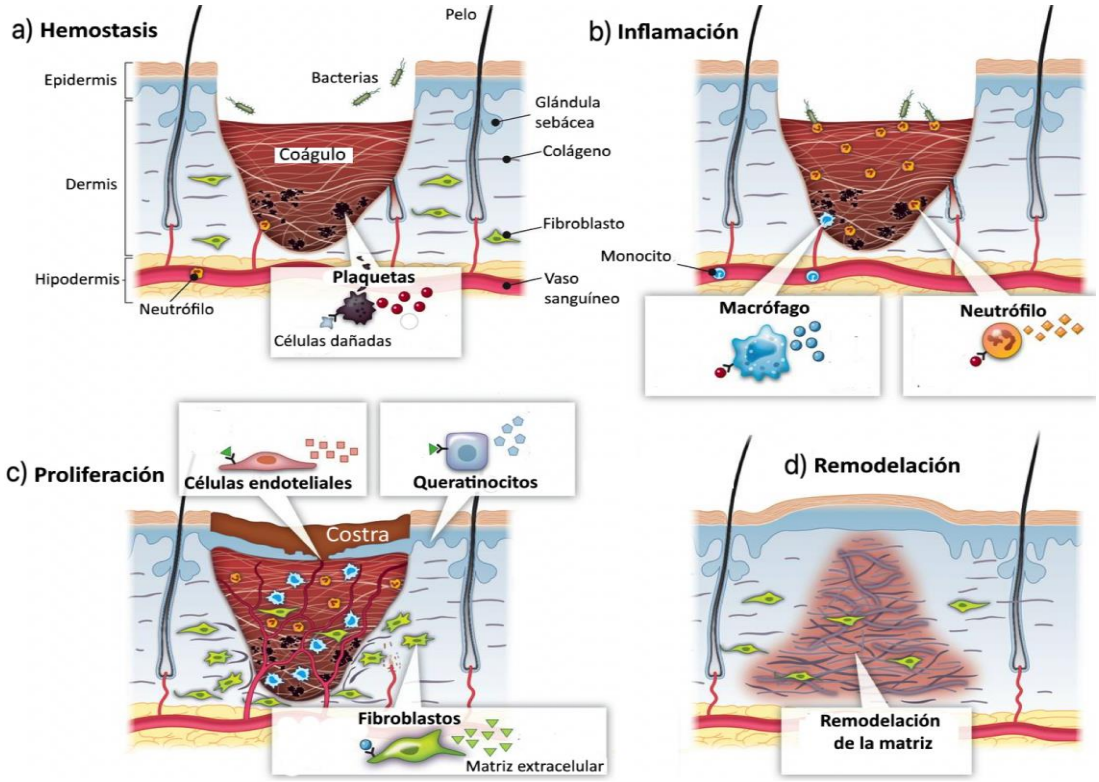


Figura 7. Fases del proceso de cicatrización y los grupos celulares que intervienen. [Esquema]. Recuperado de https://luishuert.wordpress.com/2018/01/21/cicatrizacion/.

2.3.2 Fase inflamatoria

Una vez que el sangrado es controlado, las células inflamatorias (cuya función principal es la prevención de infecciones) como neutrófilos, macrófagos y linfocitos migran a la herida (quimiotaxis) (Figura 7b) (Gosain and DiPietro,2004; Broughton *et. al*., 2006; Campos *et. al*., 2008; Guo y DiPietro, 2010). La adhesión a la ECM provisional estimula a los monocitos a convertirse en macrófagos inflamatorios o reparadores y los induce a expresar CSF-1, citocinas, TNF-a, proteínas inflamatorias y PDGF (Singer *et. al*., 1999). Los neutrófilos inician la fagocitosis destruyendo y removiendo bacterias, partículas externas y daños tisulares (Velnar *et. al*., 2009) y producir sustancias complementarias como proteasas y especies reactivas de oxígeno (ROS) que facilitan la tarea de eliminación de microbios ambientales y desechos celulares (Gou y DiPietro, 2010). Posteriormente, los macrófagos migran y continúan el proceso de fagocitosis (Velnar *et. al*., 2009). En la herida temprana, liberan citocinas que promueven la respuesta inflamatoria al

reclutar y activar leucocitos adicionales. Son responsables de inducir y eliminar las células apoptóticas (incluidos los neutrófilos), preparando así el camino para la desinflamación. A medida que los macrófagos eliminan estas células apoptóticas, experimentan una transición fenotípica a un estado reparador que estimula los queratinocitos, los fibroblastos y la angiogénesis para promover la regeneración de los tejidos (Meszaros *et. al*., 2000; Mosser and Edwards, 2008; Gou y DiPietro, 2010). A las 72 horas después de haberse producido la herida los linfocitos migran y secretan interleucina 1 (IL-1) e inmunoglobulina G (IgG). La IL-1 participa en la regulación de la colagenasa, la cual es requerida para la remodelación de colágeno y producción de algunos componentes de la matriz extracelular (Velnar *et. al*., 2009).

2.3.3 Fase proliferativa

La fase proliferativa generalmente continua y se sobrelapa con la fase inflamatoria. Esta fase es caracterizada por la proliferación epitelial y la migración sobre la ECM provisional compuesta por fibrina y fibronectina (reepitelización). Al término de la primera semana, una abundante cantidad de ECM es acumulada, la cual sirve como soporte para la migración celular. Los fibroblastos cambian a miofibroblastos, activan sus haces de actina y utilizan sus pseudópodos para sujetarse a la fibronectina y al colágeno de la ECM y generarando una abundante formación de tejido granuloso (Velnar *et. al*., 2009). Los fibroblastos y las células endoteliales son los tipos celulares más abundantes y participan en el crecimiento capilar, formación de colágeno, y la formación y granulación del tejido en la zona lesionada (Figura 7c) (Gou y DiPietro, 2010). Los macrófagos proporcionan una fuente continua de factores de crecimiento necesarios para estimular la fibroplasia y la angiogénesis; los fibroblastos producen la nueva ECM necesaria para soportar el crecimiento celular; y los vasos sanguíneos transportan oxígeno y nutrientes necesarios para mantener el metabolismo celular (Singer *et. al*., 1999). Las células T gamma-delta migran hacia la herida siguiendo a las células inflamatorias y a los macrófagos, regulan el mantenimiento de la integración tisular, la defensa contra patógenos y la regulación inflamatoria. Estas células son activadas por estrés, daño, o por la transformación de queratinocitos y por la producción de factor de crecimiento 7

(FGF-7) producido por fibroblastos, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), y factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-1), para apoyar la proliferación de queratinocitos y la supervivencia celular (Gou y DiPietro, 2010).

2.3.4 Fase de remodelación

Por último, la fase de remodelación puede durar hasta 1 o 2 años dependiendo la extensión y características de la lesión (Gou y DiPietro, 2010) (Velnar *et. al*., 2009). La ECM provisional es gradualmente reemplazada por una matriz de colágeno, estas fibras de colágeno incrementan en diámetro y el ácido hialurónico y la fibronectina son degradados (Velnar *et. al*., 2009). Una vez que se ha depositado una abundante matriz de colágeno, mejor orientada y reticulada, los fibroblastos dejan de producir colágeno y el tejido granuloso rico en fibroblastos y macrofagos (Singer *et. al*., 1999) disminuye por apoptosis, el crecimiento de los capilares se detiene, el flujo de sangre en el área disminuye y la actividad metabólica en el sitio de la herida disminuye. El resultado es una cicatriz totalmente madura con un número reducido de células y vasos sanguíneos con una alta fuerza de tensión (Figura 7d) (Velnar *et. al*., 2009). Las cicatrices pueden ser hipertróficas y duras o atróficas y blandas, con un adelgazamiento o pérdida de todos los compartimentos tisulares de la piel (Wolf y Johnson, 2005).

3. Apósitos para la curación de heridas

3.1 ¿Qué es un apósito?

Los apósitos (Figura 8), son el conjunto de materiales que se disponen para favorecer el proceso de cicatrización. Se clasifican según su modo de acción en: pasivos y activos. Los apósitos pasivos son aquellos que no interactúan con la herida, tienen alta capacidad de desecación, poca absorción y favorecen la infección. El más representativo es la gasa tejida o prensada (Jiménez, 2008). Los apósitos activos son los utilizados en la curación avanzada e interactúan con la herida favoreciendo su proceso de cicatrización. Las características ideales que deben cubrir estos materiales son: que deben mantener un ambiente húmedo fisiológico que favorezca la granulación, crear una barrera que aíslen la herida y la protejan de contaminación, mantener un ambiente térmico fisiológico, permitir el intercambio gaseoso, adecuada circulación sanguínea, facilitar la eliminación de exudado y ser capaz de absorberlo. Además, deben ser adaptables, flexibles, de fácil manipulación y bajo costo, que se encuentren libre de tóxicos, con un adhesivo que no lesione la piel circundante, permitir su retiro y cambio sin provocar dolor o traumatismo, que permitan valorar la evolución de la lesión sin retirarlo, que no liberen mal olor ni que manchen la piel ni la herida (Castellanos-Ramirez *et. al*., 2014). Deben ser estériles, no alergénicos, que no dejen residuos en la herida, que se adapten a los contornos anatómicos, sean resistentes, sean costo-efectivos, que disminuyan el dolor (Jiménez, 2008), proporcionar compresión si se anticipa el sangrado o la inflamación, permitir la aplicación de medicamentos y favorecer el desbridamiento del tejido necrótico (Flores, 2006).

3.2 Tipos de apósitos

3.2.1 Hidrocoloides

Son apósitos que están hechos de carboximetilcelulosa, gelatina y pectinas. Están disponibles como pastas, polvos o láminas adhesivas. Al contacto con la herida, el apósito se gelifica, lo cual favorece el ambiente húmedo en la herida y permite la absorción del exudado; son impermeables al agua y a las bacterias, aunque permiten la difusión del vapor de agua del interior de la herida al medio exterior. Son útiles para debridar, pero no manejan bien el exudado abundante, ni se deben usar en caso de infección por ser altamente oclusivos, en condiciones clínicas normales producen una interfase gelatinosa de mal olor al estar en contacto con la herida que no debe confundirse con infección (Flores, 2006).

3.2.2 Alginatos

Están compuestos por fibras de polisacáridos derivadas de las algas, con gran capacidad de absorción y gelificación (Flores, 2006). El gel crea un medio oclusivo y húmedo que permite la cicatrización. Al entrar el apósito en contacto con el exudado, los iones de sodio de la herida se unen a los iones de calcio del apósito y se forma alginato de sodio y sal de calcio.

3.2.3 Hidrogeles

Son polímeros de almidón, como el óxido de polietileno o los polímeros de carboximetilcelulosa, más 80% de agua. Están disponibles como gel, hojas o gasas impregnadas; su función es rehidratar y debridar, pero no absorben el exudado (Jiménez, 2008) (Flores, 2006).

3.2.4 Apósitos de colágeno

Son compuestos derivados del colágeno bovino tipo I: 90% colágeno y 10% de alginato. Absorben y crean una matriz de soporte para el crecimiento y la migración

celular. Están indicados en tejido de granulación, nunca en tejido infectado (Jiménez, 2008).

3.2.5 Hidropolímeros

Son polímeros con gran capacidad de absorción, compuestos de moléculas de poliuretano que se expanden al atrapar el exudado y una cubierta impermeable de polivinilo, que generan una barrera protectora. Son ideales para el manejo ambulatorio en heridas grandes y muy exudativas (Jiménez, 2008)

3.2.6 Espumas

Espumas hidrofílicas, también conocidas como foam o hidrocelulares, son a base de poliuretano de alta tecnología, adherente y permeable a los gases, altamente absorbente que se expanden y se acomodan a la morfología de diferentes tipos de heridas, son útiles en la protección del tejido de granulación y epitelización, se pueden usar en heridas infectadas ya que estos apósitos manejan bien el exudado de moderado a abundante. Tienen una estructura trilaminar: una lámina interior en contacto con la lesión, otra intermedia hidrocelular suave altamente absorbente, y una exterior que actúa como barrera bacteriana impermeable a fluidos (Flores, 2006).

3.2.7 Apósitos de control de metaloproteinasas

Las metaloproteinasas se encuentran anormalmente elevadas en los pacientes con heridas crónicas y estancan el proceso de cicatrización, manteniendo las heridas perpetuamente inflamadas. Los apósitos controlan estas enzimas, las disminuyen y estimulan el proceso de cicatrización (Jiménez, 2008).

3.2.8 Películas no adherentes

Son gasas impregnadas con diferentes sustancias para prevenir su adherencia a la superficie de la herida. Se utilizan como apósitos primarios para proteger el tejido de granulación (Jiménez, 2008).

Figura 8. Ejemplos de algunos tipos de apósitos utilizados en la curación de heridas. [Fotografíis]. Recuperado de https://www.meditip.lat/salud-de-la-a-z/heridas/apositos-para-heridas/.

4. Justificación

Las heridas son un problema de salud que afecta a un gran número de personas de distintas edades y requieren un cuidado adecuado y óptimo de los pacientes que las presentan. La prevalencia e incidencia de heridas aumenta como resultado del aumento de la edad media de la población, los incrementos continuos en la prevalencia de obesidad, diabetes y arteriopatía de las extremidades inferiores. Las heridas ocupan un porcentaje elevado en las demandas de los servicios de urgencias, tanto hospitalario como extrahospitalario, y presentan un gran reto clínico ya que en la mayoría de los casos existen complicaciones tempranas o tardías las cuales representan con frecuencia una alta morbilidad y mortalidad (Velnar *et. al*., 2009). Se ha estimado que las heridas crónicas afectan 120 personas con edades entre 45 y 65 años por cada 100 000 habitantes y este número asciende a 800 personas por cada 100 000 en edades mayores a los 75 años (Velnar *et. al*., 2009). Las heridas crónicas implican un enorme gasto, con un costo total estimado de 3 billones de dólares por año tan solo en los Estados Unidos (Mathieu *et. al*., 2006; Menke *et. al*., 2007; Gou y DiPietro, 2010). En Europa, el costo promedio por episodio es de 36,650 euros para las úlceras en las piernas y 310,000 euros para las úlceras en los pies, lo que representa del 2 al 4% de los presupuestos de atención médica. En economías emergentes como en México, es complicado obtener fondos para el tratamiento de heridas, la obtención de recursos conlleva a competir con otras áreas sanitarias que también buscan financiamiento.

El manejo inadecuado de las heridas tiene numerosas consecuencias negativas para el paciente, retrasa el procedimiento de cicatrización, incrementa los días de hospitalización, dando lugar a la disminución de la autonomía del paciente. La curación tradicional con materiales pasivos no siempre mejora el proceso de cicatrización, en ocasiones lo disminuyen, aumentan los costos, aumentan la incidencia de infección y generan más dolor, debido a que en cada sesión de curación se remueve tejido sano y son más costosas porque implican gastos para el sector salud y para el paciente en cada consulta (Jiménez, 2008). Si la herida

crónica logra ser curada el producto final resulta no ser ni estético ni perfectamente funcional. Los apéndices epidérmicos que se han perdido en el sitio de la lesión no se regeneran y después que la herida ha sido sanada queda un tejido en el cual la matriz de colágeno ha sido pobremente reconstruida (Martin, 1997).

Existen novedosos protocolos de manejo y seguimiento sobre todo para el tratamiento de heridas crónicas o de gran superficie que no siempre se implementan en los sistemas de salud porque se desconocen o no se tiene acceso a ellos por su elevado costo y continúa prevaleciendo la experiencia del personal frente a la evidencia científica. Los avances tecnológicos han permitido el desarrollo de nuevas y modernas terapias para el manejo de las heridas complejas, por ejemplo, técnicas avanzadas (Jiménez, 2008) de nanomateriales en forma de membranas compuestas de fibras. Los nanomateriales son estructuras con dimensiones de 100 nm o menos, en específico, las membranas compuestas de nanofibras tienen una alta porosidad y han mostrado un enorme potencial para mejorar y acelerar la regeneración de tejidos. En los últimos 15 años se ha explotado una técnica novedosa para generar nanofibras poliméricas denominado electrohilado (Li y Xia, 2004).

México adicionalmente posee una riqueza de especies vegetales a las que se han atribuido propiedades cicatrizantes, entre ellas la especie *Hamelia patens* Jacq, que no ha sido lo suficientemente estudiada por lo que aún se desconoce en qué mecanismos de cicatrización interviene, así como los ingredientes activos que desencadenan estos mecanismos. Para poder demostrar la efectividad de un tratamiento hay que disponer de datos que prueben que la modalidad o el protocolo son clínicamente eficaces mediante un detallado análisis morfológico y fisiológico del tejido cicatricial resultante. El proceso de cicatrización es un fenómeno complejo que requiere conocimientos específicos. Por tanto, en este proyecto de tesis se evalúa el uso de membranas nanoestructuradas de PVP dopadas con extractos de *Hamelia patens* en la regeneración de heridas cutáneas en modelos murinos y, su potencial uso terapéutico para el tratamiento de heridas de difícil cicatrización.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar la participación de membranas nanoestructuradas dopadas con extractos de *H. patens* en la regeneración de heridas cutáneas en modelos murinos y su potencial uso terapéutico para el tratamiento de heridas de difícil cicatrización.

5.2 Objetivos Específicos

1. Identificar mediante espectrofotometría UV-visible e infrarroja, los principales grupos funcionales de los compuestos que se encuentran en los extractos de *H. patens*, responsables de sus propiedades terapéuticas.
2. Fabricar membranas poliméricas de PVP (Polivinilpirrolidona) con el extracto de la planta medicinal y sin extracto, empleando la técnica de electrohilado,
3. Caracterizar morfológicamente las membranas poliméricas con extracto y sin extracto de planta medicinal, mediante microscopia electrónica de barrido (SEM).
4. Cuantificar el cierre de las heridas de los distintos tratamientos mediante fotografías convencionales.
5. Analizar morfológica e histológicamente (técnica H&E) el tejido cicatricial de las heridas cutáneas tratadas con las membranas poliméricas con extracto y sin extracto de planta medicinal; así como el efecto de los extractos vegetales por separado.
6. Comparar la síntesis de colágeno en el proceso de remodelación de las heridas en los distintos tratamientos mediante análisis espectrofotometría infrarroja acoplada a microscopio.

6. Hipótesis

El uso de membranas de PVP nanoestructuradas mediante la técnica de electrohilado con extractos de *H. patens* favorecerá la cicatrización de heridas cutáneas debido a que proporcionarán un entramado de andamios que sirven como guías para una mejor adhesión, proliferación y diferenciación de las células cutáneas. De igual forma el gran número de poros de las nano membranas facilitará el intercambio de nutrientes, desechos celulares, exudado y oxigeno con el medio externo. Adicionalmente la acción antimicrobiana y antifúngica de *H. patens* proporcionará un lecho de la herida libre de biofilm, el cual es bien conocido que retrasa el proceso de cicatrización. También la actividad antioxidante de los extractos de *H. patens* podría regular la respuesta inmune, durante la fase inflamatoria, ayudando a acelerar el proceso de cicatrización.

7. Metodología

7.1 Colecta del material biológico

Las hojas de *H. patens* fueron colectadas en la localidad de Buenavista (18°52’30.42’’N, 96°54’35.44’’O), municipio de Ixtaczotitlan en la región de las altas montañas de la zona centro del estado de Veracruz (ver Figura 9), durante la primera semana del mes de mayo del 2018. Se colectaron hojas maduras con peciolo completo de plantas que tuvieran una altura mayor a un metro, que estuvieran en floración y que no tuvieran signos de estar enfermas o invadidas por algún tipo de plaga.

Figura 9. Zona centro del estado de Veracruz. El globo color rojo señala la región en la cual las hojas fueron colectadas. [Mapa]. Recuperado de Google earth.

7.2 Procesamiento del material biológico

Las hojas fueron secadas a temperatura ambiente bajo sombra y posteriormente fueron pulverizadas manualmente con un mortero y tamizadas hasta conseguir un polvo fino (~5 µm de tamaño). Para la elaboración del extracto alcohólico se

maceraron 100 g de hoja seca en 1000 ml de alcohol etílico durante 7 horas y, para la infusión se hirvieron 557 g de las hojas secas en 3000 ml de agua destilada por un periodo de 10 minutos. La infusión se ultracongelo a -18 °C y liofilizó en un liofilizador Freezone con colector recubierto PTFE 115V 6-CTR, una vez liofilizada, se hizo una dilución 1:1 en agua destilada.

7.3 Caracterización del extracto por Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y por Espectroscopia UV-Vis

Posteriormente los extractos y la infusión fueron caracterizados por espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR spectroscopy) en un espectrofotómetro marca Bruker, modelo Vertex 70 (ver Figura 10), en las instalaciones del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), campus Tlaxcala. Se utilizó el software “Opus” para generar los espectros de absorción. La espectroscopía infrarroja (IR) es una técnica de medición de la absorción (o transmisión) de radiación infrarroja por un material en función de la longitud de onda (o frecuencia) (Gaffney *et. al*., 2012), en otras palabras, mide la vibración molecular. Los grupos funcionales pueden ser asociados con bandas de absorción de radiación infrarroja características, las cuales corresponden a vibraciones fundamentales de dichos grupos funcionales (Colthup, 1975). La caracterización por espectroscopia por luz ultravioleta-visible se realizó por medio un espectrofotómetro marca Thermo scientific modelo Evolution 600 uv-vis y se utilizó el software “Vision pro” para generar los espectros de absorción. Empleando la espectroscopía UV-Vis, es posible investigar la transferencia de electrones resultado de la insaturación y/o la presencia de electrones no unidos a orbitales o grupos de átomos, iones, y moléculas en fase gaseosa, así como en líquidos y sólidos. Una ventaja significativa de la espectroscopía UV-Vis radica en la detección individual de transferencias de electrones sin superposición de bandas vibratorias vecinas a diferencia de la espectroscopía IR (Hunger y Weitkamp, 2001). La radiación electromagnética en la

porción UV-Vis varía en longitud de onda, aproximadamente 200 a 700 nm. El rango UV va desde 200 a 350 nm y el rango visible de 350 a 700 nm y su objetivo principal es la cuantificación de la concentración de un analito determinado en una solución de muestra basada en la cantidad de luz absorbida de un haz de referencia a medida que pasa a través de la solución muestra (Penner, 2009).

Figura 10. Fotografía de un espectrómetro Bruker Vertex 70 en el cual se caracterizaron los extractos de H. patens.

7.4 Fabricación y caracterización de las membranas

Las membranas se obtuvieron a través de la técnica de electrohilado (descrito anteriormente) empleando un equipo Spelleman con un voltaje fijo de 15 kV a una distancia de 15 cm entre el dispensador y la placa colectora (papel aluminio) con un arreglo experimental similar al mostrado en la Figura 4. La solución precursora fue de polivinilpirrolidona (PVP) al 10% en peso diluido en alcohol isopropílico y el extracto de la planta *H. Patens*. Las membranas nanoestructuradas dopadas y no dopadas con el extracto de *H. patens*, fueron fabricadas en las instalaciones del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), campus Tlaxcala. El PVP, también llamado comúnmente polividona o povidona es un polímero voluminoso, no tóxico, no iónico con grupos funcionales C = O, C-N y CH2 (ver Figura 11) que se usa ampliamente en la síntesis de nanopartículas (NPs), contiene un fuerte componente hidrofílico (el resto pirrolidona) y un grupo hidrofóbico (el grupo alquilo). El PVP es un gran estabilizador, el cual evita la agregación de NPs a través de las fuerzas de repulsión

que surgen de las cadenas de carbono hidrofóbicas que se extienden al disolviese en agua y otros solventes polares. El PVP puede servir como estabilizador de superficie, modificador de crecimiento, dispersante de nanopartículas, agente reductor (Koczkur *et. al*., 2015) y es utilizado para aumentar la viscosidad y para controlar la viscoelasticidad de una solución. (Hu *et. al*., 2014).

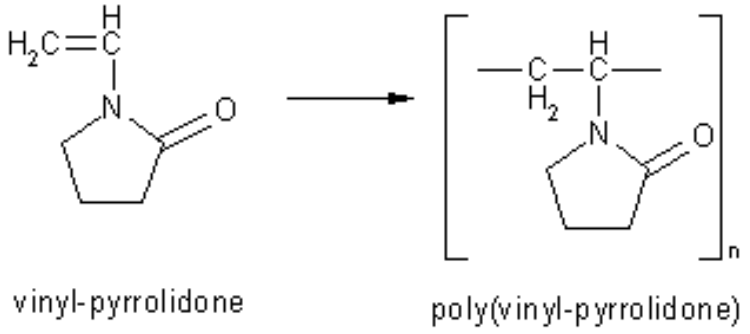


Figura 11. Estructura de Lewis de Polivinilpirrolidona (PVP) y su monomero precursor (vilipírrolidona). [Imagen]. Recuperado de https://es.wikipedia.org/wiki/Povidona_(pol%C3%ADmero)

Ambas membranas (dopadas y no dopadas) se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo de alta resolución (SEM) en el Centro de Investigación en Fisicoquímica de Materiales del ICUAP-BUAP. El equipo fue operado a un voltaje de aceleración de 3.0 kV. Los diámetros de las fibras se midieron a partir de las micrografías SEM obtenidas en ubicaciones aleatorias.

7.5 Manejo y uso de animales

Para los experimentos en animales se utilizaron un total de 16 ratas macho alopécicas (*Rattus norvegicus*) como se observa en la Figura 12, las cuales fueron divididas aleatoriamente en cuatro grupos experimentales: i) control (C), ii) grupo membrana (GM), iii) grupo extracto (GE) y, iv) grupo membrana dopada (MD). Los organismos utilizados en este proyecto fueron proporcionados por el bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Todos los procesos se ejecutaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio

con ciclos de luz/oscuridad 12/12, Temperatura de 18-26 °C, intensidad de luz 85 lx, espacio de 150 cm2 por cada 200 gr de peso, con agua y alimento *ad libitum*. Se realizo un monitoreo diario del peso y del estado de salud de los organismos y una vez que alcanzaron un peso aproximado de 120 gr fueron seleccionados para intervenirlos quirúrgicamente.

Figura 12. Fotografía de ratas (Ratus norvegicus) de la cepa alopécica utilizadas para evaluar la actividad cicatrizante de las membranas dopadas y no dopadas.

7.6 Procedimiento quirúrgico

La cirugía se realizó en condiciones de esterilidad en las instalaciones del bioterio de la BUAP. Las ratas fueron anestesiadas con ketamina-xilacina (0.20ml por cada100gr de peso) vía intraperitoneal, una vez que la rata quedo inconsciente, se colocó sobre un campo quirúrgico estéril con un colchón térmico por debajo el cual cumplía la función de mantener la temperatura corporal del animal y así evitar su muerte por hipotermia durante la cirugía. Por medio del tacto se ubicaron las dos últimas costillas flotantes del animal, justo por debajo de ellas se marcaron con tinta dos círculos de 1 cm de diámetro y 1 cm de separación entre cada herida en el dorso del animal. Posteriormente, se utilizó una tijera de Mayo curva para cortar los

segmentos de piel marcada de manera completa (retirando epidermis, dermis e hipodermis), obteniendo así dos heridas circulares de aproximadamente 1 cm de diámetro (Figura 13). Una vez que la piel fue retirada y el lecho de la herida expuesto, se aplicaron los tratamientos. Para el grupo GE, se agregó una gota de la infusión de *H. patens* aplicada con gotero (para evitar contacto). Para los grupos GM y MD, se colocaron las membranas de PVP sin dopar y dopadas tópicamente, sobre la superficie de la herida, presionando ligeramente con el dedo y se retiró el papel aluminio en el que se encontraba la membrana. Al grupo control no se le agrego nada. Una vez que se aplicaron los tratamientos, las ratas se colocaron individualmente en las cajas y se monitorearon durante 21 días.

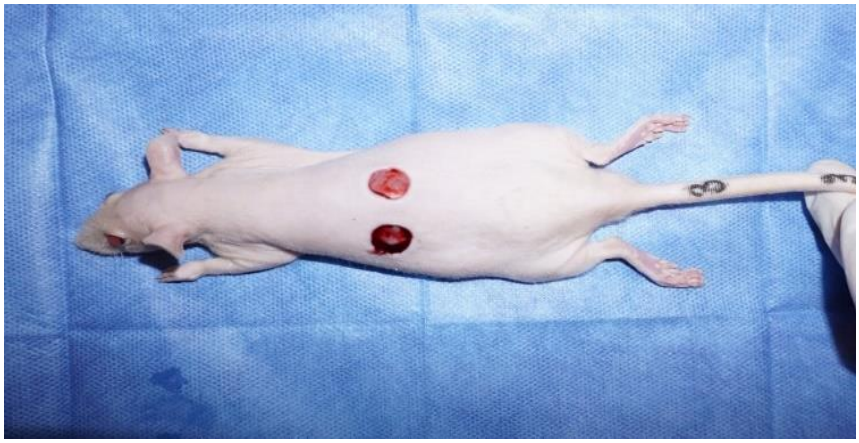


Figura 13. Rata anestesiada con Ketamina-Xilacina recostada sobre un campo estéril después de haber realizado ambas heridas en el dorso.

7.7 Toma de biopsias y análisis histológico

Se tomaron biopsias de las dos heridas en días clave: 3, 7, 14 y 21, para lo cual se marcó un margen cuadrado alrededor de la herida y con ayuda de unas tijeras rectas y bisturí se retiraron los segmentos de piel que contenían la herida. Para realizar un análisis histológico, las biopsias fueron fijadas en paraformaldehido al 4% durante dos semanas (ver Figura 14). Posteriormente, se deshidrataron colocándolas en alcoholes de diferentes grados: un cambio al 70% durante 24 hrs, dos cambios al 96% durante 24 hrs cada uno y dos cambios en alcohol absoluto durante 24 hrs cada uno, se aclararon en cloroformo durante 24 hrs, se sumergieron en parafina liquida al interior de un horno de inclusión con una temperatura de 55°C durante 1

hora y media y por último, fueron incluidas en parafina, para lo cual se vertió parafina liquida en un molde de silicón, después se colocó la biopsia con pinzas a manera que quedara completamente sumergida tratando de evitar la formación de burbujas y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante un día completo.

Figura 14. Biopsia al termino de las dos semanas fijada en paraformaldehido al 4%.

Los bloques de parafina se desmoldaron y fueron cortados con ayuda de un microtomo de rotación Leica manual, obteniendo cortes histológicos de 20 µm de grosor. Los cortes histológicos fueron teñidos por la técnica de Hematoxilina-Eosina, la cual consiste en dos componentes: la hematoxilina, un colorante acidófilo extraído del palo de campeche (especie nativa de Centroamérica) que tiñe los núcleos de azul oscuro y la eosina, un colorante basófilo empleado en soluciones alcohólicas, misma que tiñe el citoplasma de diferentes tonos de rosa (Figura 15). La combinación de estos dos colorantes tiñe el músculo en tonos rojizos a rosas fucsia, los glóbulos rojos en anaranjado o rojo y la fibrina en rosa intenso. Una vez que los tejidos fueron teñidos se les colocó resina de montaje y fueron observados en un microscopio de campo claro.

Figura 15. Tren de tinción de la técnica de hematoxilina-Eosina.

7.8 Identificación de grupos funcionales en los cortes histológicos

La identificación de grupos funcionales presentes en los cortes histológicos de cada grupo experimental fue realizado por espectroscopia FTIR empleando un espectrómetro acoplado a microscopio marca Bruker, modelo Hyperion 2000, en las instalaciones del CIBA (Figura 16). Se analizaron cortes histológicos de 40 µm de grosor de cada uno de los grupos experimentales, los cuales fueron previamente desparafinadas, sin tinción H&E y sin cubreobjetos bajo el microscopio acoplada al espectrofotómetro, empleando un objetivo de 15X (Figura 16). Utilizando el software "Opus" es posible observar en tiempo real la superficie del corte histológico y así, poder seleccionar la región de interés, es decir, puntos específicos donde se desea obtener los espectros de absorción de la muestra. Se seleccionaron 3 puntos a lo largo de la herida (histología), partiendo del centro a la periferia de la herida (en la región de la dermis). Para cada punto se realizaron 120 mediciones. Una vez que se obtuvieron los espectros de absorción, y con base a la literatura, se buscó la región relacionada con el colágeno y se compararon los cuatro grupos experimentales.

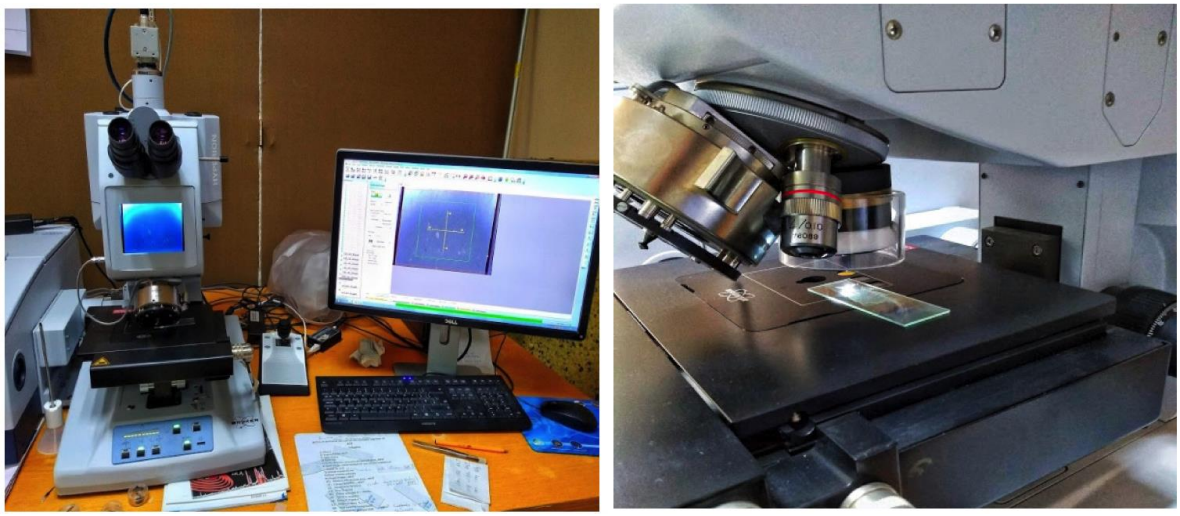


Figura 16. Equipo de microscopio acoplado a espectrómetro Bruker Hyperion 2000 (imagen izquierda). Histología observada bajo un objetivo de 15X (imagen derecha).

7.9 Cuantificación del cierre de la herida

En la sección “set scale” del software Image j se estableció una escala de 1 cm, con la herramienta “polygon selection” se dibujó un contorno alrededor de la herida y con el comando “ctrl+M” se obtuvieron las áreas de cada una de las fotografías de los grupos experimentales (ver Figura 17). Se realizó un promedio de las áreas de las heridas por día de cada tratamiento, posteriormente dichos promedios se cargaron en programa Origin versión 6.0 para graficarlos.

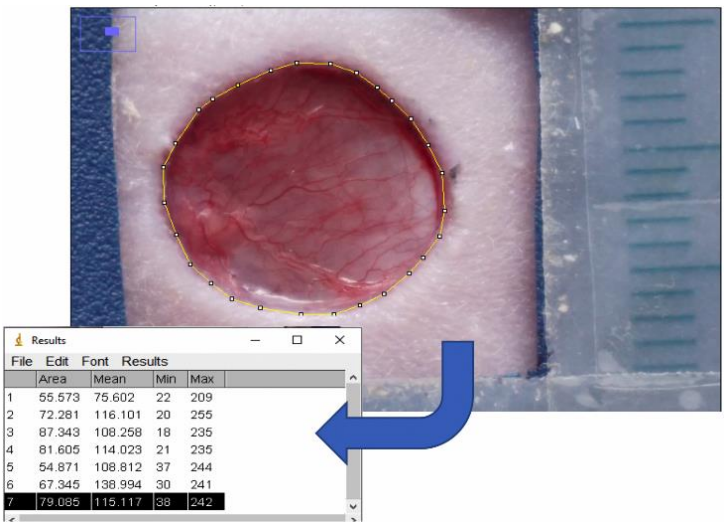


Figura 17. Obtención del área de la herida en el programa Image J.

8. Resultados

8.1 Espectros FTIR

Se obtuvieron los espectros de absorción tanto del extracto etanolico, la infusión, así como de la hoja recién cortada para comparar cuales eran los tipos de compuestos que arrastraba cada solvente, como se muestra en la Figura 18. En esta figura, se puede observar que casi no existen diferencias entre las bandas de absorción de la infusión, el extracto etanolico y la hoja fresca, a excepción de un pico entre los 2750 y los 3000 cm^{-1} que no se encuentra en la infusión, pero si en la hoja fresca y en el extracto etanolico. Debido a lo anterior, tanto el agua como el etanol son solventes útiles para obtener una gran cantidad de compuestos de las hojas de *H. patens*.

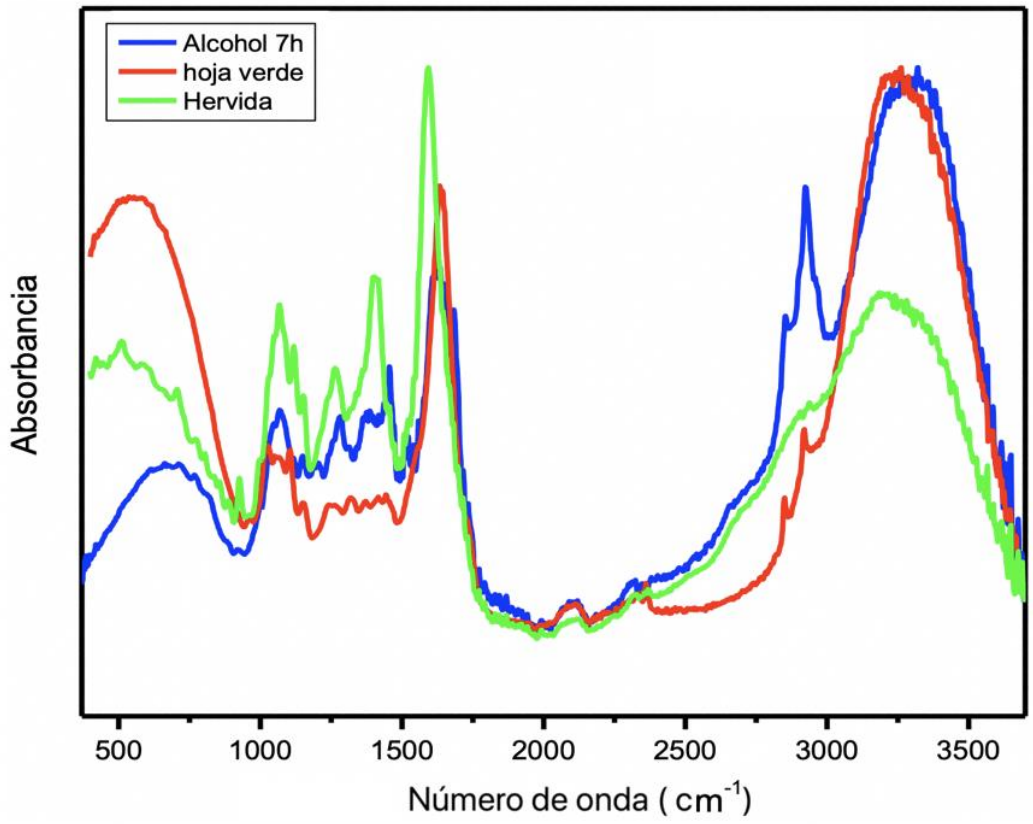


Figura 18. Espectros de absorción IR (normalizados) correspondientes al extracto etanolico (línea azul), de la hoja recién cortada (línea roja) y de la infusión realizada con las hojas secas (línea verde) de Hamelia patens.

En la Figura 18, los espectros asociados al extracto de *H. patens* se identificaron en bandas correspondientes a 1058, 1274, 1371, 1442, 1697 y entre 2847-2955 cm^{-1}, donde la señal cercana a 1050 cm^{-1} indica la presencia de azúcares y celulosa. Además, se puede observar la presencia de carbohidratos alrededor de 1000 cm^{-1} enlaces C-O; la señal alrededor de 1465 cm^{-1} corresponde a enlaces C-H, en 1565 cm^{-1} enlaces N-H y enlaces C-N y en 1650 cm^{-1} enlaces C=O asociadas con proteínas, en 2850 y 2920 cm^{-1} enlaces C-H.

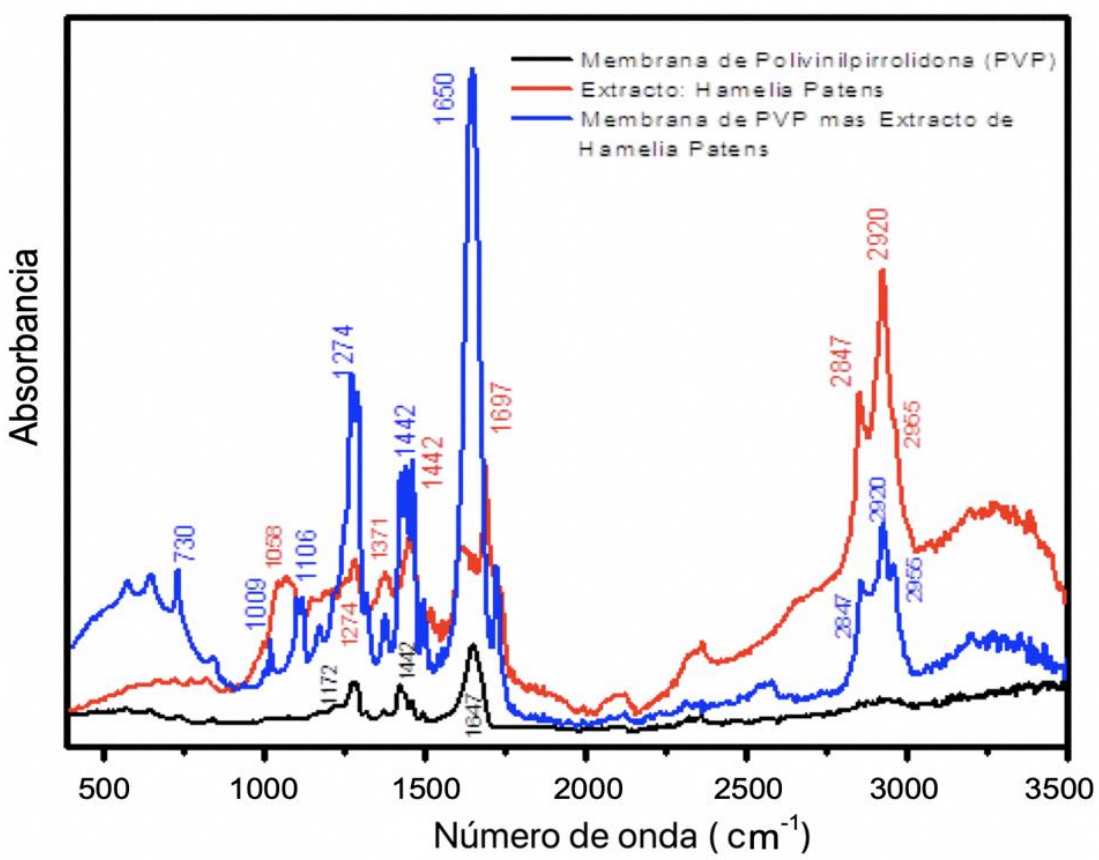


Figura 19. Espectros de absorción IR correspondientes al extracto etanolico de H.patens (línea roja), membrana de PVP (línea negra) y membrana de PVP dopada con el extracto (línea azul).

Para corroborar que las membranas de PVP fueron exitosamente dopadas con el extracto vegetal de *H. patens*, se obtuvieron los espectros de absorción de las membranas de PVP dopadas y no dopadas y, se compararon con los espectros de absorción del extracto de *H. patens*, como se muestra en la Figura 19. En esta figura, se puede observar que los espectros de las membranas de PVP dopadas conservaron la mayoría de los picos característicos del extracto etanoico de *H.*

patens y, mostraron diferencias significativas en comparación a los espectros de las membranas que solamente contenían el PVP, confirmando que el extracto de *H. patens* fue exitosamente adherido a las nanofibras electrohiladas. Las señales asociadas con la polivinilpilodirrona se encontraron alrededor de 1647, 1420-1500, 1274, 730 cm^{-1}; mientras que las señales asociadas a la membrana dopada se encontraron en 730, 1009, 1106, 1274, 1442, 1650, 2847,2920 y 2955 cm^{-1} de las cuales las señales que aparecen en la región entre 1100 y 1500 cm^{-1}, están relacionadas con la presencia de proteínas.

8.2 Espectros UV-Vis

La figura 20, muestra los espectros UV-Vis del extracto de *H. patens* para longitudes de onda de 300 nm a 700 nm. En esta figura se identificaron señales entre 350-500 nm las cuales se relacionan con la presencia de carotenoides, alrededor de 550 nm indican la presencia de antocianinas, mientras que las bandas de 610 y 660 nm se asocian a la clorofila b y clorofila a, respectivamente. En este caso si se observaron diferencias significativas entre los picos de absorción del extracto etanolico (línea azul) y la infusión (línea negra y roja), obteniendo un mayor número picos con el extracto etanolico y por consiguiente se considera un mejor solvente que el agua.

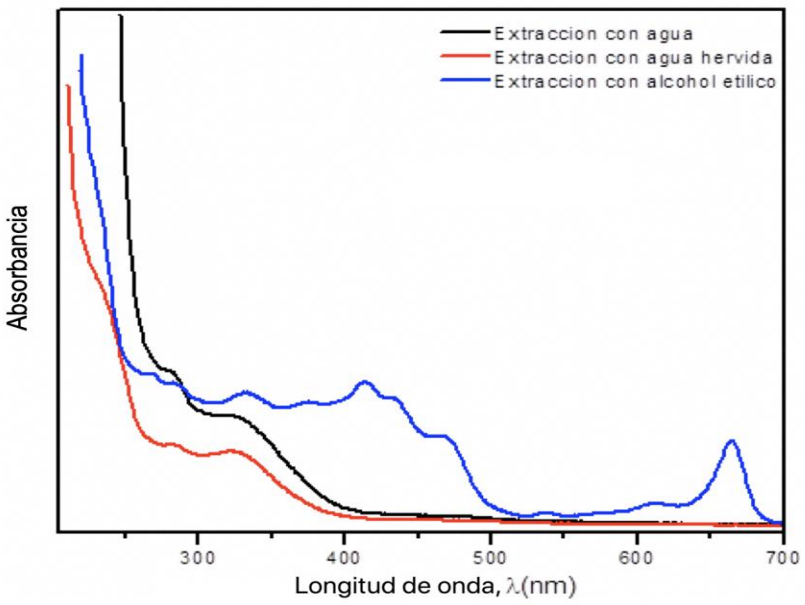


Figura 20. Espectros de absorción UV-Vis del extracto de H. patens extraídos por dos solventes diferentes (agua y etanol).

8.3 Caracterización de las membranas por SEM

La caracterización por SEM de las membranas de PVP no dopadas (Figura 21), mostró un arreglo aleatorio y altamente desordenado de las microfibras. Las microfibras depositadas no formaron cuentas, mostraron una superficie lisa y tuvieron un diámetro promedio de 80 nm. La disposición aleatoria produjo una gran cantidad de poros de distintos tamaños a lo largo de la membrana. Se cuantifico un área promedio de poro de ~5 µm con un rango de 1.463-15.043 µm.

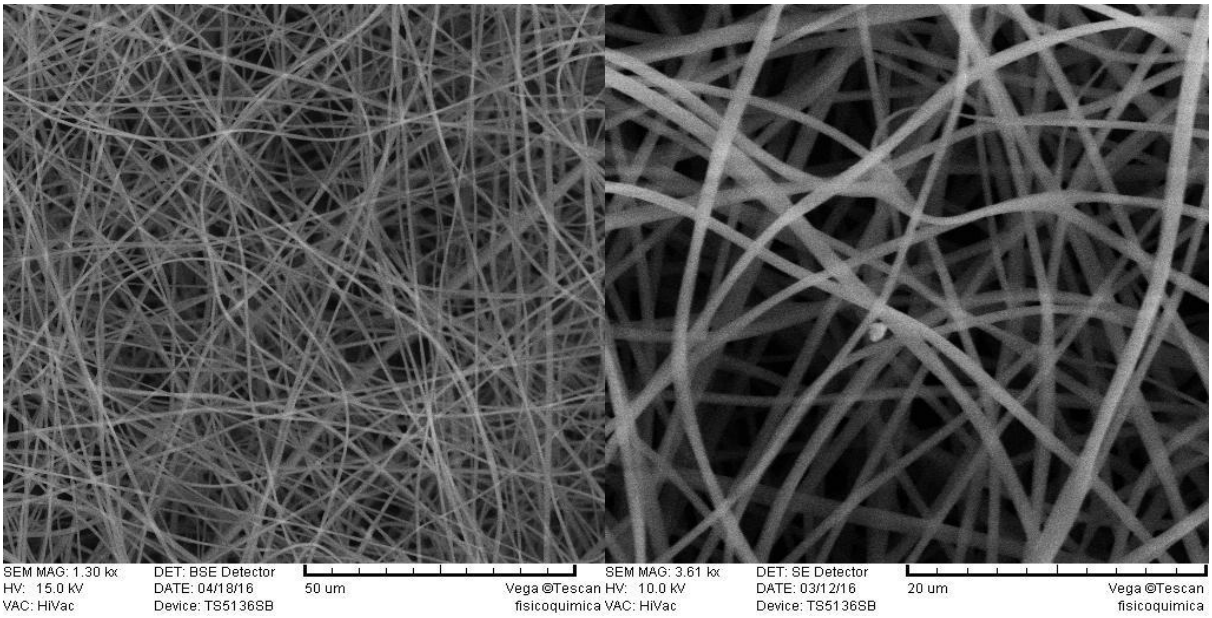


Figura 21. Micrografía SEM de las membranas nanoestructuradas de PVP no dopadas.

8.4 Monitoreo del proceso de cicatrización

El monitoreo del proceso de cicatrización de la herida para cada grupo experimental fue llevado a cabo mediante fotografías convencionales adquiridas en días claves, como se observa en la Figura 22. La contracción de la herida se expresa como una reducción del porcentaje del tamaño de la herida. Se registra a partir del día de la cirugía (100% del lecho de la herida expuesto) y continua hasta el día que se completa la epitelización y se evalúa el grado de cicatrización de la herida. En esta figura, se puede observar que los tres tratamientos (GE, GM y MD) consiguieron una contracción de la herida ligeramente más rápida comparada con el grupo control. El MD consiguió una contracción de la herida más rápida que la del resto

de los grupos experimentales, esta contracción es evidente en el día 3, en el cual el tamaño de la herida es considerablemente más pequeño que al del día 0 del mismo tratamiento y, que el resto de los grupos; para el día 14, la herida está totalmente contraída. Para el día 21 los cuatro grupos experimentales mostraban una cicatriz; sin embargo, el MD mostró una cicatriz mucho más pequeña y que se asemejaba más al tono de la piel circundante, en comparación con el grupo control y el resto de los tratamientos.

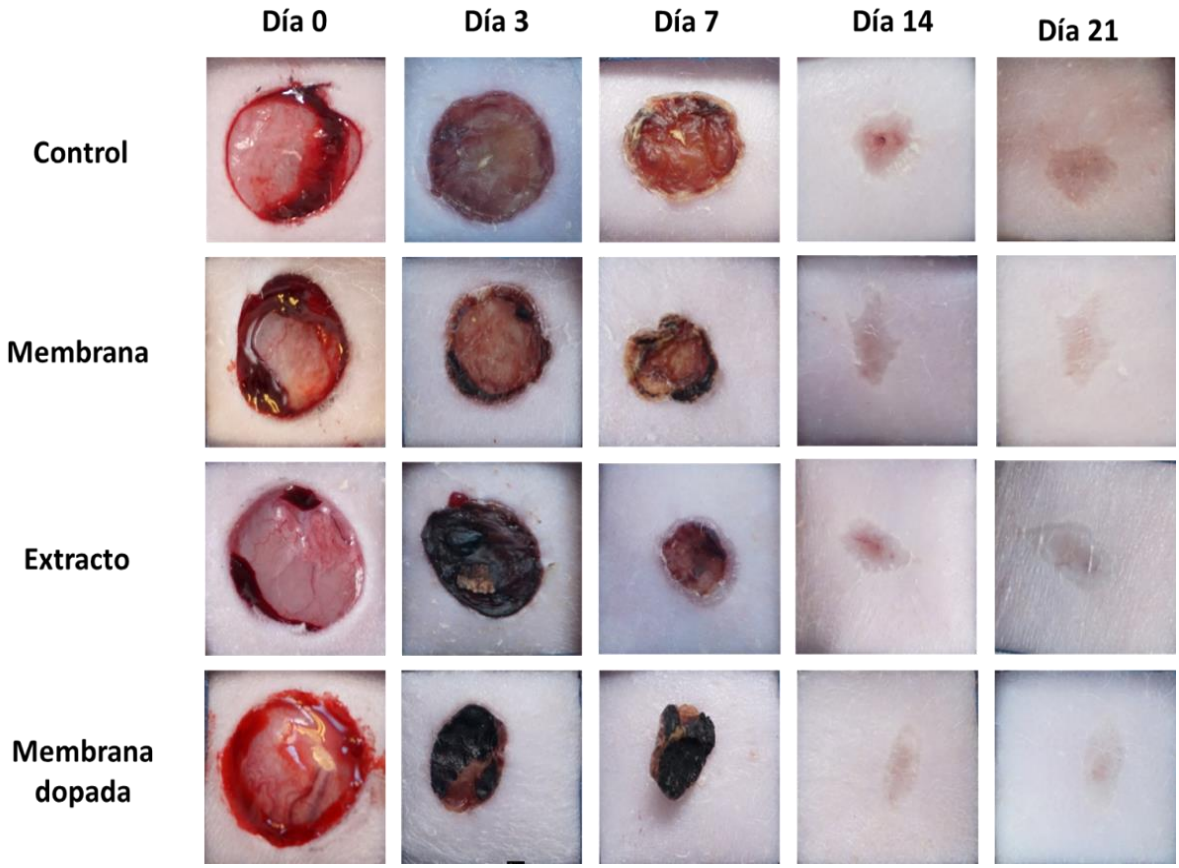


Figura 22. Seguimiento fotográfico del proceso de cicatrización por medio de fotografías convencionales.

Usando los promedios de las áreas de las heridas y con la ayuda del programa Origin, se realizó la gráfica en la cual se muestra el porcentaje de cierre de las heridas de cada grupo experimental en función al tiempo de cicatrización (Figura 23). Los cuatro grupos experimentales mostraron un comportamiento similar durante el transcurso del proceso de cicatrización; sin embargo, el tiempo de cierre total de la herida fue diferente en cada uno de los grupos. El grupo control muestra un cierre total de la herida al día 17, el GE y el GM al día 15 y el MD al día 11. Los

resultados muestran una diferencia de 6 días entre el cierre total del grupo control y el cierre total del MD, lo cual significa, que el cierre de la herida del MD fue un 35% más rápido en comparación con el grupo control.

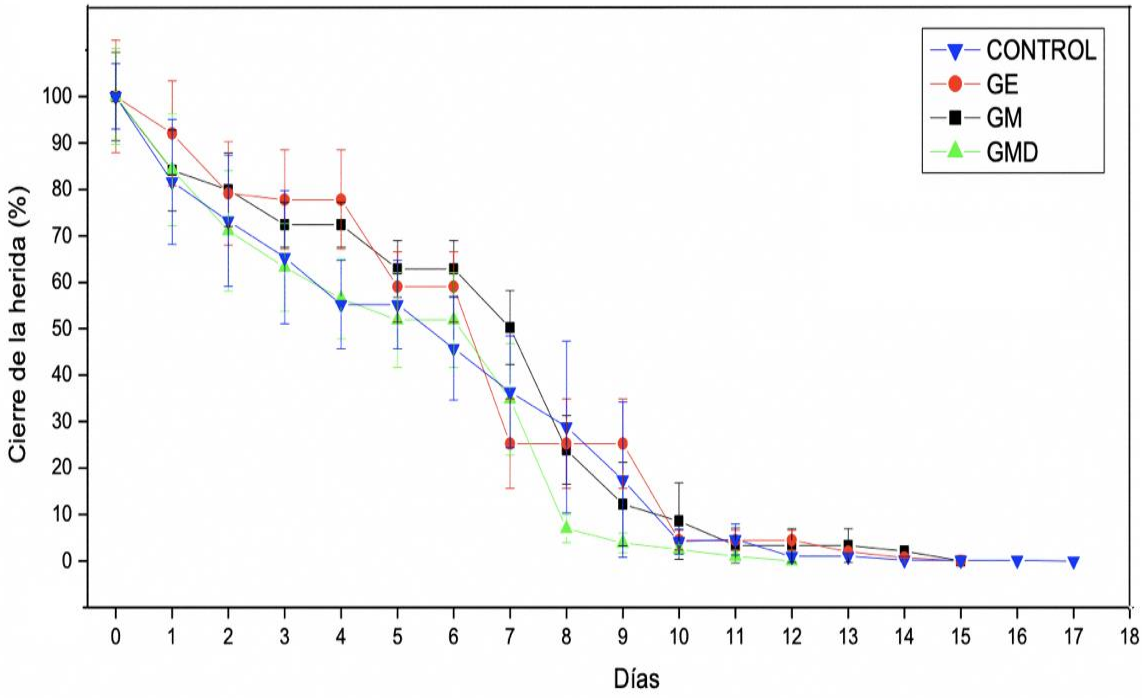


Figura 23. Porcentaje de contracción de la herida en el tiempo en cada uno de los grupos experimentales. El 100% representa la herida abierta (día de la cirugía) y 0% una herida cerrada.

8.5 Análisis histológico

De acuerdo con Thakur y colaboradores, las muestras de tejido regenerado se evalúan mediante los siguientes criterios histológicos: el grado de reepitelización o ulcus en la epidermis, la maduración y organización de las células escamosas epidérmicas, el grosor de la capa granular, el grado de formación de tejido en las heridas, y su comparación con la parte de tejido normal. Adicionalmente, angiogénesis, congestión, edema, epitelización, proliferación de fibroblastos, intensidad y extensión de la inflamación (infiltración celular), células mononucleares y / o polimorfonucleares, necrosis, ulceración, neovascularización y el patrón de deposición de colágeno en la dermis se evalúan cualitativamente para evidenciar la remodelación epidérmica o dérmica (Thakur *et. al*., 2011). La Figura 24, muestra los cortes histológicos teñidos con la técnica H&E para los cuatro grupos

experimentales, en algunos días claves del proceso de cicatrización (3, 7, 14 y 21). En el día 3, no se observaron diferencias significativas entre ninguna de las histologías de los grupos experimentales, todas presentaron una costra y un pequeño número de células en proliferación por debajo de esta, pero, el GM y MD mostraron una capa ligeramente más gruesa de células en proliferación que el GE y el grupo control.

En el día 7, todas las histologías aún conservaban la costra, las células de la región de la herida continúan proliferando activamente produciendo un engrosamiento del tejido. El crecimiento de la región proliferativa fue regular en todos los grupos excepto en el caso del GE, en la cual había regiones deprimidas y otras que mostraban una gran cantidad de proliferación celular. Es en este día que comenzó a visualizarse la diferenciación de la epidermis en todos los grupos, siendo el GM y el MD aquellos que presentan una epidermis más definida en comparación con el grupo control, y fue el GE aquel que presento una epidermis más difusa y poco definida.

Para el día 14, se observan mayores diferencias entre grupos, ninguna presenta ya la costra, el área de la herida se redujo más rápido en los tres tratamientos en comparación con el grupo control, en los tres tratamientos la dermis en proliferación casi ha igualado el grosor de la piel sana circundante, la epidermis está perfectamente delimitada y la hipodermis empieza a diferenciarse de la dermis. En el grupo control la proliferación celular continua, pero los límites entre la dermis e hipodermis aún no están bien delimitados. En el GM se han delimitado perfectamente las tres capas de la piel, la dermis y la epidermis han logrado un grosor similar al de la piel sana circundante y en los extremos de la región de la herida han comenzado a formarse algunos primordios de folículos pilosos o glándulas sebáceas. en el GE las tres capas de la piel también están delimitadas sin embargo el grosor tanto de la dermis y de la hipodermis es bastante irregular y no presenta signos de formación de estructuras anatómicas de la piel, pero ya presenta un ligero desprendimiento de células pertenecientes al estrato corneo de la epidermis. En el MD también se observó una diferenciación evidente de las tres

capas de la piel, un engrosamiento regular de la dermis y de la epidermis, así como un desprendimiento del estrato corneo de la piel, también se observó la formación de pequeños primordios de folículos pilosos y de glándulas sebáceas a ambos extremos de la región de la herida.

Para el día 21, todas las heridas has concluido el proceso de reepitelizacion y en los tres tratamientos experimentales el tamaño de la herida es mucho más pequeño en comparación con el grupo control. El grupo control exhibe una estructura anatómica similar a la de una cicatriz queloide, a pesar de que la dermis y la epidermis han logrado diferenciarse perfectamente, la delimitación entre la dermis y la hipodermis aún sigue siendo bastante difusa, se observó el desprendimiento del estrato corneo, la dermis asemejo el grosor de la dermis de la piel sana, sin embargo, no presento estructuras dérmicas propias de la piel como folículos pilosos ni glándulas sebáceas, en la región de la dermis e hipodermis no presenta bandas musculares, ni tejido adiposo, ni formación de nuevos vasos sanguíneos. En el GM se diferenciaron perfectamente las tres capas de la piel, la epidermis logro un grosor similar al del resto de la piel, pero la dermis e hipodermis son más delgadas en comparación con la piel sana circundante, se observó una estructura similar a la de la piel sana, a ambos extremos de la herida, con presencia de folículos y glándulas sebáceas; sin embargo, la región central aún se encontraba en proceso de diferenciación. En el GE también se diferenciaron las tres capas de la piel, el grosor de la dermis y epidermis es idéntico al del tejido circundante, sin embargo la hipodermis consiguió ser más delgada que la piel sana, la región central de la dermis aún está en proceso de diferenciación pero las regiones laterales de la herida comienzan a tener una estructura similar a la piel sana, sin embargo no hay una presencia tan abundante de primordios de folículos pilosos ni glándulas sebáceas como en el caso del GM, la hipodermis no presenta bandas musculares, ni vasos sanguíneos ni tejido adiposos. Por último, en el MD es el grupo en el que se observaron mayores diferencias en comparación con el grupo control y el resto de los tratamientos. El tamaño de la herida es mucho menor que en el resto de los grupos experimentales, la diferenciación de las tres capas de la piel se observa claramente, el grosor de la piel de la herida (tanto de la epidermis, dermis e

hipodermis) se asemeja mucho al de la piel sana circundante, los extremos de la herida tienen la estructura de piel sana ya que contienen tanto folículos pilosos y glándulas sebáceas ya maduros como una gran cantidad de primordios en la región central de la herida, de igual forma ya se observa el desprendimiento del estrato corneo de la epidermis, en la zona de la hipodermis se pueden visualizar delgadas fibras musculares en la región central de la herida pero conforme se dirige la mirada a los extremos estas bandas van engrosando hasta ser similares a las bandas musculares sanas, también se observa una cantidad considerable de tejido adiposo y un gran número de vasos sanguíneos justo por debajo de la región central de la herida.

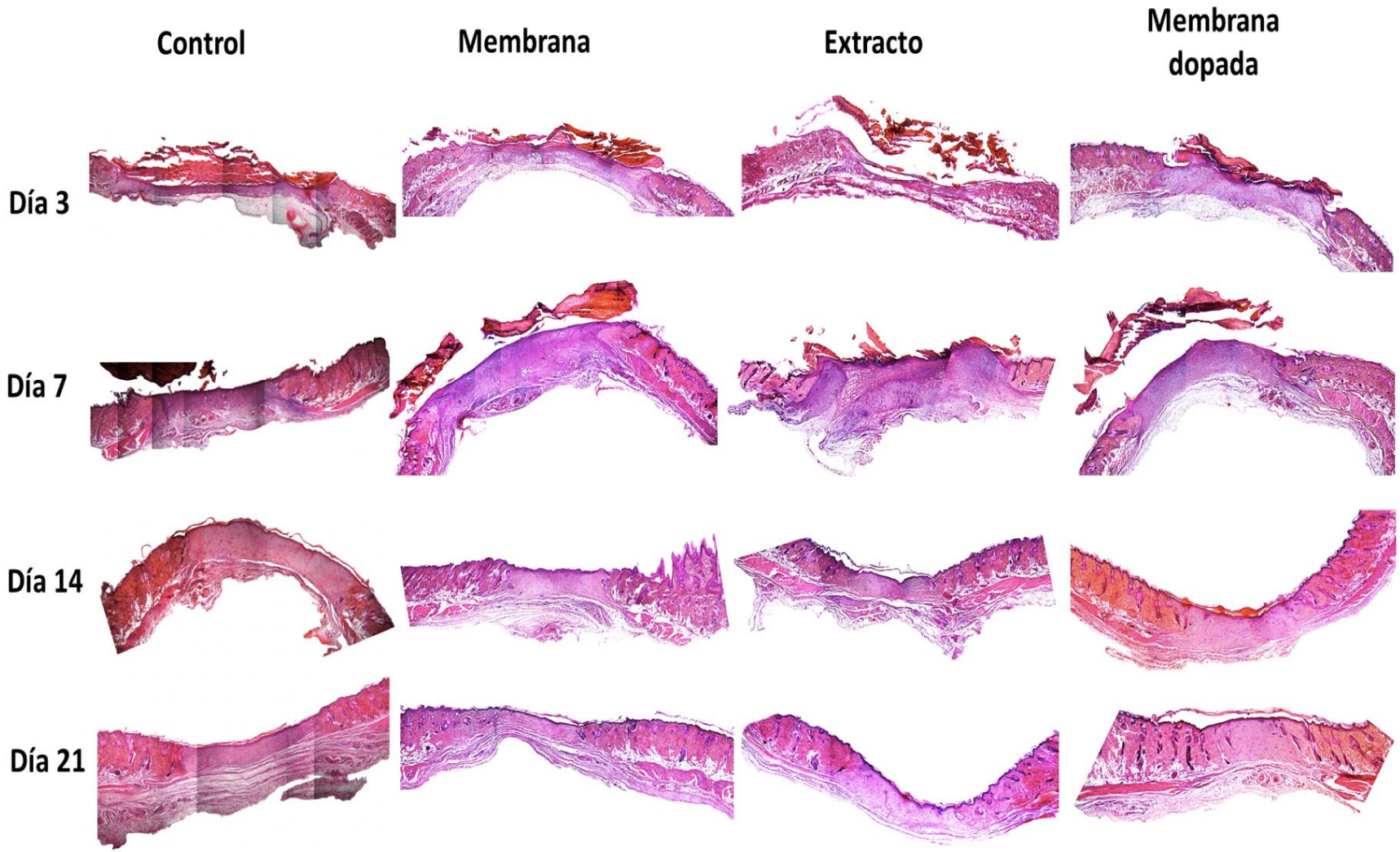
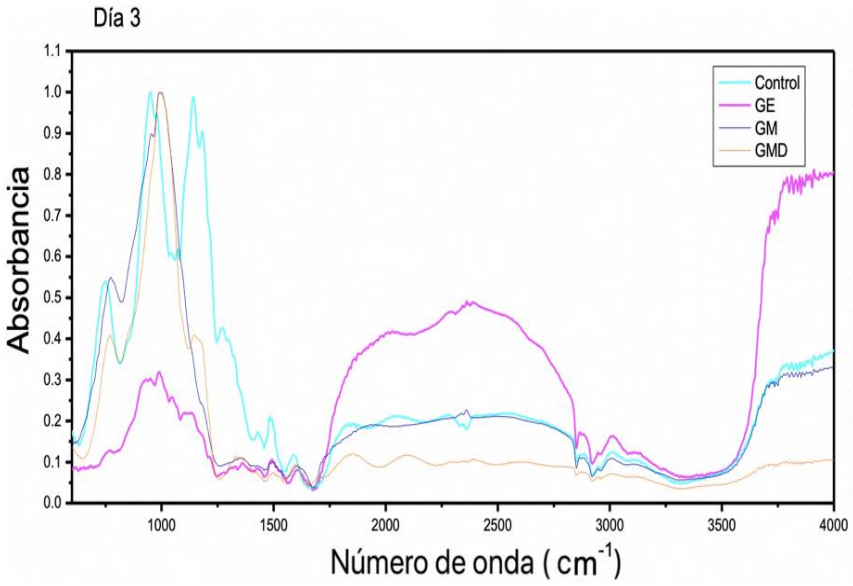


Figura 24. Matiz de fotografías de las histologías de los días claves teñidas con hematoxilina-Eosina

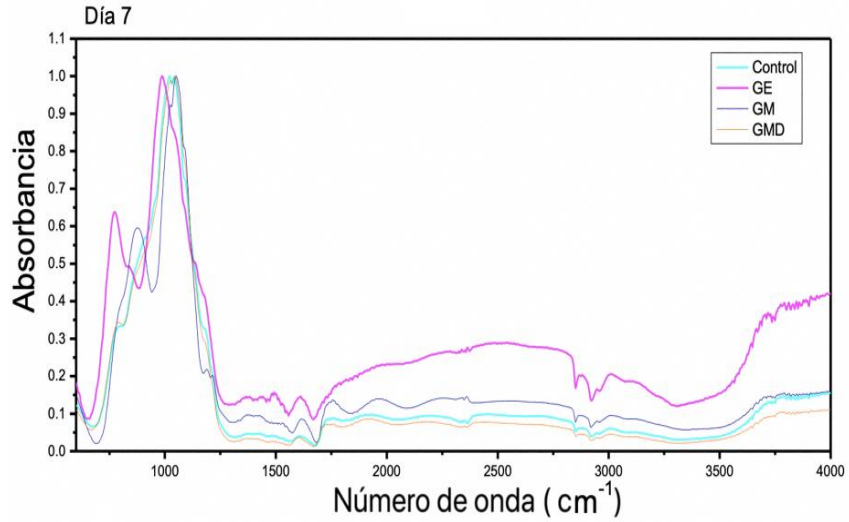
8.6 Bandas de absorción identificadas en los cortes histológicos

Como se mencionó en la sección 7.8, la identificación de bandas de absorción presentes en los cortes histológicos de cada grupo experimental fue realizado por espectroscopia FTIR. Para el día 3 (Figura 25), se identificaron picos de absorción similares entre los cuatro grupos experimentales: 769 (GE y GMD) y 772 (GM); 950 (control y GE) y 956 (GM); 990 (GE), 991(GM) Y 998 GMD); 1042(control) Y 1046 (GE); 1323 (control) Y 1328 (GE); 1357 (GM) y 1351 (GMD); 1429 (control) y 1427 (GE); 1484 (control), 1493 (GE), 1494 (GM) y 1497 (GMD); 1590 (control), 1605 (GE), 1606 (GM) y 1599 (GMD). Para el día 7 (Figura 26), se tuvieron picos de absorción similares en: 775 (GE) y 768 (GMD); 988(GE) y 987 (GMD); 1021 (control) y 1025 (GM); 1043 (control) y 1051(GM); 1087 (GM) y 1093 (GMD); 1177 (control) y 1188 (GM); 1494 (GE) y 1483 (GMD); 1612 (GE), 1619 (GM) y 1598 (GMD). Para el día 14 (Figura 27), los picos de absorción similares fueron en: 788 (control), 776(GE) y 777 (GMD); 960(GE) y 952 (GM); 988 (GE) y 979 (GM); 1040(control), 1043 (GE) y 1036 (GMD); 1096 (GE) y 1089 (GMD); 1141 (GM) y 1148 (GMD); 1181 (control) y 1171 (GMD); 1493 (GE) y 1502 (GM); 1606 (control), 1599 (GE y GMD) y 1597 (GM). Finalmente, para el día 21 (Figura 28) las bandas similares fueron en: 788 (control), 776 (GE) y 777 (GMD); 960 (GE) y 952 (GM); 988 (GE) y 979 (GM); 1040 (control), 1043 (GE) y 1036 (GMD); 1141 (GM) y 1148 (GMD); 1181 (control) y 1171 (GMD); 1096 (GE) y 1089 (GMD); 1606 (control), 1599 (GE y GMD) y 1597 (GM).



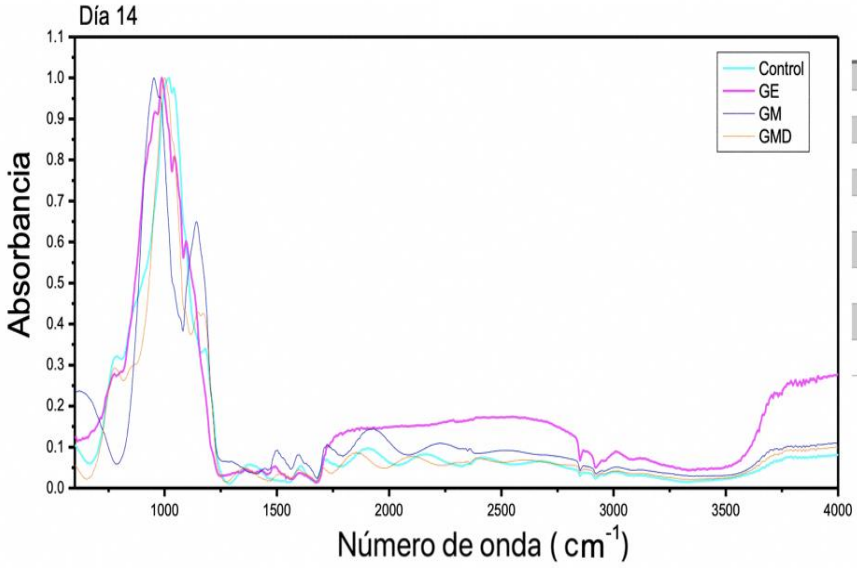
Control	GE	GM	GMD
750	769	772	769
950	930	956	998
978	950	991	1145
1042	990	1357	1351
1071	1046	1494	1497
1142	1111	1606	1599
1182	1215		
1273	1307		
1296	1328		
1323	1359		
1429	1427		
1484	1493		
1590	1605		

Figura 25. Espectros de absorción (normalizados) identificadas en las histologías de piel de rata de los diferentes grupos experimentales al día 3.



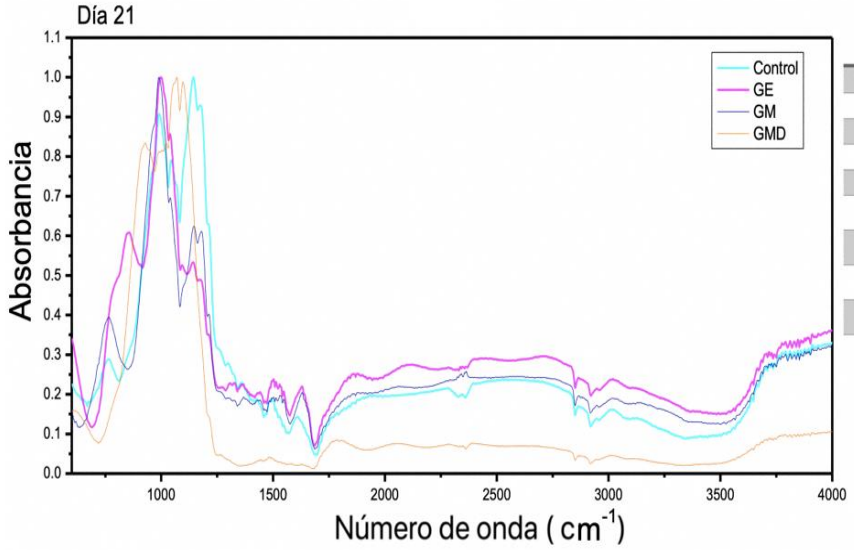
Control	GE	GM	GMD
803	775	876	768
1021	838	1025	987
1043	988	1051	1093
1177	1494	1087	1483
	1612	1188	1598
		1214	
		1381	
		1619	

Figura 26. Espectros de absorción (normalizados) identificadas en las histologías de piel de rata de los diferentes grupos experimentales al día 7.



Control	GE	GM	GMD
788	776	952	777
1018	960	979	866
1040	988	1141	1002
1181	1043	1285	1036
1606	1096	1502	1089
	1493	1597	1148
	1599		1171
			1357
			1522
			1599

Figura 27. Espectros de absorción (normalizados) identificadas en las histologías de piel de rata de los diferentes grupos experimentales al día 14.



Control	GE	GM	GMD
788	776	952	777
1018	960	979	866
1040	988	1141	1002
1181	1043	1285	1036
1606	1096	1502	1089
	1493	1597	1148
	1599		1171
			1357
			1522
			1599

Figura 28. Espectros de absorción (normalizados) identificadas en las histologías de piel de rata de los diferentes grupos experimentales al día 21.

9. Discusión de resultados

Las plantas se han utilizado para inducir la cicatrización de heridas y la regeneración de tejidos durante siglos (Khan AR *et. al*., 2018). Los extractos de plantas contienen compuestos bioactivos que se han utilizado ampliamente en el manejo de heridas por su citotoxicidad limitada, así como por su actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y antioxidante. Un área relativamente nueva es el uso medicinal de algunos productos vegetales en la ingeniería de tejidos. El electrohilado proporciona una amplia gama de opciones para incorporar productos vegetales (aceites esenciales, compuestos aislados únicos, extractos crudos) en algún polímero adecuado y convertir al material vegetal en una estructura estable que mejore el perfil de liberación para fabricar nanofibras con aplicación biomédica (Khan AR *et. al*., 2018).

Muchos de los estudios indican que los extractos de plantas se pueden cargar con éxito en una variedad de polímeros sintéticos y naturales sin afectar negativamente las características morfológicas de las fibras resultantes (Khan AR *et. al*., 2018). Entre los extractos de plantas crudas que se han electrohilado con éxito se encuentran: *Centella asiática*, baicaleína, té verde, *Garcinia mangostana*, *Tecomella undulata*, manzanilla, *Tridax procumbents* y eucalipto (Zhang *et. al*., 2017). El electrohilado es un método moderno que ha sido especialmente investigado para la fabricación de apósitos para heridas que favorezcan la regeneración de la piel (Coelho *et. al*., 2018). La aplicación de biomateriales en la ingeniería de tejidos es predominantemente en la formación de andamios que actúan, de forma temporal, en la orientación física del tejido en formación (Xian Law *et. al*., 2017). Las características arquitectónicas son similares a la estructura tridimensional de la ECM y, por lo tanto, proporcionan soporte mecánico a las células e influyen en el movimiento celular. En particular, la morfología de las nanofibras imita la estructura del colágeno fibrilar y la elastina que comprende la ECM.

Las microfibras permiten a las células adherirse (a través de los receptores transmembrana o por vías de señalización intracelular) y utilizarlas como andamios similares a las vías del tren que permite una proliferación y migración celular más rápida al sitio de la herida, una vez que las células han logrado proliferar sobre las microfibras es más fácil llenar los espacios restantes produciendo, en menor tiempo, el tejido de granulación. Los andamios no solo proporcionan apoyo físico a las células, sino que el micropatrón también da importantes señales bioquímicas y biomecánicas que guían los procesos celulares fundamentales (por ejemplo, la adhesión, migración, proliferación y diferenciación) que conducen a regeneración de tejidos en lugar de fibrosis (Xian Law *et. al*., 2017). La estructura no tejida tiene características únicas, que incluyen poros interconectados, aleatorios, altamente desordenados y una relación superficie-volumen muy grande, (por ejemplo, las nanofibras con diámetros de 100 nm presentan una superficie de $100m^2$ por gramo de material) (Caracciolo *et. al*., 2011) que facilitan el intercambio de oxígeno, agua, nutrientes, desechos y citocinas en los sitios de las heridas.

Los poros pueden variar tanto en el tamaño como la forma, además tienen un gran volumen vacío interconectado en el rango de 50% a 90% (Burger *et. al*., 2006). Kim y colaboradores evaluaron las propiedades físicas de las fibras encontrando una porosidad de 25% a 80% y un área de poro en el rango de 0.167 a 2.737 µm, dicho rango es menor que el rango que se observó en las membranas de PVP no dopadas el cual fue de 1.463-15.043 µm con un área promedio 5.086 µm. Uno de los objetivos de las nanofibras electrohiladas es el que puedan coincidir estrechamente con las propiedades mecánicas de la piel humana, los andamios deben ser capaces de soportar queratinocitos y fibroblastos y dar resistencia mecánica (rigidez y elasticidad), mediante una cuidadosa selección de los compuestos de las nanofibras.

Las propiedades morfológicas de las nanofibras dependen tanto de las condiciones ambientales como del voltaje suministrado durante el proceso de electrohilado. Karakas reportó que se pueden producir más nanofibras con diámetros más pequeños cuando se aumenta la temperatura. También descubrió que, el bajar la

humedad tiene el potencial de secar más rápido la solución de polímero, por el contrario, al aumentar la humedad la superficie de las nanofibras parece contener una mayor cantidad de poros pequeños (Peters *et. al*., 2019). Según Ramakrishna y colaboradores, un voltaje de más de 6 kV puede causar que la solución caiga en la punta de la aguja para distorsionarse en la forma de un cono de Taylor. Si el voltaje aplicado es mayor, el aumento de las cargas hará que el chorro se acelere necesitando un mayor volumen de la solución, provocando la formación de nanofibras con cuentas. Matabola y Moutloali evaluaron la influencia del voltaje aplicado en la morfología y el diámetro de las nanofibras de poli-fluoruro de vinilideno (PVDF) y mostraron que el diámetro aumentó gradualmente a voltajes más bajos, mientras que, a mayor voltaje, se observó la situación inversa por la cual los diámetros disminuyeron y las cuentas reaparecieron.

En otro estudio, se observó que el aumento de voltaje favoreció la formación de múltiples chorros, sin embargo, la extracción de un mayor volumen de solución de la punta de la aguja puede provocar que el chorro tome más tiempo para secar, si el solvente en la fibra depositada no tiene suficiente tiempo para evaporarse, el solvente residual puede causar la fusión entre las fibras, formando redes no deseadas. Variar la distancia entre la punta del dispensador y el colector también tendrá una influencia directa sobre el tiempo de vuelo y la intensidad del campo eléctrico. Gracias a las fotografías en SEM se pudo comprobar que las nanofibras de las membranas de PVP no dopadas no formaron cuentas y el diámetro de las nanofibras fue uniforme, por tanto, el voltaje de 15 kV y la distancia de 15 cm entre el dispensador y la placa colectora fue la óptima para que el polímero de PVP al 10% formara el cono de Tylor, lograra hacer que el chorro llegara hasta la placa y que el solvente fuese perfectamente evaporado obteniendo membranas con las características deseadas.

Todas las heridas corren el riesgo de ser contaminadas con bacterias, siendo *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *estreptococos hemolíticos* β (Mir *et. al*., 2018) las principales cepas bacterianas que se encuentran creciendo en el sitio de la herida, por lo que es importante tener en cuenta la relación que tendrán

los poros de las nanofibras y las bacterias. Los estudios han demostrado que al hacer que los poros y las nanofibras tengan cierto diámetro, pueden combatir a la proliferación bacteriana. Esto ayudará drásticamente en el proceso de recuperación porque las fibras no solo estimularán la regeneración, sino que también evitarán infecciones (Peters *et. al*., 2019). El tamaño de las bacterias oscila entre los 0.4 y 2 µm, pudiendo llegar en algunos tipos a 10 µm, en el caso de las bacterias de interés médico, tienen un tamaño entre 0.4 y 2 µm y el área promedio de poro de las membranas de PVP no dopadas es de 5.086 µm con un rango de 1.463-15.043 µm, por lo tanto, el tamaño de los poros de la membrana de PVP pueden limitar el ingreso de algunas bacterias de mayor tamaño al sitio de la herida, sin embargo, aún podrán ingresar las bacterias de tamaño menor a 1.4 µm. Si se logra crear un tamaño de poro específico y la proporción necesaria para que las fibras limiten el ingreso de las bacterias, entonces el electrohilado se volverá aún más eficiente en la cicatrización de heridas (Peters *et. al*., 2019).

Además, de las propiedades morfológicas de las membranas también es necesario adicionar sustancias antimicrobianas y antioxidantes que puedan detener el crecimiento de biofilm en el sitio de la herida y disminuir el estrés oxidativo que se produce al combatir la infección. Diversas clases de fitoquímicos antimicrobianos son sintetizados por las plantas, como los fenóles, terpenos y alcaloides. Los mecanismos de acción de esos compuestos contra los patógenos son varios e incluyen la interrupción de la membrana y pared celular, privación de sustrato, e inhibición enzimática (Zhang *et. al*., 2017). El estrés oxidativo, causado por radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS), es otro elemento que juega un papel importante en la cicatrización de heridas pudiendo causar daños al tejido en crecimiento en el sitio de reparación (Thakur *et. al*., 2011). El oxígeno es crítico para el metabolismo celular, producción de energía, y para todas las fases de curación de heridas, siendo esencial que los vasos sanguíneos rodeen e ingresen activamente en el sitio de la lesión. Cuando hay escasez de vasos sanguíneos, la herida no recibe los nutrientes ni el oxígeno que necesita para sanar, lo que detiene su proceso de recuperación.

Las heridas crónicas a menudo se encuentran estancadas en esta etapa, en donde tardan varios meses en sanar finalmente (Peters *et. al*., 2019). Las alteraciones vasculares, provocadas por la lesión, inducen el agotamiento de oxígeno que conduce a una hipoxia temporal. Es ya bien conocido que la hipoxia temporal estimula la cicatrización mediante la inducción de los macrófagos, fibroblastos y queratinocitos para producir citocinas y factores de crecimiento cruciales para la proliferación y migración celular, la quimiotaxis, y la angiogénesis. Pero, si la oxigenación no es restaurada, la hipoxia pasa de ser temporal a ser crónica disminuyendo sus efectos beneficiosos. La hipoxia crónica aumenta las concentraciones de ROS, dañando a las membranas celulares, el ADN, proteínas y lípidos lo que puede inducir una transformación neoplásica, la cual impide aún más el proceso de curación.

Además de ROS, el superóxido producido por los leucocitos y neutrófilos utilizado para la destrucción oxidativa de patógenos puede influir negativamente en la generación del tejido cicatricial. La inflamación es una parte importante de la cicatrización de la herida. Sin embargo, la eliminación inadecuada de bacterias del sitio de la herida conduce a la elevación prolongada de citoquinas proinflamatorias y metaloproteinasas de la matriz. La producción desequilibrada de proteasas degrada los factores de crecimiento permitiendo que las bacterias formen una biopelícula. En caso de quemadura, la microcirculación generalmente se ve comprometida, resultando en una restricción o cese del flujo sanguíneo, que a su vez causa isquemia y posteriormente una reperfusión, y por lo tanto esto genera mayor estrés oxidativo. (Thakur *et. al*., 2011).

Otro factor, que parece no tener gran relevancia aparentemente, es el dolor que produce la lesión. El dolor de una herida puede potenciar una respuesta del sistema nervioso simpático y aumentar la liberación de catecolaminas. Esto conduce a la constricción arteriolar periférica y disminuye el suministro de oxígeno al sitio de la herida, que a su vez tiende a agravar los niveles de estrés oxidativo y aumenta la susceptibilidad de sufrir infecciones (Mir *et. al*., 2018). Por lo tanto, cualquier medicamento que inhiba la peroxidación lipídica mediante el control de ROS, puede

aumentar la viabilidad de fibrillas de colágeno, reactivar la circulación, prevenir el daño celular, y promover la síntesis de ADN (Thakur *et. al*., 2011). Por lo tanto, si un extracto vegetal tiene potencial antioxidante y una actividad antimicrobiana adicional, podría ser un buen agente terapéutico para acelerar la cicatrización de heridas (Thakur *et. al*., 2011).

De acuerdo con lo reportado por Ajaykumar y colaboradores los extractos de éter de petróleo, cloroformo y metanol de *H. patens* son capaces de eliminar el peróxido de hidrogeno y el óxido nítrico de manera dosis-dependiente. Estos tres extractos eliminaron el radical DPPH con una CI50 de 250.58, 46.03 y 83.44 mg mLG, respectivamente y se encontró que tienen actividad quelante de iones ferrosos con una IC50 de 294.12, 126.90 y 112.36 µg mLG1, respectivamente. Siendo el extracto de cloroformo el mejor eliminador de H_2O_2, de radicales libres de óxido nítrico y del radical DPPH. Los extractos de *H. patens* son una potencial fuente de antioxidantes que podría usarse en la elaboración de apósitos, producción de medicamentos y otros materiales de curación.

Adicionalmente, Alonso-Castro y colaboradores han evidenciado los efectos antinociceptivos del extracto metanolico de hojas de *H. patens* mediante la evaluación de la nocicepción inducida térmicamente (placa caliente) y por pruebas nociceptivas inducidas por productos químicos (ácido acético y formalina). En los modelos de nocicepción inducidos por productos químicos, *H. patens* (100 y 200 mg/kg) mostró efectos antinociceptivos con una actividad similar a 100 mg/kg de naproxeno. Y en la prueba de placa caliente, el extracto a 100 mg/kg (17%) y 200 mg/kg (25%) mostró efectos antinociceptivos moderados. Por lo tanto, la planta de *H. patens* podría ser una buena fuente de agentes antinociceptivos debido a su alta actividad y baja toxicidad.

De acuerdo con la literatura, las nanofibras sin dopar tienen un rango de diámetro de 64–301 nm, en esta investigación observamos mediante SEM que las microfibras que componen las membranas de PVP no dopadas tienen un promedio de diámetro de 82.83 nm. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el diámetro de las

nanofibras depende del proceso de producción, las condiciones ambientales y de los elementos que la conforman.

Otras fibras dopadas con extractos vegetales tuvieron actividad antimicrobiana contra sepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumonia* y actividad antifúngica contra *Candida albicans*, mientras que, de acuerdo al trabajo de Wong y colaboradores y el trabajo de Okoye y Ezeogo*, H. patens* tiene actividad antimicrobiana contra las sepas de *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhi, Aspergillus niger* y *Salmonella paratyphi*, además de tener propiedades antifúngicas contra *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum y Rhizoctonia solani* de acuerdo a las investigaciones de Abubacker y colaboradores. Los días que tardaron las heridas en cerrarse por completo fueron, 21 días para la baicaleina, 16 días para el té verde, 11 días para a *G. mangostana* y 14 días para la manzanilla, siendo *G. mangostana* la membrana con extracto vegetal que logro cerrar la herida en el mismo tiempo que las membranas dopadas con el extracto de *H. patens*.

También se reportó que tanto *Centella asiática* como la manzanilla promovieron la proliferación de fibroblastos*, Centella asiática* produjo la formación de capilares sanguíneos y protegió el sitio lesionado contra bacterias colonizadoras*, G. mangostana* mostro un reemplazo del tejido de granulación por folículos capilares, el extracto de semilla de uva produjo una proliferación saludable de las células en las microfibras, *Calendula officinalis* disminuyo la inflamación *y* la baicaleina, *Garcinia mangostana, Calendula officinalis* y manzanilla mostraron una mayor reepitelización de la piel, mayor síntesis de colágeno y aumento de la formación de tejido de granulación.

Las membranas dopadas con extractos de *H. patens* también promovieron la proliferación de fibroblastos en el sitio de la herida a partir del día 7, el tejido de granulación de la dermis se diferenció en folículos pilosos y glándulas sebáceas maduras en los extremos de la herida y una gran cantidad de primordios en la región central, el tejido de granulación de la hipodermis se diferenció en tejido adiposo y

en una gran cantidad de vasos sanguíneos, que, probablemente promovieron un óptimo flujo de oxígeno al sitio de la herida evitando la sobreproducción de citocinas proinflamatorias y disminuyendo las probabilidades de que la herida sufriera daños por estrés oxidativo, de igual forma las heridas tratadas con las membranas dopadas no mostraron signos de haber sido colonizada por bacterias, todos estos factores en conjunto produjeron que la piel del sitio de la herida tuviera una apariencia similar a la de la piel sana al termino de los 21 días (Figura 22).

A pesar de que ya existen algunos pocos trabajos que utilizan extractos vegetales para producir matrices de microfibras, aun no se conoce por completo cuales son los compuestos químicos que conforman a los extractos ni cuáles son sus efectos en los eventos del proceso de cicatrización. De acuerdo con Susana *et. al.* y Ríos y Aguilar-Guadarrama, los componentes que se encuentran en los extractos metanolicos de *H. patens* son principalmente: alcaloides oxindoles, esteroles, glicósidos, flavonoides, taninos, sesterpenos, triterpenos proteínas y carbohidratos.

De acuerdo a la literatura, se han identificado aproximadamente 25 moléculas diferentes en los extractos, tanto crudos, etanolicos y metanolicos de *H patens*, los cuales son: (6E,10E,14E,18E)-2,6,10,14,18,23-hexamethyl-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaene, 5,7,2',5′-tetrahidroxiflanvanona-7-rutinósido 24-metilenecicloartan-3ß-ol, 2E-3,7,11,15,19-pentametil-2-eicosaen-1-o, ácido rotúndico, aricina, b-sitosterol, Canferol-3-O-α-L-rhamnopiranosil-(1→6)-β-D-galactopiranosídeo, catequina, epicatenina, especiofilina, Estigmast-4-en-3,6-diona, estigmasterol, hamelina, isomaruquina, isopalmirina, isopteropodina, kaempferol-3-O-rutinosido, Maruquina, mitrajavina, palmirina, pteropodina, rumberina, tetrahidroalstonina y uncarina. F. Suarez y colaboradores identificaron que el espectro IR de la mitrajavina muestra una banda de absorción intensa en 1710 cm-1, asociado al grupo –COOR y banda ancha a 3400 cm-1 –NH del anillo aromático. La palmirina muestra señales en 3320 cm-1 (NH), 1740 (COOR) y 1695 (CONH). Y la rumberina muestra señales en 3300 cm-1 (NH, OH), 1730 (COOR) y 1700 (CONH). Jimenez-Suarez y colaboradores identificaron el espectro de

(6E,10E,14E,18E)-2,6,10,14,18,23-hexamethyl- 2,6,10,14,18,22-tetracosahexaene se encuentra en 2963, 2927, 2855, 1667, 1603 cm1.

De acuerdo con Borges y colaboradores el espectro IR de la palmirina muestra las siguientes bandas características: 3300 cm-1 (-NH), 1720 cm-1 (-E-OR) y 1690 cm'1 (-CO-NH-). Mientras que el espectro IR de la rumberina muestra las siguientes bandas características: 3300 cm^{-1} (banda ancha, --N H y --O H), 1720 cm-l (-g.OR) y 1690 cm- '(--C O * NH-1). Paniagua-Vega y colaboradores encontraron que las bandas de absorción de la Hameline se encuentran en: 3436, 3022, 3019, 3017, 1712, 1630, 1492, 1439, 1312, 1130, 1087, 1043 cm-1. De acuerdo con Gomes do Nascimento el análisis IR de Pteropodina revela bandas características de N-H en 3260 cm-1, C-N de aminas terciarias en 1086 cm-1, C-O en 1212 y 1192 cm-1, C=O de éster α,β-insaturado y de γ-lactamas en 1707cm-1, C=C en 1627 cm-1; una banda en 751 cm-1 de C-H de anillo aromático y 2949 y 2791 cm-1 de C-H alifáticos. Isopteropodina revela bandas de N-H en 3263 cm-1, en1210 cm-1 de C-O, C=O, de éster α,β-insaturado y de γ-lactama en 1708 cm-1, en 1625 cm-1 y 754 cm1 de C-H del anillo aromático y en 2949, 2925 y 2800 cm-1 de C-H alifáticos. Palmirina revela bandas de N-H en 3259 cm-1, de C-N de aminas terciarias en 1086 cm-1, en 1209 cm-1 de C-O, de C=O de éster α,β-insaturado, de γ-lactamas en 1706 cm-1, en 1630 cm-1 y 755 cm-1 de C-H del anillo aromático y en 2948 y 2791 cm-1 de C-H alifáticos. Isopalmirina revela bandas de N-H en 3289 cm-1, de C-N de aminas terciarias en 1088 cm-1, de C-O en 1216 cm-1, de C=O de éster α,β-insaturado, de γ-lactamas en 1706 cm-1, de C=C en 1630 cm-1, en 825 cm-1 y 770 cm-1 de C-H del anillo aromático y de C-H alifáticos en 2926 e 2854 cm-1. Canferol-3-O-α-L-rhamnopiranosil-(1→6)-β-D-galactopiranosídeo muestra una banda larga en 3417 cm-1 correspondiente a O-H, caracterizando la presencia de hidroxila, una banda en 1647 cm-1 de C=O, bandas en 1634, 1614 cm-1 correspondientes de C=C de alqueno, bandas en 1466, 1452, 1416 y 1385 cm-1 de C=C de anillos aromáticos y bandas entre 1257 e 1049 cm-1 de C-O. El ácido ursólico revela la presencia de C=O en 1692 cm-1, en 3424 cm-1 de O-H y en 2927 e 2869 cm-1 de C-H alifáticos.

Un análisis comparativo con la literatura (Macari *et. al*., 1990) y (Moreira, 2001), (Subrahmanyam *et. al*., 1973) permitió identificar una mezcla esteróides: β-sitosterol y estigmasterol, los cuales revelaron una banda larga en 3391 cm^{-1} de O-H, en 2958, 2934 e 2870 cm-1 de C-H alifáticos. Estigmast-4-en-3,6-diona revela bandas en 1726 cm-1 y 1690 cm-1 de carbonilos de cetona conjugada, en 3444 cm-1 de O-H, en 2955, 2931 e 2869 cm-1 de C-H alifáticos y de C=C en 1462 cm^{-1}. El ácido vanílico revela bandas en 3487 cm-1 de O-H, en 1681 cm-1 de C=O de carbonila conjugada, en 1598, 1523 e 1434 cm-1 relacionadas C=C del anillo aromático y de C-O en 1282, 1237, 1204 e 1112 cm^{-1}.

Los espectros de absorción de FTIR relacionados con los extractos de *H. patens* se observaron en 1058, 1274, 1371, 1442, 1697 y 2847-2955 cm-1. La señal de 1274 cm^{-1} se aproxima a la señal de 1282 cm^{-1} de los enlaces C-O encontrada en el ácido vinílico; la señal de 1371 cm^{-1} a la señal de 1385 cm^{-1} de los en laces C=C de anillos aromáticos del Canferol-3-O-α-L-rhamnopiranosil-(1→6)-β-D-galactopiranosídeo; la señal de 1442 cm^{-1} a las señales de 1439 y 1043 cm^{-1} de la hamelina, de 1452 cm^{-1} de los enlaces C=C de anillos aromáticos del Canferol-3-O-α-L-rhamnopiranosil-(1→6)-β-D-galactopiranosídeo y a la señal de 1434 cm^{-1} de los enlaces C=C del anillo aromático del ácido vinílico; la señal de 1697 cm^{-1} a las señales de 1692 cm^{-1} de los enlaces C=O del ácido ursólico, de 1690 cm^{-1} de carbonilos de cetona conjugada de Estigmast-4-en-3,6-diona y de la señal de 1690 cm^{-1} (-CO-NH-) de la Palmirina y la rumberina. Y las señales que se encuentran entre 2847-2955 cm^{-1} podrían ser correspondientes a las señales de 2963, 2927 y 2855 cm^{-1} del (6E,10E,14E,18E)-2,6,10,14,18,23-hexamethyl-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaene; de 2949 y 2791 cm^{-1} de C-H alifáticos de la pteropodina; de 2949, 2925 y 2800 cm^{-1} de C-H alifáticos de la isopteropodina; 2948 y 2791 cm^{-1} de C-H alifáticos de la palmirina; 2926 y 2854 cm^{-1} de C-H alifáticos de la isopalmirina; 2927 cm^{-1} de enlaces C=O y 2869 cm^{-1} de C-H alifáticos del ácido ursólico; de 2958, 2934 y 2870 cm^{-1} de C-H alifáticos de β-sitosterol y estigmasterol, y de 2955, 2931 y 2869 cm^{-1} de C-H alifáticos de Estigmast-4-en-3,6-diona.

No se encontraron bandas de absorción cercanas a 1058 en la literatura. Ahora bien, los espectros de absorción de FTIR asociados a la membrana dopada se encontraron en 730, 1009, 1106, 1274, 1442, 1650, 2847,2920 y 2955 cm^{-1}. Donde, la señal de 1106 cm^{-1} se encuentra cercana a la de 1112 cm^{-1} de C-O del ácido vanílico; la señal de 1274 cm^{-1} a la de 1282 cm^{-1} de enlaces C=C del anillo aromático del del ácido vanílico; la señal de 1442 cm^{-1} a la de 1439 cm^{-1} de la hamelina, 1452 cm^{-1} de C=C de anillos aromáticos del Canferol-3-O-α-L-rhamnopiranosil-(1→6)-β-D-galactopiranosídeo y 1434 cm^{-1} relacionadas C=C del anillo aromático del ácido vanílico; la señal de 1650 cm^{-1} es similar a 1647 cm^{-1} de C=O del Canferol-3-O-α-L-rhamnopiranosil-(1→6)-β-D-galactopiranosídeo; la señal de 2847 cm^{-1} a la de 2854 cm^{-1} de C-H alifáticos de la isopalmirina y 2855 cm^{-1} de (6E,10E,14E,18E)-2,6,10,14,18,23-hexamethyl- 2,6,10,14,18,22-tetracosahexaene; la señal de 2920 cm^{-1} a las de 2927 cm^{-1} (6E,10E,14E,18E)-2,6,10,14,18,23-hexamethyl-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaene, 2925 cm^{-1} de C-H alifáticos de isopteropodina, 2926 cm^{-1} de C-H alifáticos de la isopalmirina, 2927 cm^{-1} de C-H alifáticos del ácido ursólico y 2931 cm^{-1} de C-H alifáticos de Estigmast-4-en-3,6-diona; la señal de 2955 cm^{-1} es similar a la de 2963 cm^{-1} de (6E,10E,14E,18E)-2,6,10,14,18,23-hexamethyl-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaene, 2949 cm^{-1} de C-H alifáticos de la pteropodina, 2949 cm^{-1} de C-H alifáticos de la isopteropodina, 2948 cm^{-1} de C-H alifáticos de la palmirina, 2958 cm^{-1} de C-H alifáticos del estigmasterol y 2955 cm^{-1} de C-H alifáticos de Estigmast-4-en-3,6-diona.

Raghavendra Rao y colaboradores demostraron la capacidad que los compuestos del extracto metanólico de H. patens (isopteropodina, rumberina, palmirina, maruquina) son valiosas moléculas que potencialmente puede inhibir la Interacción MDM2 (uno de los genes ligados a tumorgénesis más estudiados de la última década) y p53 (un importante gen supresor tumoral), demostrando que son agentes anticancerígenos similares al Nutlin. Los compuestos rumberina y mitrajavina mostraron tener actividad leishmanicida, teniendo valores ligeramente más altos que los reportados para los dos medicamentos más utilizados para el tratamiento de la leishmaniasis: la alilamina terbinafina y el péptido catiónico dermaseptina (Suarez *et. al*., 2008). Yuan-man examinó los efectos antidiabéticos del ácido

rotundico, concluyendo que la ingesta de ácido rotundico disminuye el nivel de glucosa, aumenta el nivel de insulina en plasma, y disminuye los niveles de triglicéridos y colesterol en plasma e hígado. Los datos histológicos reafirman lo anterior mostrando una reducción de las gotas de lípidos hepáticos (Yuan-Man, 2015).

El ácido ursólico (un triterpeno pentacíclico) tiene varias propiedades inmunomoduladoras, y reduce fuertemente el radical 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Do Nascimento *et. al*., 2014; Syed Hussein *et. al*., 2015; Xu *et. al*., 2015; Jimenez-Suarez *et. al*., 2016). La aricina es un extracto alcaloide con actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, actividad antitumoral y actividad amebicida. La actividad inhibitoria contra la α-glucosidasa en *H. patens* demuestra que puede ser una fuente de agentes hipoglucemiantes, que podrían tener efectos beneficiosos para el tratamiento de la diabetes. *H. patens* posee actividades antiinflamatorias, antioxidantes e inhibidoras de la glucosidasa, un resultado que valida su uso tradicional para el tratamiento de la inflamación y la diabetes. Estos efectos pueden atribuirse a la presencia de (6E, 10E, 14E, 18E) -2,6,10,14,18,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexano (el cual también muestra actividad antiinflamatoria), β-sitosterol y estigmasterol, que se aislaron por primera vez de *H. patens*, y exhibieron una actividad antidiabética significativa (Jimenez-Suarez *et. al*., 2016).

El β-sitosterol y el estigmasterol disminuyen significativamente la inflamación y los niveles de mieloperoxidasa (enzima asociada a varias condiciones patológicas como: enfermedad cardiovascular, cáncer, enfermedad renal, daño pulmonar y Alzheimer) inducidos por el Activador Tisular del Plasminógeno (Jimenez-Suarez *et. al.*, 2016). Por otra parte, el β-sitosterol, un fitoesterol, juegan un papel en la inmunomodulación (Alappat *et. al*., 2010), tiene propiedades antitumorales, antihipercolesterolémicas, antiinflamatorias, antibacterianas y antifúngicas (Bin Sayeed *et. al*., 2015). Se demostró que los extractos de gel de *Aloe vera* (β-sitosterol se reconoció como el principal compuesto de este gel) exhibían una actividad angiogénica en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo en ensayos CAM.

Loizou y colaboradores llegaron a la conclusión de que el β-sitosterol es capaz de inhibir tanto la adhesión vascular como la intracelular, además de reducir la expresión de NFκB. La administración de dosis extremadamente pequeñas de β-sitosterol y daucosterol (su 3-O-D-glucósido) aumentan la actividad de las células NK y elevan la actividad proliferativa in vitro de los linfocitos T, cuando son estimulados por fitohemaglutinina (PHA) (Saeidnia *et. al*., 2014). Además, mejora la acción inmune de la vitamina D3 en macrófagos, esto podrían ser beneficioso para las personas con deficiencia de vitamina D y para aquellos con enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (Alappat *et. al*., 2010).

El β-sitosterol estimula las enzimas antioxidantes mediante la activación del receptor de estrógenos vía dependiente de PI3-quinasa lo que sugiere que este fitoesterol podría ser un eliminador de ROS, ya que redujo los niveles de glucosa, óxido nítrico (NO) y HbA1c en ratas diabéticas inducidas por estereptozocina seguidas de un aumento en el nivel de insulina. El estrés oxidativo inducido por la glucosa oxidasa y la peroxidación lipídica podrían prevenirse mediante la incorporación de β-sitosterol en la membrana celular que reveló un valioso efecto del compuesto en los trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (Saeidnia *et. al*., 2014). Modula los niveles de enzimas antioxidantes en la patogénesis, detención de células en fase G2/M en células cancerosas, y disminución de la generación de radicales libres in vitro (Bin Sayeed *et. al*., 2015). También promueve la apoptosis al aumentar niveles de primera señal de apoptosis (FAS) y la actividad de caspasa-8, fosforilación de la quinasa reguladora de señal extracelular (ERK) y la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (MAPK), inhibiendo la proliferación de células cancerosas asociadas con la activación del ciclo de esfingomielina, incluso a bajas concentraciones sin efecto citotóxico para las células no cancerosas (Bin Sayeed *et. al*., 2015).

La citotoxicidad de β-sitosterol fue examinada contra líneas celulares de cáncer por ensayo MTT. Los resultados indicaron que el β-sitosterol inhibe la línea celular HT-29 (carcinoma de colon); Ovesna y colaboradores, registraron la inhibición experimental de desarrollo de cáncer de colon y mama por taraxasterol y β-

sitosterol. Ellos declararon que estos compuestos pueden afectar diferentes niveles de desarrollo tumoral, como su inhibición efectos sobre la creación, promoción e inducción de células cancerosas, así como la inhibición de la invasión y metástasis de las células tumorales. Un suplemento dietético de β-sitosterol disminuyó los niveles circulantes de 17β-estradiol (E2), así como el crecimiento tumoral de MCF-7 inducido por E2 en ovariectomizedathymic en ratones desnudos, lo que sugiere que un suplemento dietético alto de fitoesterol puede tener efecto benéfico en mujeres con cáncer de mama.

El tratamiento de β-sitosterol en células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 aumentó la apoptosis en cultivo celular y crecimiento tumoral indicando su efecto beneficioso en prevención del cáncer de mama. También mostró tener actividad apoptótica en células leucémicas humanas U937 activando caspasa-3. El β-sitosterol indica actividad antimutagénica y actúa como un inhibidor de la mutagénesis de tetraciclina en un 65,3%. Además, la administración de este compuesto no cambió el número de MN-PCE (eritrocitos policromáticos micronucleados). Paniagua-Pérez y colaboradores indicaron que no hay SCE (intercambios de cromátidas hermanas), así como tampoco cambios en la cinética de proliferación celular, o en índice de la actividad mitótica. Por esta razón, el β-sitosterol no se considera genotóxico y / o citotóxico (Saeidnia *et. al*., 2014).

Las catequinas son compuestos polifenólicos, los cuales tiene muchas propiedades beneficiosas para la salud humana, como anticancerígenos, antiobesidad, antidiabéticos, tienen efectos cardioprotectores, antiinfecciosos, hepatoprotectores y neuroprotectores (Isemura, 2019). Son compuestos antioxidantes, disminuyen la producción de óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno y varios mediadores proinflamatorios *in vitro* (Jimenez-Suarez *et. al*., 2016), los cuales se propone que suprimen los procesos inflamatorios que conducen a la transformación, hiperproliferación e inicio de carcinogénesis (siendo uno de los compuestos más abundantes el galato de epigalocatequina (EGCG), que tienen efectos preventivos contra el cáncer en cultivos celulares, animales y clínicos), inhiben la proliferación celular y ejercen una fuerte actividad antirradical, aumentando la actividad

antioxidante en una variedad de órganos de ratones y, por lo tanto, mejoran el efecto quimiopreventivo general de los antioxidantes en esas células y tejidos, puede mejorar la comunicación de unión entre células y así proteger las células del desarrollo de tumores (Singh *et. al*., 2011), controla el tono vascular y mejora la disfunción endotelial encontrada en condiciones patológicas tales como diabetes e hipertensión, induce la activación de la Nitrógeno oxidasa sintasa endotelial (eNOS), mejora la respuesta de relajación dependiente del endotelio deteriorada a la acetilcolina, induce una reducción en la liberación de ET-1, estrés oxidativo sistémico y vascular e inhibición de la actividad de la NADPH oxidasa y aumenta la fosforilación de Akt y eNOS en anillos aórticos previniendo hipertensión, proteinuria y disfunción vascular (Gomez-Guzman *et. al*., 2011).

Los estudios de cultivo celular in vitro muestran que algunas catequinas inducen potentemente la apoptosis y promueve la detención del crecimiento celular anormal, al alterar la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular, activar caspasas asesinas y suprimir la activación de NFκB. Además, regula y promueve la reparación del ADN dependiente de IL-23 y estimula las actividades de las células T citotóxicas en un microambiente tumoral. También bloquea la carcinogénesis al modular las vías de transducción de señales involucradas en el desarrollo del cáncer (Singh *et. al*., 2011).

La epicatequina y sus metabolitos relacionados inhiben la actividad de NADPH-oxidasa en cultivos de células endoteliales de cordón umbilical humano, considerando las concentraciones micromolares utilizadas en cultivos celulares, lo que resulta en una disminución en el anión superóxido. Esta inhibición de NADPH-oxidasa podría ser operativa *in vivo* para la regulación señalización celular y función vascular. La Epicatequina y procianidinas también disminuyen los oxidantes celulares que están involucrados en la activación de NF-κB previniendo su activación. Los datos in vitro respaldan la capacidad de la epicatequina para inhibir NF-κB con alta especificidad, adicionalmente varios estudios en los que se alimentaron roedores con epicatequina mostraron actividad antiinflamatoria y anticancerígena (Fraga y Oteiza, 2011).

La Speciophylline muestra actividad antiplasmodial *in vitro* contra la cepa *Plasmodium falciparum* W2 resistente a la cloroquina (Fiot *et. al*., 2005; Pierrot *et. al*, 2018). El estigmasterol, un esterol vegetal, ha sido investigado por sus perspectivas farmacológicas como antiosteoartrítico, antihipercolesterolémico, antiinflamatorio, citotoxicico antitumoral, efecto hipoglucémico, antimutagénico, antioxidante y antiinflamatorio. Es una molécula importante que participa en la síntesis de muchas hormonas como la progesterona, andrógenos, estrógenos y corticoides (Kaur *et. al*., 2011) (Gabay *et. al*., 2010).

Los estrógenos femeninos y los andrógenos masculinos juegan un papel importante en la curación de heridas. Se sabe que el estrógeno regula los genes involucrados en la regeneración, producción de matriz, inhibición de proteasa, función epidérmica e inflamación. Los glucocorticoides inducen una menor diferenciación y proliferación de células inmunes, moléculas de adhesión celular y expresión de transcripción reguladora de genes (Mir *et. al*., 2018). Su actividad sobre los mediadores inflamatorios y las metaloproteinasas producidas por los condrocitos muestra que inhibe varios mediadores proinflamatorios y de degradación de la matriz extracelular típicamente involucrados en la degradación del cartílago, a través de la inhibición de la vía NF-kB contrarrestando la expresión metaloproteinasas de la matriz extracelular involucradas en la degradación del cartílago junto con un efecto inhibitorio sobre el mediador proinflamatorio prostaglandina E2.

Por tanto, el estigmasterol previene la expresión de mediadores nocivos (Gabay *et. al.*, 2010). Kaempferol-3-O-Rutinosido es un potente inhibidor de la α-glucosidasa que existe en muchas plantas. Estudios previos demostraron que el kaempferol inhibe la acumulación de lípidos en los adipocitos, atenúa los factores adipogénicos tardíos como PPAR-γ y C / EBPα (soo jang *et. al*., 2016) ya que algunos tejidos adiposos y macrófagos contienen adipocinas bioactivas que tienen influencia negativa deteriorando el proceso de cicatrización de heridas (Mir *et. al*., 2018) y tienen efectos protectores contra el daño hepático oxidativo agudo inducido por CCl4 restaurado significativamente los niveles de glutatión (GSH) y mostraban

actividades normales de catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) (Wang *et. al.*, 2015).

Se demostró que la pteropodina aumenta en un 25.8% la producción de linfocitos, exhibe una gran capacidad para atrapar el radical libre de DPPH, es un antimutageno eficaz que reduce las alteraciones cromosómicas inducidas por la doxorrubicina, un agente antineoplásico que daña el ADN al reducir una molécula de quinona a un radical semiquinona (su capacidad para inhibir el daño del ADN está relacionada con su eficiente capacidad de captura de radicales libres), muestra un efecto apoptótico en leucemia de linfoblastos y participa en la mejora del deterioro de la memoria inducido por la disfunción colinérgica en cerebros de ratones (Paniagua-perez *et. al*., 2009).

Los pigmentos más comunes encontrados en los cloroplastos son: clorofila (65%), carotenos (6%) y xantofilas (29%) aunque la distribución porcentual es altamente variable entre cada especie. Gates y colaboradores describieron las propiedades espectrales de las plantas, demostrando que una gran cantidad de pigmentos accesorios absorben en la región de 445 nm, en el azul, pero solo la clorofila absorbe en el rojo aproximadamente a 645 nm y también se muestran dos regiones del espectro donde relativamente se produce poca absorción: de la región de 500 mμ (20,000 cm-1) a 600 mμ (16,660 cm-1) y una región de 700 mμ (14.300 cm-1) a 1200 mμ (8280 cm-1) (Gates *et. al*., 1965). Estos datos concuerdan con los espectros obtenidos del extracto etanolico de *H. patens* en donde existen bandas de absorción entre 400 y 450 nm relacionadas con carotenoides y entre 600 a 700 en las que se ubica la clorofila a y b. De igual forma una región de poca absorción del extracto de *H. patens* se encuentra ente los 500nm y 600nm. Sin embargo, aún existe una región entre 250nm y 400nm en el cual no se reconocieron compuestos específicos, solamente un gran número de compuestos fenólicos. estas bandas pueden ser, de acuerdo con Panal y colaboradores, B-sitosterol el cual absorbe a 268.5 nm.

Suarez y colaboradores encontraron que el espectro UV del Kaempferol-3-O-rutinosido mostró bandas de absorción características en 207, 268 y 365 nm. Borges

y colaboradores aislaron dos alcaloides oxindoles: Palmirine, con bandas características en 312 nm, 255 nm y 220 nm y rumberina con bandas características en 312 nm, 255 nm y 227 nm. La clorofila a y clorofila b son los pigmentos más frecuentes en las plantas superiores, la clorofila a se encuentra en todas plantas fotosintéticas y clorofila b en la mayoría de las plantas, pero no todas. Las plantas absorben de manera muy eficiente sobre todo en el rango ultravioleta y las regiones visibles del espectro.

En organismos fotosintéticos los carotenoides desempeñan un papel vital de transferencia de energía, o protegiendo el centro de reacción contra la autooxidación. En los organismos no fotosintéticos, los carotenoides han sido vinculados a los mecanismos de prevención de la oxidación. Las antocianinas, son responsables de las tonalidades rojas, azules y moradas, son un tipo de flavonoides muy interesantes ya que tienen un extraordinario poder antioxidante, también protegen los capilares de la retina, por lo que tienen un papel beneficioso para la vista, ayudan a reforzar el sistema cardiovascular, tienen un efecto antioxidante potente, son antivirales; ayudan a combatir resfriados, infecciones y alergias y tienen propiedades anticancerígenas.

Como fue mencionado anteriormente, son numerosas las características que debe cubrir el apósito ideal para la curación de heridas y, a pesar de que el apósito perfecto no existe, las fibras electrohiladas realizan la mayoría de las funciones de los apósitos ideales: debido a su estructura de fibras interconectadas, estructura porosa y área relativamente amplia son capaces de mantener un ambiente húmedo fisiológico que favorece la proliferación de células dérmicas, mantienen un ambiente térmico fisiológico, permiten el intercambio gaseoso, puede administrar varios agentes terapéuticos en el sitio de la herida, facilitan la eliminación de exudado, al no contar con un adhesivo no mancha, ni lesiona, ni macera, ni irrita (las cintas utilizadas para mantener los apósitos en su lugar son causas comunes de alergia) la piel circundante a la herida, y al ser un material biodegradable no es necesario su retiro por lo cual se disminuye la probabilidad de provocar dolor o traumatismo al paciente, permite valorar la evolución de la lesión en tiempo real, al no ser una

estructura rígida permite adaptar las nanofibras a los diferentes contornos y pliegues naturales de la piel y la acción combinada de extractos y características morfológicas de las membranas crean una barrera que evita la colonización bacteriana, mejora la biodisponibilidad y mantiene estable la concentración del medicamento en el área objetivo y son independientes de la circulación sistémica (Khan AR *et. al*., 2018) (Jones *et. al*., 2006).

Las nanofibras electrohiladas son especialmente beneficiosas para las heridas crónicas y se usan ampliamente en muchos casos como tratamiento. La úlcera del pie diabético es un ejemplo específico en el que el electrohilado puede tener un gran impacto. Dado que la diabetes inhibe la capacidad de curación natural del cuerpo, las ulceras de pie diabético son acompañadas de hipoxia que causa angiogénesis insuficiente y amplifica la respuesta inflamatoria temprana y aumenta los niveles de radicales libres (Mir *et. al*., 2018). Las personas con diabetes necesitan un tratamiento que restablezca los tejidos y el rendimiento celular del cuerpo al nivel de un cuerpo sano. Los tratamientos de electrohilado protegen la herida de posibles infecciones y aceleran el proceso de curación. (Peters *et. al*., 2019). El electrohilado exitosamente crea hilos y paquetes de nanofibras que pueden usarse no solo como apósitos eficaces para la curación de heridas, sino también pueden utilizarse como suturas quirúrgicas (Xie, 2017).

10. Conclusiones

El uso de medicamentos y terapias tradicionales exige más evidencia científica sólida de los principios detrás de las terapias y para la efectividad de los medicamentos. Avances recientes en las ciencias biológicas, junto con innovaciones nanotecnológicas pueden desempeñar un papel importante en la validación de estas prácticas. La nanotecnología se puede aplicar de diversas maneras. Una de las aplicaciones más prometedoras es la cicatrización de heridas. Las nanofibras exhiben propiedades que pueden ser beneficiosas en el cuidado de heridas, tanto agudas como crónicas, incluida una gran relación superficie/volumen, alta porosidad, adherencia celular mejorada y controlada tasa de degradación in vivo.

Fibras ultafinas biomimeticas asemejan a la matriz extracelular y que sirven como andamios sobre los cuales pueden proliferar las células dérmicas, además provee soporte mecánico a las células y promueve la migración celular. La estructura porosa da protección a la herida contra la penetración de las bacterias, promueve el intercambio de oxígeno, agua, nutrientes, productos de desecho y citocinas al lugar de la herida. De acuerdo con los resultados, las membranas poliméricas de PVP dopadas con los extractos de *H. patens* aceleran el proceso de cicatrización y mejoran la proliferación, diferenciación y estética de la cicatriz de heridas cutáneas en comparación con el transcurso normal de la cicatrización del grupo control.

A nivel histológico la estructura y diferenciación de la piel se ve mucho más definida en las histologías de grupo membrana dopada en la cual se observa la presencia de bandas musculares, una dermis engrosada, la presencia de una gran cantidad de vasos sanguíneos e incluso la aparición de primordios de folículos pilosos y de glándulas sebáceas que no se observaron en el grupo control. La acción combinada de las membranas y los extractos de *H. patens* crean una barrera la cual aísla a la herida y la protege de la contaminación ambiental, la capacidad antibacteriana y antifúngica del extracto elimina agentes patógenos que pudieran poner en riesgo la integridad de la herida.

Gracias a su relación superficie/volumen, las membranas dopadas son adaptables, flexibles, de fácil manipulación y se amoldan perfectamente a los contornos anatómicos de la piel que serían difíciles para otro tipo de apósitos. Su fácil elaboración y económica producción lo convierte en un producto accesible para poblaciones de escasos recursos económicos o para regiones marginadas en las cuales no es fácil acceder a los servicios de salud públicos.

Las nanofibras electrohiladas se están convirtiendo rápidamente en el futuro de la medicina regenerativa, ya que están reemplazando las prácticas más antiguas de vendaje para heridas, como vendajes y gasas. Sin embargo, el proceso no se ha utilizado ampliamente a escala industrial. El uso de material vegetal natural en el área electrohilado es nuevo. No muchas publicaciones están disponibles en este campo. en el campo del electrohilado, hace falta investigar los mecanismos celulares y moleculares de acción de un compuesto bioactivo sobre los tejidos. La mayoría de estas aplicaciones están aún en primeras etapas. En un futuro cercano, los estudios que se llevan a cabo hoy en día dejarán el ámbito académico del laboratorio y comenzarán su etapa de producción. El esfuerzo que se realiza mundialmente para el desarrollo de materiales y tecnologías, sumado a la investigación multidisciplinaria, revolucionarán la calidad de vida del hombre.

Referencias

- Alappat, L., Valerio, M., & Awad, A. B. (2010). Effect of vitamin D and β-sitosterol on immune function of macrophages. *International immunopharmacology*, *10*(11), 1390-1396.
- Al-Youssef, H.M., Amina, M., Hassan, S., Amna, T., Jeong, J.W., Nam, K.T. (2013). Herbal Drug Loaded Poly (D,L-lactide-co-glycolide) Ultrafine Fibers: Interaction with Pathogenic Bacteria. Macromol Res., 21: 589-598.
- Antunesa, M.D., Dannenberg, G.S., Fiorentini, A.M., Pinto, V., Lim, L., Zavareze, E.R. (2017). Antimicrobial electrospun ultrafine fibers from zein containing eucalyptus essential oil/cyclodextrin inclusion complex. Int J Biol Macromol, 104: 874-882.
- Aparicio Mena, A. J. (2005). La medicina tradicional como medicina ecocultural.
- Aruan, N.M., Sriyanti, I., Edikresnha, D., Suciati, T., Munira, M.M., Khairurrijal. (2017). Polyvinyl Alcohol/Soursop Leaves Extract Composite Nanofibers Synthesized Using Electrospinning Technique and their Potential as Antibacterial Wound Dressing. Procedia Eng., 170: 31-35.
- Berthomieu, C., & Hienerwadel, R. (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynthesis research*, *101*(2-3), 157-170.
- Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology advances*, *28*(3), 325-347.
- Bin Sayeed, M. S., & Ameen, S. S. (2015). Beta-sitosterol: a promising but orphan nutraceutical to fight against cancer. *Nutrition and cancer*, *67*(8), 1216-1222.
- Borges, J., Manresa, M. T., Ramón, J. M., Pascual, C., & Rumbero, A. (1979). Two new oxindole alkaloids isolated from Hamelia Patens Jacq. *Tetrahedron Letters*, *20*(34), 3197-3200.
- Burger, C., Hsiao, B. S., & Chu, B. (2006). Nanofibrous materials and their applications. *Annu. Rev. Mater. Res.*, *36*, 333-368.

- Caracciolo, P. C., Tornello, P. R. C., Buffa, F., Ballarin, F. M., Cuadrado, T. R., & Abraham, G. A. (2011). Pequeñas fibras, grandes aplicaciones. *Ciencia hoy*, *21*(121), 57-64.
- Castellanos-Ramirez, D. K., Gonzalez-Villordo, D., & Gracia-Bravo, L. J. (2014). Manejo de heridas. *Cirujano general*, *36*(2), 112-120.
- Castilla-Casadiego, D. A., Maldonado, M., Sundaram, P., & Almodovar, J. (2016). “Green” electrospinning of a collagen/hydroxyapatite composite nanofibrous scaffold. *MRS Communications*, *6*(4), 402-407.
- Chan, W.P., Huang, K.-C., Bai, M.-Y. (2017). Silk fibroin protein-based nonwoven mats incorporating baicalein chinese herbal extract: Preparation, characterizations, and in vivo evaluation. J. Biomed. Mater. Res. Part B, 105: 420–430.
- Chen, S., Liu, B., Carlson, M. A., Gombart, A. F., Reilly, D. A., & Xie, J. (2017). Recent advances in electrospun nanofibers for wound healing. *Nanomedicine*, *12*(11), 1335-1352.
- Choi, J. S., Kim, H. S., & Yoo, H. S. (2015). Electrospinning strategies of drug-incorporated nanofibrous mats for wound recovery. *Drug delivery and translational research*, *5*(2), 137-145.
- Coelho, D. S., Veleirinho, B., Alberti, T., Maestri, A., Yunes, R., Dias, P. F., & Maraschin, M. (2018). Electrospinning technology: designing nanofibers toward wound healing application. In *Nanomaterials-Toxicity, Human Health and Environment*. IntechOpen.
- Colthup, Norman B.. New York : Academic Press, 1975. 523 p.
- Costa, L.M.M., Olyveira, G.M., Cherian, B.M., Leao, A.L., Souza, S.F., Ferreira, M. (2013). Bionanocomposites from electrospun PVA/pineapple nanofibers/ Stryphnodendron adstringens bark extract for medical applications. Indust Crops and Prod., 41: 198-202.
- Dhivya, S., Padma, V. V., & Santhini, E. (2015). Wound dressings–a review. *BioMedicine*, *5*(4).
- Elisabetsky, E. (2003). Etnofarmacologia. *Ciência e Cultura*, *55*(3), 35-36.

- Erbay, E.A., Dagtekin, B.B.G., Türe, M., Yesilsu, A.F., Torres-Giner, S. (2017). Quality improvement of rainbow trout fillets by whey protein isolate coatings containing electrospun poly (ε-caprolactone) nanofibers with Urticadioica L. extract during storage. LWT - Food Science and Technology, 78: 340-351.
- Fagetti, A. (2011). Fundamentos de la medicina tradicional mexicana. *Saberes colectivos y diálogo de saberes en México*, 137-151.
- Fraga, C. G., & Oteiza, P. I. (2011). Dietary flavonoids: role of (−)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, *51*(4), 813-823.
- Gabay, O., Sanchez, C., Salvat, C., Chevy, F., Breton, M., Nourissat, G., ... & Berenbaum, F. (2010). Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. *Osteoarthritis and cartilage*, *18*(1), 106-116.
- Gaffney, J. S., Marley, N. A., & Jones, D. E. (2012). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Characterization of Materials*, 1-33.
- Ganesan, P., Pradeepa, P. (2017). Development and characterization of nanofibrous mat from PVA/Tridax Procumbens (TP) leaves extracts. Wound Medicine, 19: 15-22.
- García González, R. F., Gago Fornell, M., Chumilla López, S., & Gaztelu Valdés, V. (2013). Abordaje de enfermería en heridas de urgencias. *Gerokomos*, *24*(3), 132-138.
- Garcia-Orue, Gainza, G., Gutierrez, F.B., Aguirre, J.J., Evora, C., Pedraz, J.L. (2017). Novel nanofibrous dressings containing rhEGF and Aloe vera for wound healing applications. Int J Pharma, 523: 556-566.
- Gates, D. M., Keegan, H. J., Schleter, J. C., & Weidner, V. R. (1965). Spectral properties of plants. *Applied optics*, *4*(1), 11-20.
- Gómez-Guzmán, M., Jiménez, R., Sánchez, M., Zarzuelo, M. J., Galindo, P., Quintela, A. M. & Pérez-Vizcaíno, F. (2012). Epicatechin lowers blood pressure, restores endothelial function, and decreases oxidative stress and endothelin-1 and NADPH oxidase activity in DOCA-salt hypertension. *Free Radical Biology and Medicine*, *52*(1), 70-79.

- Gottrup, F., Apelqvist, J., & Price, P. (Eds.). (2010). Outcomes in controlled and comparative studies on non-healing wounds: recommendations to improve the quality of evidence in wound management. *Journal of wound care*, *19*(6), 237-268.
- Guarín-Corredor, C., Quiroga-Santamaría, P., & Landinez-Parra, N. S. (2013). Proceso de Cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas. *Revista de la Facultad de Medicina*, *61*(4), 441-448.
- Guo, S. A., & DiPietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*, *89*(3), 219-229.
- Hajiali, H., Summa, M., Russo, D., Armirotti, A., Brunetti, V., Bertorelli, R., Athanassiou, A., Mele, E. (2016). Alginate–lavender nanofibers with antibacterial and anti-inflammatory activity to effectively promote burn healing. J. Mater. Chem. B, 4: 1686–1695.
- Hosseinzadeh, S., Soleimani, M., Vossoughi, M., Ranjbarvan, P., Hamedi, S., Zamanlui, S. (2017). Study of epithelial differentiation and protein expression of keratinocyte-mesenchyme stem cell co-cultivation on electrospun nylon/B. vulgaris extract composite scaffold. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl., 75: 653-662.
- Hsu, Y. M., Hung, Y. C., Hu, L., Lee, Y. J., & Yin, M. C. (2015). Anti-diabetic effects of madecassic acid and rotundic acid. *Nutrients*, *7*(12), 10065-10075.
- Hu, X., Liu, S., Zhou, G., Huang, Y., Xie, Z., & Jing, X. (2014). Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. *Journal of controlled release*, *185*, 12-21.
- Huang, Y., Huang, Y. X., Sun, J., & Yan, C. G. (2018). Diastereoselective synthesis of dispirooxindoles via [3+ 2] cycloaddition of azomethine ylides to 3-phenacylideneoxindoles and evaluation of their cytotoxicity. *RSC advances*, *8*(42), 23990-23995.
- HwaKim, J., Lee, H., Jatoi, A.W., SoonIm, S., Soon Lee, J., Ick-Soo Kim. (2016). Juniperus chinensis extracts loaded PVA nanofiber: Enhanced antibacterial activity. Materials Letters, 181: 367-370.

- Isemura, M. (2019). Catechin in human health and disease.
- Jang, Y. S., Wang, Z., Lee, J. M., Lee, J. Y., & Lim, S. S. (2016). Screening of Korean natural products for anti-adipogenesis properties and isolation of kaempferol-3-O-rutinoside as a potent anti-adipogenetic compound from Solidago virgaurea. *Molecules*, *21*(2), 226.
- Jiménez, C. E. (2008). Curación avanzada de heridas. *Revista colombiana de Cirugía*, *23*(3), 146-155.
- Jimenez-Suarez, V., Nieto-Camacho, A., Jiménez-Estrada, M., & Alvarado Sanchez, B. (2016). Anti-inflammatory, free radical scavenging and alpha-glucosidase inhibitory activities of Hamelia patens and its chemical constituents. *Pharmaceutical biology*, *54*(9), 1822-1830.
- Jones, V., Grey, J. E., & Harding, K. G. (2006). Wound dressings. *Bmj*, *332*(7544), 777-780.
- Kamoun, E. A., Kenawy, E. R. S., & Chen, X. (2017). A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of advanced research*, *8*(3), 217-233.
- Kaur, N., Chaudhary, J., Jain, A., & Kishore, L. (2011). Stigmasterol: a comprehensive review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *2*(9), 2259.
- Khan, R., Xiangyang, S., Ahmad, A., & Mo, X. (2018). Electrospinning of crude plant extracts for antibacterial and wound healing applications: a review. *SM J Biomed Eng*, *4*(1), 1024.
- Koczkur, K. M., Mourdikoudis, S., Polavarapu, L., & Skrabalak, S. E. (2015). Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalton Transactions*, *44*(41), 17883-17905.
- Law, J. X., Liau, L. L., Saim, A., Yang, Y., & Idrus, R. (2017). Electrospun collagen nanofibers and their applications in skin tissue engineering. *Tissue engineering and regenerative medicine*, *14*(6), 699-718.
- Li, D., & Xia, Y. (2004). Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel?. *Advanced materials*, *16*(14), 1151-1170.

- Lin, S., Chen, M., Jiang, H., Fan, L., Sun, B., Yu, F. (2016). Green electrospun grape seed extract loaded silk fibroin nanofibrous mats with excellent cytocompatibility and antioxidant effect. Colloids Surf B Biointerfaces, 139: 156-163.
- Liu, Y., Zhou, S., Gao, Y., & Zhai, Y. (2019). Electrospun nanofibers as a wound dressing for treating diabetic foot ulcer. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *14*(2), 130-143.
- MacDonald, J. M., Geyer, M. J., & World Health Organization. (2010). *Wound and lymphoedema management*. World Health Organization.
- Martin, P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*, *276*(5309), 75-81.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, *17*(6), 271-278.
- Mena, A. J. A. (2005). La medicina tradicional como medicina ecocultural. *Gazeta de Antropología*, *21*.
- Menéndez, E. (1994). La enfermedad y la curación ¿Qué es la medicina tradicional? Alteridades. 4(7): 71-83.
- Mir, M., Ali, M. N., Barakullah, A., Gulzar, A., Arshad, M., Fatima, S., & Asad, M. (2018). Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. *Progress in biomaterials*, *7*(1), 1-21.
- Montes, I. F. (2006). Manejo avanzado de heridas. *Revista Mexicana de enfermería cardiológica*, *14*(1), 24-28.
- Motealleh, B., Zahedi, P., Rezaeian, I., Moghimi, M., Abdolghaffari, A.H., Zarandi, M.A. (2014). Morphology, drug release, antibacterial, cell proliferation, and histology studies of chamomile-loaded wound dressing mats based on electrospun nanofibrous poly (e-caprolactone)/polystyrene blends. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 102: 977-987.
- Movasaghi, Z., Rehman, S., & ur Rehman, D. I. (2008). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, *43*(2), 134-179.

- Murphy, P. S., & Evans, G. R. (2012). Advances in wound healing: a review of current wound healing products. *Plastic surgery international*, *2012*.
- Nascimento, R. R. G. D. (2010). Aspectos químicos do estudo de Hamelia patens Jacq.
- Paniagua-Pérez, R., Madrigal-Bujaidar, E., Molina-Jasso, D., Reyes-Cadena, S., Álvarez-González, I., Sánchez-Chapul, L., & Pérez-Gallaga, J. (2009). Antigenotoxic, antioxidant and lymphocyte induction effects produced by pteropodine. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, *104*(3), 222-227.
- Paniagua-Vega, D., Cerda-García-Rojas, C. M., Ponce-Noyola, T., & Ramos-Valdivia, A. C. (2012). A new monoterpenoid oxindole alkaloid from Hamelia patens micropropagated plantlets. *Natural product communications*, *7*(11), 1934578X1200701109.
- Paz, J. E. W., Contreras, C. R., Munguía, A. R., Aguilar, C. N., & Inungaray, M. L. C. (2018). Phenolic content and antibacterial activity of extracts of Hamelia patens obtained by different extraction methods. *brazilian journal of microbiology*, *49*(3), 656-661.
- Penner, M. (2010). Ultraviolet, Visible and fluorescence spectroscopy. En Nielsen, S. S. (Ed.). *Food analysis* (pp. 139-141). New York: Springer.
- Perumal, G., Pappuru, S., Chakraborty, D., Nandkumar, A.M., Chand, D.K., Doble, M. (2017). Synthesis and characterization of curcumin loaded PLA-Hyperbranched polyglycerol electrospun blend for wound dressing applications. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl., 76: 1196-1204.
- Peters, E., Tsang, E., Wang, E. (2019). The electrospinning process creates nanofibers that are used as wound dressings to advance the treatment of nonhealing wounds. University of Pittsburg. 1-7.
- Pierrot, D., Sinou, V., Bun, S. S., Parzy, D., Taudon, N., Rodriguez, J., & Bonne, D. (2019). Design and synthesis of simplified speciophylline analogues and β-carbolines as active molecules against Plasmodium falciparum. *Drug Development Research*, *80*(1), 133-137.

- Rios, M. Y., & Aguilar-Guadarrama, A. (2006). Alcaloides indólicos, terpenos, esteroles y flavonoides de las hojas de Hamelia patens Jacquin (Rubiaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, *11*(1), 0-0.
- Rosaweg, S., & Willemstad Curacao, N. A. (2017). Targeting p53-MDM2 Interaction by Natural Plant Products: A Novel Approach for Future Cancer Therapy. *Int. J. Life. Sci. Scienti. Res*, *3*(2), 940-950.
- Sadri, M., Arab-Sorkhi, S., Vatani, H., Bagheri-Pebdeni, A. (2015). New wound dressing polymeric nanofiber containing green tea extract prepared by electrospinning method. Fiber Polym., 16: 1742–1750.
- Saeidnia, S., Manayi, A., Gohari, A. R., & Abdollahi, M. (2014). The story of beta-sitosterol-a review. *European Journal of Medicinal Plants*, 590-609.
- Salem, C., Pérez, J. A., Henning, E., Uherek, F., Schultz, C., Butte, J. M., & González, P. (2000). Heridas. Conceptos generales. *Cuadernos de Cirugía*, *14*(1), 90-99.
- Schreml, S., Szeimies, R. M., Prantl, L., Karrer, S., Landthaler, M., & Babilas, P. (2010). Oxygen in acute and chronic wound healing. *British Journal of Dermatology*, *163*(2), 257-268.
- Schuttlefield, J. D., & Grassian, V. H. (2008). ATR–FTIR spectroscopy in the undergraduate chemistry laboratory. Part I: fundamentals and examples. *Journal of chemical education*, *85*(2), 279.
- Singer, A. J., & Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine*, *341*(10), 738-746.
- Singh, B. N., Shankar, S., & Srivastava, R. K. (2011). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical pharmacology*, *82*(12), 1807-1821.
- Sitorus, P., Harahap, U., & Barus, T. (2014). Isolation of β-sitosterol from n-hexane extract of Picria fel-terrae Lour. leave and study of its antidiabetic effect in alloxan induced diabetic mice.
- Suárez, A., Diaz, B., Tillett, S., Valdivieso, E., & Compagnone, R. (2011). Leishmanicidal activity of alkaloids from Hamelia patens. *Ciencia*, *16*(2).

- Suganya, S., Senthil Ram, T., Lakshmi, B.S., Giridev, V.R. (2011). Herbal drug incorporated antibacterial nanofibrous mat fabricated by electrospinning: An excellent matrix for wound dressings. J. Appl. Polym. Sci., 121: 2893–2899.
- Surana, A. R., Kumbhare, M. R., & Wagh, R. D. (2016). Estimation of total phenolic and total flavonoid content and assessment of in vitro antioxidant activity of extracts of Hamelia patens Jacq. stems. *Research Journal of Phytochemistry*, *10*(2), 67-74.
- Suwantong, O., Pankongadisak, P., Deachathai, S., Supaphol, P. (2014). Electrospun poly (l. lactic Acid) fiber mats containing crude Garcinia mangostana extract for use as wound dressing. Polymer Bulletin, 71: 925-949.
- Thakur, R., Jain, N., Pathak, R., & Sandhu, S. S. (2011). Practices in wound healing studies of plants. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, *2011*.
- Vargas, E.A.T., Barach, N.C.V., Brito, J., Queiroz, A.A.A. (2010). Hyperbranched polyglycerol electrospun nanofiber for wound dressing applications. Acta Biomaterialia, 6: 1069-1078.
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*, *37*(5), 1528-1542.
- Venkatrajah, B., Vanitha Malathy, V., Elayarajah, B., Rajendran, M. R., Rammohan, R. (2012). Biopolymer and Bletilla striata herbal extract coated cotton gauze preparation for wound healing. J. Med. Sci. 12(6), 148-160.
- Wang, Y., Tang, C., & Zhang, H. (2015). Hepatoprotective effects of kaempferol 3-O-rutinoside and kaempferol 3-O-glucoside from Carthamus tinctorius L. on CCl4-induced oxidative liver injury in mice. *journal of food and drug analysis*, *23*(2), 310-317.
- Yao, C.-H., Yeh, J.-Y., Chen, Y.-S., Li, M.-H., Huang, C.-H. (2015). Wound-healing effect of electrospun gelatin nanofibres containing centella asiatica extract in a rat model. J. Tissue Eng. Regen. Med.

- Yousefi, I., Pakravan, M., Rahimi, H., Bahador, A., Farshadzadeh, Z., Haririan, I. (2017). An investigation of electrospun Henna leaves extract-loaded chitosan based nanofibrous mats for skin tissue engineering. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl., 75: 433-444.
- Zhang, W., Ronca, S., & Mele, E. (2017). Electrospun nanofibres containing antimicrobial plant extracts. *Nanomaterials*, *7*(2), 42.

Perspectivas

Como próximo paso se deben identificar los espectros de absorción de los grupos funcionales de la herida y ver su comportamiento a lo largo del proceso de cicatrización y correlacionarlos con la síntesis de colágeno y posibles marcadores moleculares que estén relacionados con la cicatrización y remodelación de la herida. La terapia de electrohilado dopado con extractos de *H. patens* también se puede aplicar a un modelo de herida causada por quemadura. Para lo cual se utiliza una placa de metal especial de 2 × 2 cm que se calienta a 60 ° C y se aplica en el área dorsal de los animales durante 30 segundos para inducir quemaduras de espesor parcial. Las heridas por quemaduras de segundo grado pueden hacerse colocando una placa caliente a 90 ° C en el área dorsal seleccionada del animal durante 10 segundos. Mientras que, para la quemadura de espesor completo, la placa de metal se calienta a 100 ° C y aplicada en el área dorsal durante 30 segundos. Para su futura aplicación médica, de deben realizar pruebas de irritación, esta prueba se realiza aplicando 1 g de la formula (extracto vegetal) sobre 2 pulgadas cuadradas de piel del dorso de la mano de cinco pacientes humanos voluntarios y se les solicita que informen cualquier reacción o irritación que suceda en las próximas 24 horas (Thakur *et. al*., 2011).

Premios y participaciones en congresos

1. Presentación en modalidad cartel con el trabajo: “ESTUDIO ETNOFARMACOLÓGICO DEL USO DE EXTRACTOS DE HAMELIA PATENS JACQ. EN EL TRATAMIENTO DE HERIDA CUTANEAS” dentro de las actividades del IX Congreso Nacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud 2018, celebrado los días 14, 15 y 16 de junio del 2018, Puebla, Puebla.
2. Obtención del tercer lugar en la modalidad cartel a nivel licenciatura con el trabajo titulado: “ESTUDIO ETNOFARMACOLÓGICO DEL USO DE EXTRACTOS DE HAMELIA PATENS JACQ. EN EL TRATAMIENTO DE HERIDA CUTANEAS” dentro de las actividades del IX Congreso Nacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud 2018, celebrado los días 14, 15 y 16 de junio del 2018, Puebla, Puebla.
3. Participación en el primer encuentro estatal de jóvenes investigadores 2019 celebrado el 19 y 20 de noviembre del 2019, Puebla, Puebla.
4. Presentación en modalidad oral del trabajo: “MEMBRANAS DE PVP OBTENIDAS POR ELECTROHILADO DOPADAS CON EXTRACTOS DE HAMELIA PATENS JACQ. MEJORAN LA CICATRIZACIÓN DE HERIDA CUTÁNEAS” dentro de las actividades del XVIII Congreso Internacional de la AMCICHAC 2019, realizado del 19 al 21 de septiembre del 2019, Monterrey, Nuevo León.
5. Presentación en modalidad cartel del trabajo: “MEMBRANAS DE PVP OBTENIDAS POR ELECTROHILADO DOPADAS CON EXTRACTOS DE HAMELIA PATENS JACQ. MEJORAN LA CICATRIZACIÓN DE HERIDA CUTÁNEAS” dentro de las actividades del XVIII Congreso Internacional de la AMCICHAC 2019, realizado del 19 al 21 de septiembre del 2019, Monterrey, Nuevo León.
6. Obtención del primer lugar en la modalidad oral del trabajo: “MEMBRANAS DE PVP OBTENIDAS POR ELECTROHILADO DOPADAS CON EXTRACTOS DE HAMELIA PATENS JACQ. MEJORAN LA CICATRIZACIÓN DE HERIDA CUTÁNEAS” dentro de las actividades del XVIII Congreso Internacional de la

AMCICHAC 2019, realizado del 19 al 21 de septiembre del 2019, Monterrey, Nuevo León.

7. Presentación en modalidad oral del trabajo: “MEMBRANAS DE PVP NANOESTRUCTURADAS DOPADAS CON EXTRACTOS DE HAMELIA PATENS JAQC. MAJORAN LA CICATRIZACION DE HERIDAS CUTANEAS” dentro de las actividades del Primer coloquio de la Facultad de Ciencias Biológicas del 2020, realizado el 23 y 24 de enero del 2010, Puebla, Puebla.