



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE PUEBLA**

---

---



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA GENERAL**

**TESIS:**

**OBTENCIÓN DE GLUCOMANANO A PARTIR DE *Opuntia joconostle* PARA  
EVALUAR EL EFECTO CICATRIZANTE CON Y SIN MATERIALES INORGÁNICOS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:**

**pQFB SANDRA GISELL CASTRO MORA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. EDUARDO BRAMBILA COLOMBRES**

*Depto. de Química Clínica FCQ*

**ASESOR DE TESIS:**

**Dr. ALFONSO DANIEL DÍAZ FONSECA**

*Depto. de Farmacia FCQ*

**ASESOR DE TESIS:**

**Ph. Dr. JOSÉ ALBINO MORENO RODRIGUEZ**

*Depto. de Química General FCQ*

**ENERO 2018**

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
<b>I ANTECEDENTES</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 Generalidades del Xoconostle</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1.2 Composición nutricional</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1.3 Usos del Xoconostle</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2 Opuntia joconostle</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2.1 Descripción de la especie</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2.2 El papel del xoconostle en la Cicatrización</b> .....	<b>13</b>
<b>1.3 Glucomanano</b> .....	<b>14</b>
<b>1.3.1 Efecto del glucomanano en la piel</b> .....	<b>15</b>
<b>1.4 Generalidades de la Piel</b> .....	<b>15</b>
<b>1.5 Definición de la Herida</b> .....	<b>18</b>
<b>1.6 Cicatrización</b> .....	<b>18</b>
<b>1.6.1 Reparación tisular</b> .....	<b>20</b>
<b>1.6.2 Formación de Cicatrices</b> .....	<b>21</b>
<b>1.6.3 Modelos animales utilizados para cicatrización</b> .....	<b>22</b>
<b>1.6.4 Tratamientos actuales para la cicatrización</b> .....	<b>27</b>
<b>1.6.4.1 Fármacos</b> .....	<b>27</b>
<b>1.6.4.2 Tratamientos no farmacológicos</b> .....	<b>31</b>
<b>1.6.4.3 Compuestos derivados de plantas</b> .....	<b>33</b>
<b>1.6.4.4 Productos derivados de animales</b> .....	<b>35</b>
<b>1.6.4.5 Organismos vivos</b> .....	<b>35</b>
<b>1.6.4.6 Usos tradicionales de minerales</b> .....	<b>36</b>
<b>1.7 Regeneración</b> .....	<b>37</b>

1.8 Generalidades del ZnO .....	38
1.8.1 Fisiología del Zn y su papel en la salud .....	38
1.9 Metodologías Farmacológicas y el restablecimiento epitelial .....	39
1.10 La nanotecnología en la Farmacología .....	41
1.10.1 Los nanomateriales como elección de encapsulamiento .....	42
1.10.2 Método Sol-Gel .....	43
II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	45
III JUSTIFICACIÓN .....	46
IV HIPÓTESIS .....	47
V OBJETIVOS .....	47
VI MÉTODO CIENTIFICO .....	49
6.1 Obtención de GM a partir de pulpa y cascara de xoconostle.....	49
6.1.1 Extracción y purificación de GM.....	49
6.1.2 Ensayo colorimétrico 3,5 DNS .....	50
6.2 Caracterización .....	51
6.2.1 CCF .....	51
6.2.2 FTIR .....	51
6.2.3 Espectrometria de masas .....	52
6.3 Síntesis de nanomatrices PGM-ZnO Y CGM-ZnO.....	52
6.4 Caracterización PGM-ZnO Y CGM-ZnO .....	53
6.4.1 FTIR PGM-ZnO Y CGM-ZnO.....	53
6.4.2 SEM PGM-ZnO Y CGM-ZnO .....	53
6.4.3 DRX PGM-ZnO Y CGM-ZnO .....	53
6.5 Preparación de la Forma farmacéutica: Ungüento cetílico .....	54
6.6 Evaluación de la actividad cicatrizante .....	55

6.6.1 Protocolo de administración .....	55
6.6.2 Técnicas Histológicas .....	57
6.6.3 Tinciones .....	57
<b>VII RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOMATRICES DE GM-ZnO Y GM .....</b>	<b>58</b>
7.1 Extracción de PGM Y CGM .....	58
7.2 Ensayo colorimétrico 3,5 DNS .....	59
7.3 CCF .....	60
7.4 MS.....	61
7.5 FTIR .....	64
7.6 SEM .....	68
7.7 EDS .....	72
7.8 DRX .....	75
<b>VIII RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LAS NANOMATRICES DE GM-ZnO Y GM EN UN MODELO DE RATA NUDE .....</b>	<b>79</b>
8.1 Evaluación cuantitativa de cierre por segunda intención .....	79
<b>IX DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>88</b>
<b>X CONCLUSIONES .....</b>	<b>99</b>
<b>XI BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>100</b>

*“La ciencia no es solo una disciplina de razón, sino también de romance y pasión”*

*Stephen Hawking*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer a mis padres por la oportunidad tan grande que me brindaron para que yo pudiera continuar con mis estudios universitarios. A mi mamita Lluvia por confiar en mí siempre y motivarme continuamente para ser mejor persona, por sus consejos, por todos sus abrazos y besos de despedida cada fin de semana antes de nuestra despedida. A mi papito Rene por ser mi mayor ejemplo en la vida, por enseñarme a nunca rendirme, por enseñarme el sentido de la vida y por creer en mí siempre. Gracias por todo su esfuerzo y sacrificios que tuvieron que hacer, los amo.

A mis hermanas Lluvita y Reny por comprenderme en mis momentos de estrés, por motivarme, por ser mi razón para luchar cada día, aunque no las veía mucho y aunque me perdí demasiados momentos con ustedes siempre las llevaba en el corazón; cada vez que quería rendirme ustedes eran mi mayor inspiración. Gracias por amarme tanto como yo las amo.

A mi ángel de la guarda, mi abuelito beto, mi querido viejo gracias por ser la persona que confió en mi todo el tiempo, gracias por estar siempre orgulloso de mi, lamentablemente hoy no estás conmigo pero te dedico todos y cada uno de mis logros. Siempre te llevo en el corazón. Te amo.

Al amor de mi vida Rafita, gracias por aparecer en mi vida y brindarme tu apoyo incondicional, sabes que sin ti mi tesis no hubiera quedado tan chida, gracias por pasar conmigo horas en el laboratorio. Por no dejarme rendir, por tus consejos, por tus enseñanzas, por tu compañía, por tu amor, por estar siempre en todo momento. Te amo amor.

A mis mejores amigas. Luz mi amiga del alma gracias por todos los momentos que pasamos juntas en la universidad y fuera de, gracias por convertirte en mi hermana y enseñarme tantas cosas. Admiro tu fuerza y tenacidad he aprendido tanto de ti. Gracias por el apoyo que me brindas, te amo bffa. Jenny mi segundo angelito te agradezco por todos los momentos que pasamos juntas, te hecho tanto de menos, nos haces falta. Te llevo en mi corazón.

También agradezco a todos aquellos que me ayudaron en este trabajo de tesis, al Dr. Samuel por confiar en mí, por todos los conocimientos que me brindó y por su tiempo gracias. Al Dr. Alfonso por su tiempo, por su apoyo y sus consejos gracias. Al Dr. Albino por brindarme su confianza y permitirme trabajar en su laboratorio.

A mi comisión revisora Dr. Ulises, Dr. Efraín y al Dr. Eduardo por tomarse un tiempo y aconsejarme para hacer mi trabajo más ameno.

A todos aquellos que hicieron esto posible, Gracias.

## Abreviaturas

<b>GM</b>	Glucomanano
<b>DRX</b>	Difracción de rayos x
<b>SEM</b>	Microscopía Electrónica de Barrido
<b>EDS</b>	Espectroscopía de Energía Dispersa
<b>FTIR</b>	Espectroscopia Infrarroja
<b>MS</b>	Espectrometría de Masas
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa Fina
<b>PC</b>	Pomada de la Campana
<b>ZnO</b>	Óxido de Zinc

# OBTENCIÓN DE GLUCOMANANO A PARTIR DE *Opuntia joconostle* PARA EVALUAR EL EFECTO CICATRIZANTE CON Y SIN MATERIALES INORGÁNICOS

## INTRODUCCIÓN

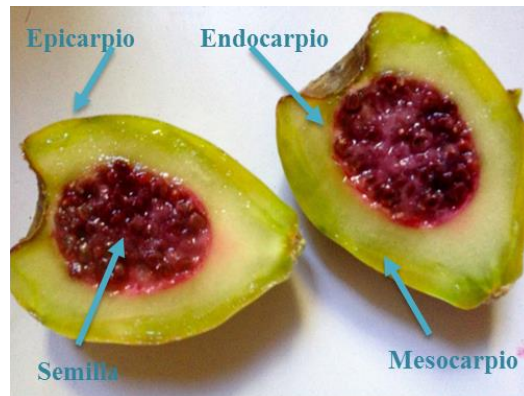
La Familia *Cactaceae* es una de las plantas más notables que caracterizan el paisaje de las zonas áridas de México, a lo largo del tiempo han jugado un papel importante en el desarrollo de las culturas siendo utilizadas como fuente de alimento, bebida y medicina.[1] Dentro de las cactáceas el género *Opuntia* es el más diverso y ampliamente distribuido en América, en donde se considera a México centro del origen y diversificación; la principal característica de este género es el segmento o cladodio, el cual, aunque posee apariencia de hoja carnosa, es realmente un tallo con plena capacidad de emitir ramas, hojas y flores. Otra característica de las *Opuntia* es que poseen gloquidios en las areolas, estos son unas diminutas y delgadísimas espinillas que nacen formando un cojincillo en las areolas de los segmentos e incluso en las del ovario de las flores. Las flores de las *Opuntia* suelen ser espectaculares, muy abiertas, con pétalos satinados y de colores que pueden ser de color amarillo, anaranjado, rojo y hasta purpúreo [1]. El género *Opuntia* produce frutos dulces (tunas) y/o ácidos (xoconostles) [2], en este trabajo se hablará específicamente del fruto xoconostle.

## I. ANTECEDENTES

### 1.1 Generalidades del Xoconostle

El término xoconostle se deriva del náhuatl *xococ*, que significa ácido, y *nochtli*, que significa tuna [1]. Del fruto del xoconostle lo que se consume principalmente es la cáscara, que presenta un grosor de 1-1.3 mm. Este se encuentra constituido por el epicarpio que comprende la piel y los tejidos distantes; el mesocarpio y

endocarpio que son la pulpa, y las semillas que se encuentran unidas y compactadas firmemente por un compuesto mucilaginoso (Fig.1) [1, 3, 4].



**Fig.1** Partes del fruto Xoconostle. Tomado de: Scheinvar, L. (1981). *Especies, variedades y combinaciones nuevas de Cactáceas del Valle de México*. *Phytologia* 49 (4): 324-328 [6].

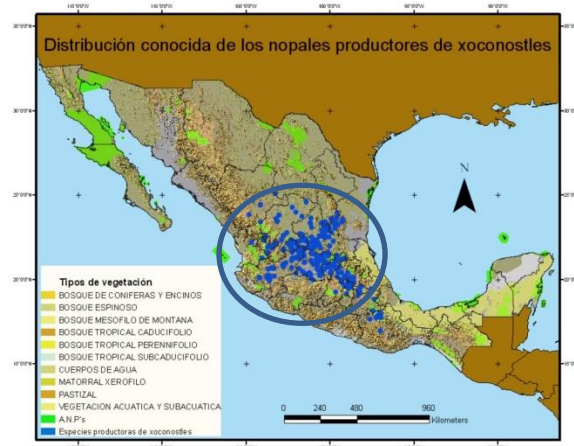
El xoconostle se conserva por varios meses en la planta sin sufrir deterioro, e incluso se conserva por varias semanas en lugares frescos y secos, sin perder sus propiedades de sabor, color y humedad. Se desarrolla principalmente en zonas áridas y semiáridas, y demanda cantidades muy bajas de agua. La planta de xoconostle tolera la sequía, debido a que presenta adaptaciones fisiológicas tales como la apertura de estomas durante la noche para evitar la transpiración por las altas temperaturas que suelen presentarse en zonas áridas y semiáridas en donde crecen. Las pencas están recubiertas por una capa cerosa, lo que le protege de la pérdida de agua, además la planta es capaz de almacenar grandes cantidades de agua, debido a que durante las escasas lluvias tiende a extender sus raíces para absorber y almacenar agua que le permita resistir los climas extremos [5].

Existen muchas especies productoras de xoconostle, oficialmente se reconocen 19 todas endémicas de México como se muestra en la Tabla 1 [6]

**Tabla 1.** 19 Especies de xoconostle reconocidas en México. Tomado de: Scheinvar, L. (1981). *Especies, variedades y combinaciones nuevas de Cactáceas del Valle de México. Phytologia 49 (4): 324-328 [6].*

<i>O. chavena</i> Griffiths	<i>O. matudae</i> Scheinvar
<i>O. chiangiana</i> Scheinvar & Manzanero	<i>O. oligacantha</i> Pfeiff
<i>O. durangensis</i> Britton & Rose	<i>O. olmeca</i> Pérez, Reyes y Brachet
<i>O. elizondoana</i> E.Sánchez & Villaseñor	<i>O. scheeri</i> F.A.C.Weber
<i>O. guilanchi</i> Griffiths	<i>O. spinulifera</i> Salm-Dyck
<i>O. heliabravoana</i> Scheinvar	<i>O. tehuacana</i> Arias y Guzmán
<i>O. joconostle</i> F.A.C.Weber	<i>O. zamudioi</i> Scheinvar
<i>O. leucotricha</i> Salm-Dyck	<i>O. gallegiana</i> Scheinvar & Olalde
<i>O. tezontepecana</i> Gallegos & Scheinvar	<i>O. sainaltensii</i> Gallegos, Scheinvar y Olalde
<i>O. excelsa</i> Sánchez-Mej.	

En cuanto a su distribución la mayor concentración de xoconostle se encuentra en zonas áridas y semiáridas del desierto chihuahuense y en la zona semiárida de Tehuacán-Cuicatlán (Fig.2). En Zacatecas, en la localidad Sain Alto aún se encuentran restos fragmentados del Gran Tunal, curiosamente formados por aproximadamente 20 especies productoras de xoconostles.



**Fig. 2** Distribución de las especies de *Opuntia* productoras de xoconostle. Tomado de: Scheinvar, L. (1981). *Especies, variedades y combinaciones nuevas de Cactáceas del Valle de México. Phytologia 49 (4): 324-328 [6].*

### 1.1.2 Composición Nutricional

En cuanto a su composición nutricional, un estudio realizado en dos especies productoras de xoconostle nos muestra que la pulpa se caracteriza por un contenido apreciable de carbohidratos digeribles; mientras que las semillas tienen un predominio significativo de compuestos no digeribles, proteínas, grasas y un porcentaje de cenizas (Tabla 2). Una de las principales características de esta fruta es su sabor amargo [7] y su bajo contenido de azúcares solubles en comparación con otros frutos de *Opuntia* [8], o con otras frutas convencionales. Este fruto también presenta componentes con propiedades antioxidantes como se describe en la tabla 3.

**Tabla 2** Composición nutricional del Xoconostle<sup>A</sup>. Tomado y modificado de: Morales, P., et al. (2012). Nutritional and antioxidant properties of pul and seeds of two xoconostle cultivars (*Opuntia joconostle* F.A.C weber ex Diguét and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico. Volumen 46, Número 1, 279-285 [11].

Parámetros nutricionales	<i>Opuntia joconostle</i> , cv. Cuaresmeño		<i>Opuntia matudae</i> , cv. Rosa	
	pulpa	semillas	pulpa	Semillas
Humedad	93.24±0.02	73.95 ± 1.09	94.11 ± 0.00	60.44 ± 0.66
Proteínas	0.66±0.01	2.12±0.00	0.56 ± 0.00	3.45 ± 0.02
Grasa	0.03 ± 0.0	2.45 ± 0.05	0.04 ± 0.00	3.52 ± 0.12
Carbohidratos totales disponibles <sup>B</sup>	3.69	1.71	3.93	1.56
Azúcares solubles	2.02 ± 0.09	0.95 ± 0.09	1.56 ± 0.17	1.47 ± 0.19
Fructosa	1.38 ± 0.03	0.71 ± 0.07	0.87 ± 0.03	0.99 ± 0.12
Glucosa	0.37 ± 0.05	0.15 ± 0.01	0.35 ± 0.13	0.34 ± 0.05
Sacarosa	0.27 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.34 ± 0.01	0.14 ± 0.02
Fibra dietética total	2.31 ± 0.12	19.22 ± 0.15	1.74 ± 0.07	30.17 ± 0.64
Fibra insoluble	1.45 ± 0.07	18.85 ± 0.12	1.16 ± 0.01	29.04 ± 0.57
Fibra soluble	0.86 ± 0.05	0.36 ± 0.03	0.58 ± 0.07	1.13 ± 0.07
Cenizas	0.07 ± 0.00	0.54 ± 0.01	0.11 ± 0.00	0.85 ± 0.04

<sup>A</sup> Los resultados se expresaron como g / 100 g de peso fresco (fw). Media ± SD, n = 3. En cada fila, las diferentes letras indican una diferencia estadísticamente significativa (p = 0.05).

<sup>B</sup> El total de carbohidratos disponibles se calculan como la diferencia de los valores de humedad, proteína, grasa, cenizas y fibra [9].

**Tabla 3** Compuestos y propiedades antioxidantes del xoconostle. Tomado y modificado de: Morales, P., et al. (2012). Nutritional and antioxidant properties of pul and seeds of two xoconostle cultivars (*Opuntia joconostle* F.A.C weber ex Diguet and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico. Volumen 46, Número 1, 279-285 [11].

Compuesto antioxidante	<i>Opuntia joconostle</i> , cv. Cuaresmeño		<i>Opuntia matudae</i> , cv. Rosa	
	Pulpa	Semillas	Pulpa	Semillas
Ácido ascórbico <sup>A</sup>	20.63 ± 0.32	No reportado	31.67 ± 0.67	No reportado
Tocoferoles totales <sup>A</sup>	0.22 ± 0.01	3.23 ± 0.18	0.14 ± 0.00	6.71 ± 0.38
α-tocoferol <sup>A</sup>	0.16 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.00	0.19 ± 0.01
β-tocoferol <sup>A</sup>	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	Trazas	0.02 ± 0.00
γ-tocoferol <sup>A</sup>	0.05 ± 0.00	3.07 ± 0.15	0.03 ± 0.00	6.43 ± 0.37
δ-tocoferol <sup>A</sup>	Trazas	0.06 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.08 ± 0.00
Fenoles totales <sup>B</sup>	38.57 ± 6.87	50.43 ± 4.86	33.71 ± 2.09	59.48 ± 0.69
Flavonoides totales <sup>C</sup>	3.93 ± 0.19	24.18 ± 1.69	0.86 ± 0.9	58.40 ± 0.78

Media ± SD, n = 3. En cada fila, las diferentes letras significan una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ).

Trazas ( $\leq 0.005$  mg / 100 g de peso fresco).

<sup>A</sup> Los resultados se expresaron como mg / 100 g de peso fresco (fw).

<sup>B</sup> Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) / g de extracto.

<sup>C</sup> Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de catequina (CE) / g de extracto.

### 1.1.3 Usos del Xoconostle

El fruto de xoconostle dado sus características organolépticas es consumido como fruto fresco, como un vegetal en ensaladas y salsas, como un ingrediente principal en postres, secado en hojas como un aperitivo, en bebidas alcohólicas y es muy frecuente que se añada a sopas para mejorar el sabor [12]. A pequeña escala es procesado en la industria alimentaria como jalea, fruta completa en almíbar, en salsas y licores, entre otros productos alimentarios [13].

Respecto a la medicina tradicional este fruto se usa como un remedio para la tos, utilizado también para combatir la diabetes y la presión arterial, como un laxante.

En algunas poblaciones ocupan al xoconostle para mitigar la molestia de la gripa, reblandecer tumores y curar contusiones [14, 15, 16].

## 1.2 *Opuntia joconostle*

**Tabla 4** Información

Taxonómica. [17]

Reino	<i>Plantae</i>
Phylum	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Caryophyllales</i>
Familia	<i>Cactaceae</i>
Género	<i>Opuntia</i>
Epíteto específico	<i>joconostle</i>
Nombre Científico	<i>Opuntia joconostle</i> F. A. C. Weber ex Diguet
Autor del nombre	F. A. C. Weber ex Diguet
Determinador	R. Bárcenas



### 1.2.1 Descripción de la especie

**Arbustiva**, hasta 2.5 m de altura, ramificación compacta y frondosa, **Tronco** erecto, cilíndrico, cerca de 20 cm de ancho, grisáceo. **Cladodios** obovados, de 18– 28 x 11.5-18.5 cm y 1.5 cm de espesor, mate, verdes glaucos claros, recubiertos de una capa cerosa. **Aréolas**, dispuestas en 7-9 (-10) series, ligeramente elevadas angostamente piriformes, de 2-3 x 1-2 mm, con fieltro corto, de color negruzco. **Glóquidas** amarillas, cortas, dispuestas en la parte central de la aréola. **Espinas** blancas, a veces ausentes, en toda la penca y a veces 1, 2 o 3, en pocas aréolas, cortas, rígidas, desiguales, de 7 mm de largo, blancas con el ápice ambarino. **Epidermis** brillante glabra. **Cladodios juveniles** con aréolas

prominentes, con fieltro de color marrón grisáceo claro y hoja basal refleja, de color verde claro con la punta rosada a rojiza. **Flores** amarillas, de 6.5 cm de largo. **Pericarpelo** obovado, de 3.8 x 2.3 cm, con 8 series de aréolas, distantes 3 mm entre sí, con escama basal crasa.; segmentos exteriores del perianto con el ápice acuminado y bordes dentados, amarillo verdosos con amplia estría mediana, purpúrea; segmentos interiores de color amarillo claro; estambres alcanzan 1/3 inferior del perianto, filamentos y anteras blancos; estilo cuneiforme, de 2 cm de largo, blanco pero rosado en la parte superior, lóbulos del estigma 5, papilosos, de 4 mm de largo, amarillo claro verdosos con estría mediana rosada. **Frutos** subglobosos, de 2- 4, (5.5) cm de diámetro, con cicatriz floral hundida; cáscara blanco verdosa, a veces moteada de rosa, superficie con 6 series de espirales de aréolas muy chicas, anchamente piriformes, distantes 1 cm entre sí y 1.5 cm entre las series, sin espinas, con lana marrón, la pulpa muy ácida, rosada, con la cámara ovárica de 2 x 3 cm, ligeramente perfumada, funículos secos. **Semillas** rosadas, anguladas, de 1.5 mm de diámetro, arilo lateral ancho, taza del hilo lateral subbasal [1].

### 1.2.2 El papel de Xoconostle en la Cicatrización

Como ya se mencionó, las distintas especies productoras de xoconostle contienen un porcentaje apreciable de carbohidratos [11], tomando esto en cuenta se puede relacionar un posible efecto de este fruto sobre el proceso de cicatrización; debido a que aunque los carbohidratos son la principal fuente de energía y fibra dietética para el hombre, son también componentes clave del sistema inmunológico ya que promueven el reconocimiento de las células, adhesión, migración y proliferación [26]. Existen carbohidratos específicos que se asocian con la salud de la piel y la curación de heridas [27]. Entre estos carbohidratos se encuentra el glucomanano del cual se prestó principal atención dado que se encuentra como uno de los componentes principales de cicatrización del *Aloe vera* [91], una de las plantas más reconocidas por dicha propiedad.

### 1.3 Glucomanano

El glucomanano Konjac (KGM) es una molécula soluble en agua con un alto peso molecular, extraído de tubérculos de la planta *Amorphophallus konjac*, su fórmula molecular es  $C_{24}H_{42}O_{21}$  y su peso molecular de 666.57768 g/mol. Es considerado un copolímero aleatorio lineal constituido por los monómeros D-glucosa y D-manosa unidos mediante enlaces  $\beta,1-4$ . Las unidades de manosa y glucosa están en una relación molar de 1,6: 1 con un bajo grado de grupos acetilo (aproximadamente 1 grupo acetilo por 17 residuos) en la posición C-6 [18]. En comparación con otras fibras dietéticas, tiene la más alta viscosidad y el peso molecular, que van de 200.000 a 2.000.000 Da, esto varía con el origen, el método de procesamiento y el tiempo de almacenamiento [19].

El glucomanano se utiliza comúnmente en los alimentos, bebidas y cosméticos por sus propiedades gelificantes. Ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) desde 1994 como aditivo alimentario y desde 1996 como aglutinante en productos cárnicos [19]. También se ha investigado por sus efectos sobre la reducción de peso, diabetes, estreñimiento, colesterol, cáncer de pulmón, y enfermedades atópicas, así como su uso como un prebiótico. Sin embargo, hay una falta de ensayos clínicos de tamaño adecuado para apoyar todos estos usos. Este polisacárido puede ser muy prometedor con respecto a los sistemas de administración de fármacos específicos de colon. Algunos estudios indican que el glucomanano puede ser un agente terapéutico adyuvante seguro y fácilmente tolerado en el tratamiento de la tirotoxicosis [20,22, 23,24].

Otra aplicación del glucomanano es su capacidad de acelerar el proceso de cicatrización en heridas, la cual se describirá más adelante.

Dado el riesgo de obstrucción esofágica y gástrica, no se recomienda su consumo en pacientes con anomalías estructurales del esófago o el intestino. Debido a la capacidad potencial de glucomanano para reducir la glucemia, se debe tener precaución en pacientes tratados con agentes hipoglucémicos, insulina o medicinas alternativas que podrían potencializar más los bajos niveles de glucosa.

Además, el glucomanano puede reducir la biodisponibilidad de otros medicamentos orales. Por lo tanto, se recomienda tomar otros medicamentos 1 hora antes o 4 horas después de la administración de glucomanano [21].

### **1.3.1 Efecto del Glucomanano en la piel**

Existen muchos factores que juegan un papel importante con respecto a la salud de la piel, entre estos están los regímenes de higiene personal, el estado nutricional, la exposición a la radiación, drogas, el tabaquismo y la hipoxia [25].

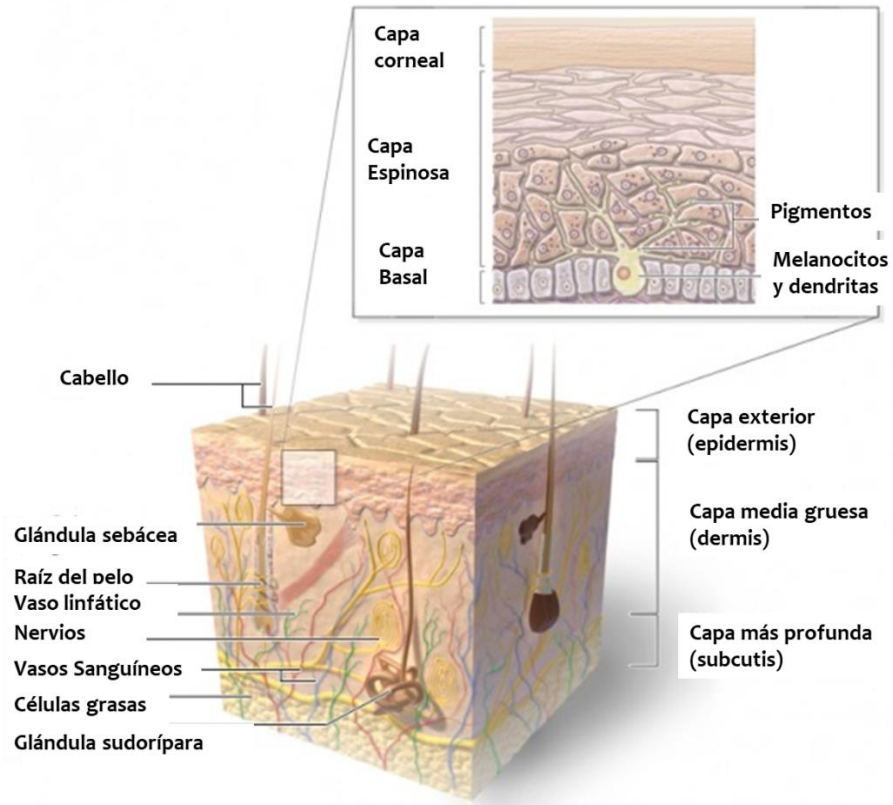
El Glucomanano se ha reportado que promueve la acumulación de los fibroblastos y estimula la producción de colágeno en las heridas de piel [28,29]. Del mismo modo, Shahbuddin, Bullock, MacNeil, y Rimmer (2014) informaron que el glucomanano konjac tiene la capacidad de estimular metabolitos de fibroblastos y la migración tanto de fibroblastos como queratinocitos [30,31].

### **1.4 Generalidades de la Piel**

La piel es uno de los órganos más grandes y más pesados de nuestro cuerpo. Dependiendo del tamaño corporal y la masa, pesa entre 3.5 y 7.5 kilos y mide de 1,5 a 2 m<sup>2</sup>.

La piel protege al cuerpo de los factores ambientales nocivos, tales como la humedad, el frío y la luz del sol, además de gérmenes y sustancias nocivas. Desempeña un papel importante en la regulación de la temperatura corporal. Es a través de nuestra piel que recogemos la información sensorial [33].

También la piel sintetiza sustancias químicas importantes como la melanina y los carotenos, que dan a la piel su color. Metaboliza la vitamina D cuando se expone a la luz solar, la cual es importante para la adsorción de calcio y el desarrollo de los huesos.



**Fig. 3.** Estructura de la Piel. Tomado y modificado de: *Informed Health Online [Internet]. Cologne, Germany: Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2006-. How does the skin work? 2009 Sep 28 [32].*

La piel se compone de tres capas: la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo. La capa visible externa de la piel se llama epidermis (Fig.3).

La epidermis es delgada y altamente estratificada, compuesta principalmente de queratinocitos y melanocitos en la capa epidérmica inferior. Las células llamadas melanocitos producen y almacenan el pigmento llamado melanina. Cuando estamos en el sol, los melanocitos producen más melanina, esto hace que nuestra piel sea más oscura. De esta forma la melanina nos protege de los rayos UV del sol.

Se subdivide en 4 capas: estrato córneo, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal. La capa más externa de la epidermis proporciona la barrera física y está compuesta principalmente de queratinocitos muertos, mientras que la

queratina y los desmosomas por debajo soportan físicamente la integridad de la epidermis [34]. La epidermis está en una constante auto-renovación, por lo que se le considera un tejido dinámico, en el que la pérdida de las células de la superficie de la capa córnea (descamación) se equilibra con el crecimiento celular en la epidermis inferior.

Al salir de la capa basal, los queratinocitos empiezan a diferenciarse y durante la migración a través del estrato espinoso y estrato granuloso se someten a una serie de cambios en su estructura y composición. Los queratinocitos sintetizan y expresan numerosas proteínas estructurales y lípidos durante su maduración. El último paso de diferenciación de los queratinocitos está asociado con cambios en su estructura lo que resulta en su transformación a corneocitos. Los corneocitos son células muertas planas llenas de filamentos, queratina y agua, que están rodeados por una capa densamente reticulada de proteína [35].

Por otro lado, la dermis (la capa interior gruesa de la piel) se compone de fibras resistentes y elásticas de elastina y colágeno que están llenas de un fluido viscoso compuesto de glicosaminoglicanos y hialuronano. Con ello se garantiza que la piel sea fuerte y estable, pero también elástica; esta capa es relativamente acelular y está compuesta de matriz extracelular que es producida y mantenida por los fibroblastos, que son el principal tipo de células en la dermis.

La dermis contiene una disposición vascular compleja de vasos sanguíneos y estructuras anexas con origen en los folículos pilosos, glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas. También tiene abundantes células endoteliales que son importantes para la angiogénesis y el mantenimiento de los vasos sanguíneos, células hematopoyéticas como los macrófagos y los linfocitos, células musculares lisas, adipocitos, neuronas sensoriales y células de las glándulas sudoríparas. Estas células en colaboración ayudan a mantener la homeostasis de la piel.

Otro componente importante de la piel es el tejido subcutáneo, el cual se compone principalmente de grasa y tejido conectivo. La grasa en esta porción del tejido actúa como un amortiguador y protector de los huesos o articulaciones de

los golpes externos o protuberancias. La dermis y el tejido subcutáneo también tienen vasos sanguíneos y linfáticos, además de enervación, glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas y glándulas odoríferas, así como las raíces de la cabeza y el pelo del cuerpo.

La piel al ser un tejido de protección está expuesta todo el tiempo a situaciones que pueden generar heridas, ya sea por accidentes, caídas, golpes, quemaduras, armas, entre otras causas. Estas lesiones pueden ser menores o severas y poner en peligro la vida.

### **1.5 Definición de herida**

Una herida es un tipo de lesión en la que se rasga la integridad epitelial y con esto se causa una interrupción en la estructura de la piel y la función del tejido normal subyacente. Las heridas se dividen en dos categorías, heridas abiertas y cerradas. Hay varios tipos de heridas abiertas, tales como la incisión, abrasión, laceración, y heridas de penetración. Una herida cerrada sucede cuando existe un fuerte traumatismo y provoca daños en la estructura de la piel. Una herida cerrada es tan peligrosa como una herida abierta. Se pueden clasificar como contusión, hematomas, lesiones por aplastamiento y heridas crónicas y agudas [92].

Cuando un individuo presenta una herida, una serie de eventos bioquímicos complejos se presenta para reparar el tejido dañado. Este proceso se denomina cicatrización que se presenta en los seres vivos para regenerar el tejido epidérmico y dérmico.

### **1.6 Cicatrización**

La cicatrización es un proceso dinámico mediado por proteínas solubles (citocinas y factores de crecimiento) y células encargadas de la proliferación celular para el restablecimiento del tejido lesionado [42]. Hay dos tipos de cicatrización, de primera intención, que ocurre durante las primeras 12-24 horas después de haber sido cerrada la herida, al aproximar sus bordes con suturas, cintas, o algún

dispositivo mecánico. El segundo tipo, de segunda intención, el cual se caracteriza porque no se alcanza a regenerar la arquitectura normal de la piel, debido a la pérdida extensiva de tejido por un trauma severo o una quemadura, y cuyo tiempo de resolución dependerá de la extensión de la herida [43].

Una serie de factores pueden causar un retraso en la cicatrización de heridas incluyendo insuficiencia venosa o arterial, diabetes, enfermedad renal, trauma, edad avanzada y efectos de presión local. Los factores locales como hipoxia tisular, isquemia, cuerpos extraños, maceración de tejidos, exudados, infección, la interrupción de la regulación del proceso inflamatorio, y factores sistémicos incluyendo el estado nutricional o el sistema inmune comprometido pueden alterar la cicatrización (Fig.4) [47].

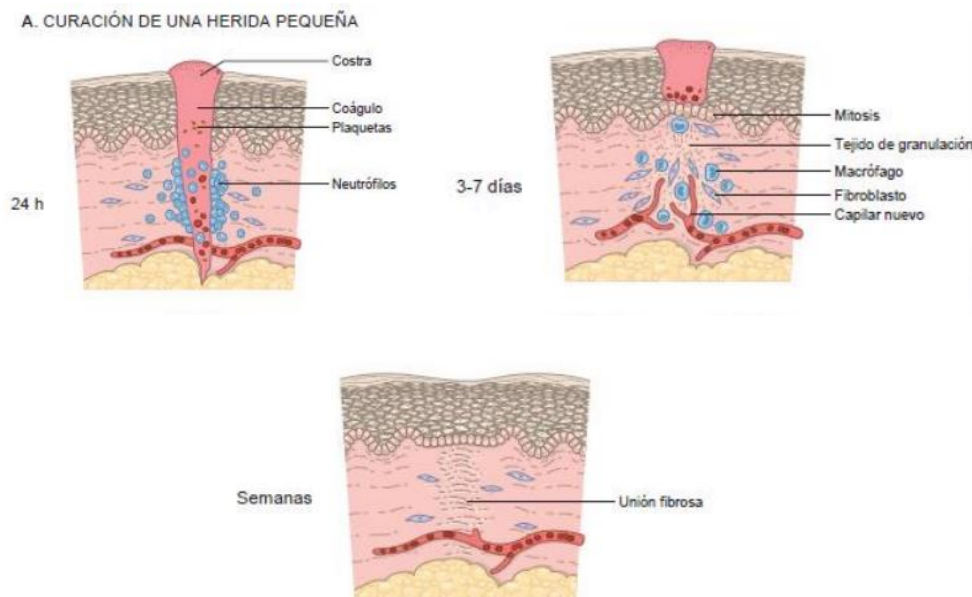


**Fig.4** Fases de la cicatrización de heridas y calendario general que sigue la curación. Tomado y modificado de: *Adv Wound Care* (2014) Jan 1;3(1):46-53. [46].

La piel es un tejido complejo, y por lo tanto una herida ocasiona daños a muchas estructuras, las capas celulares y linajes, incluyendo la capa epidérmica de queratinocitos, junto con apéndices epidérmicos asociados tales como folículos pilosos y glándulas sudoríparas; la membrana basal (BM) que subyace en la epidermis; y la dermis, que es una estructura compleja que consiste en fibroblastos, matriz extracelular (ECM), nervios y vasos sanguíneos y linfáticos.

Particularmente, la piel humana tiene una de las mayores habilidades para regenerarse en comparación con otros tejidos en nuestro cuerpo. El proceso de cicatrización normal comienza tan pronto como el tejido se lesiona donde los componentes sanguíneos entran en contacto con el colágeno y ECM en el sitio de la lesión, liberando factores de coagulación y crecimiento (Fig.5).

Un número considerable de diferentes linajes de células juegan un papel clave durante las diversas fases superpuestas del proceso de reparación (la respuesta inmediata; la respuesta inflamatoria; la fase de proliferación, la migración y contracción, y la fase de resolución) [43].



**Fig. 5** Proceso de cicatrización en una herida pequeña. Tomado de: Ramirez Ramirez Hector. (2015). *Regeneración, reparación y cicatrización* [Figura]. Recuperado de ResearchGate [44].

### 1.6.1 Reparación Tisular

La reparación tisular es un proceso por el cual nuevos tejidos reemplazan a los tejidos que fueron lesionados. Un tejido puede repararse siempre y cuando su tejido conectivo o el mismo tejido puedan producir células que reemplacen a las pérdidas durante la lesión e inflamación. En la cicatrización el tejido tendrá una respuesta linfoproliferativa que se encargará de reemplazar a las células en los

tejidos incapaces de regenerarse, mientras que en la reparación se lleva a cabo por el depósito continuo de matriz extra celular (ECM). Si la lesión persiste y la inflamación se vuelve crónica, la lesión y la reparación tisular se producirán de modo simultáneo provocando de esta forma un depósito anormal de ECM y consecuentemente una fibrosis [37, 38, 39].

### **1.6.2 Formación de cicatrices**

Una cicatriz se genera a partir del depósito de matriz extracelular en el tejido donde se generó la lesión, el cual no tendrá la capacidad de regenerarse por sí solo en respuesta a inflamación crónica, después de la cual existirá proliferación y migración de células parenquimatosas del tejido conectivo con la formación casi simultánea de nuevos vasos sanguíneos para luego remodelar el tejido depositado, contrayéndolo [40,41].

De manera general la formación de cicatrices se divide en cuatro fases (Fig. 6) [37,40]:

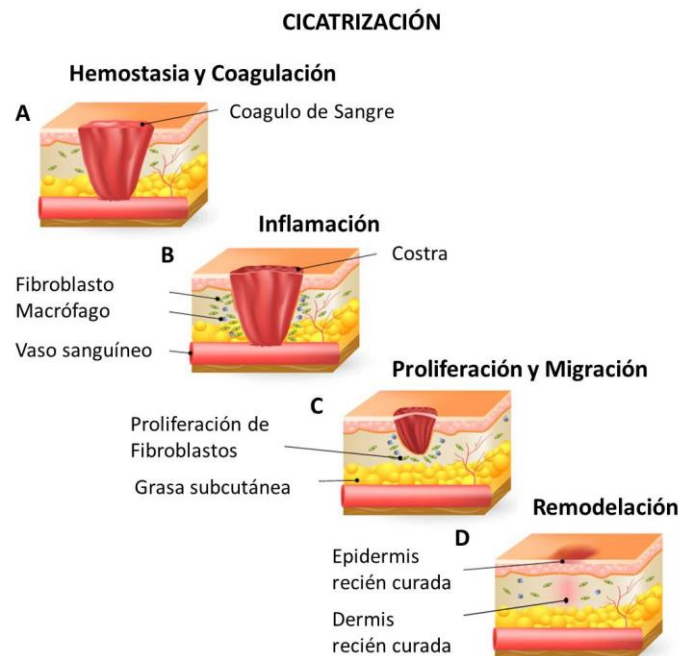
*Fase inflamatoria:* Al originarse la lesión existe una ruptura de los vasos sanguíneos de la zona lesionada y salida de los elementos formes de la sangre. Simultáneamente se produce vasodilatación que permitirá la llegada de células fagocíticas que eliminarán las células dañadas y además existirá una liberación de proteínas como la fibronectina, fibrinógeno y factores de crecimiento que permitirán el incremento y función de los fibroblastos.

*Fase de eliminación o lisis:* En esta fase las células fagocitarias eliminan todas las células que ya no tengan función debido al daño tisular.

*Deposición de ECM y formación de cicatriz:* Los fibroblastos sintetizan y depositan elementos de la ECM reponiendo el tejido perdido, que posteriormente se convertirá en una cicatriz compuesta por fibroblastos y colágeno.

*Remodelación tisular:* que tiene un periodo prolongado de 6 a 12 meses, en el cual se reorganizan las fibras colágenas desestructuradas y se reduce el número de

vasos sanguíneos formados, lográndose reducir el tamaño de la cicatriz y contraer la herida para brindarle mayor resistencia.



**Fig.6** Fases de la Cicatrización. A) La respuesta inmediata; B) la respuesta inflamatoria; C) fase de proliferación, migración y contracción; D) la fase de resolución. Tomado y modificado de Eming et al.(2014). Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med.* Dec 3; 6(265) [45].

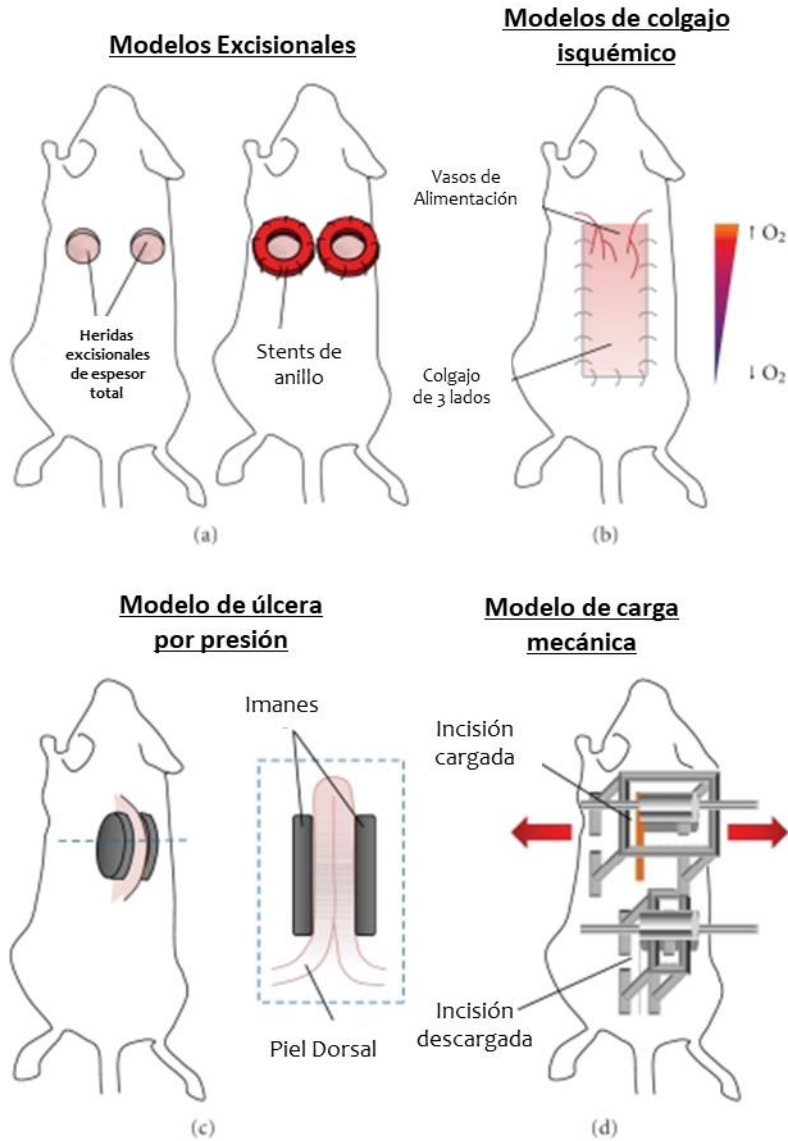
### 1.6.3 Modelos animales utilizados para la evaluación de la Cicatrización

Debido a las similitudes con la piel humana, los modelos de cicatrización en cerdos fueron utilizados en los primeros días para investigar los mecanismos de reparación [48], y siguen siendo un modelo popular para los ensayos preclínicos de terapias potenciales [49]. Sin embargo, por su mal comportamiento genético, anestesia complicada y procedimientos quirúrgicos, costos y problemas de vivienda han sido sustituidos por modelos de roedores, en su mayoría ratones, este modelo es predominante para investigar los mecanismos celulares y moleculares en la reparación de tejidos de mamíferos [103].

Las escisiones quirúrgicas y las incisiones de grosor total realizadas en la piel del tronco dorsal del ratón son las más populares. Dicho esto, numerosas variaciones en el diseño experimental son empleadas por diferentes grupos. Las heridas por escisión, por ejemplo, pueden ser hechas de muchas formas y tamaños diferentes, ya sea mediante biopsia por punción, tijeras quirúrgicas o láser / quemadura. Las heridas pueden dejarse abiertas (denominadas cicatrización por intención secundaria) o ser férreas, suturadas o vestidas. Las heridas por escisión vestidas con Tegaderm se sugieren para ayudar a la evaluación de la reepitelización de la herida [56], mientras que la cicatrización por intención secundaria implica una mayor contracción de la herida (Fig. 7).

El modelo de ratón más empleado para estudiar estos procesos es el modelo de herida por excisión. Típicamente, se crea una herida excisional de grosor total en el dorso del ratón y se extiende a través del *panniculus carnosus*. Las heridas son entonces fotografiadas regularmente y el cierre de la herida se calcula en base al tamaño de la herida con respecto a las dimensiones de la herida original [54].

Los beneficios de este modelo quirúrgico común son numerosos. Los materiales y técnicas necesarios son relativamente simples, reproducibles y prácticos para experimentos que implican un gran tamaño de muestra. Se puede acceder fácilmente al lecho de la herida para aplicar agentes tópicos (por ejemplo, productos farmacéuticos, células, biomateriales) para estudiar las modulaciones de los procesos de reparación. Las heridas de esta naturaleza suelen cicatrizar mediante re-epitelización, reconstitución dérmica y contracción de la herida, permitiendo un análisis de cualquier fase de cicatrización o de todo el proceso de cicatrización. Las heridas recolectadas se pueden examinar histológicamente tanto para el espacio epitelial como para las características del lecho de granulación [55].



**Fig. 7** Modelos quirúrgicos de enfermedades cutáneas en ratones. (a) Los modelos de heridas excisionales de espesor total. La contracción del panniculus carnosus subyacente se puede minimizar con un modelo de herida con hendidura (derecha), por lo que la reparación de la herida procede principalmente a través de la formación de tejido de granulación y la re-epitelización similar a la reparación de la piel humana. (b) El modelo de colgajo isquémico produce un gradiente controlado de isquemia basado en el número y localización de los vasos sanguíneos. (c) La presión cíclica puede ser aplicada con imanes opuestos y la piel interposicionada para imitar la reperfusión / lesión de isquemia pensada para impulsar la patofisiología de la úlcera de presión. (d) La aplicación de la carga mecánica exógena a las incisiones del ratón da como resultado un aumento de la fibrosis de la herida similar a la cicatrización humana. Tomada y modificada de: Wong

VW, et al. (2011). *Surgical Approaches to Create Murine Models of Human Wound Healing. Journal of Biomedicine and Biotechnology* [55].

Las heridas incisionales a menudo se suturan para simular una situación clínica que ocurre en el tejido. Los compuestos pueden ser suministrados localmente a la herida, aplicación vía tópica e inyección, incorporados en apósitos, o administrados sistemáticamente.

De igual forma se realizan experimentos *in vitro* los cuales abordan parcialmente la importancia de las interacciones paracrina entre diferentes poblaciones celulares de la piel [50], pero están limitados en su relevancia biológica para la cicatrización de heridas. El estudio del comportamiento celular en una placa de cultivo bidimensional ofrece la capacidad de investigar objetivos específicos con mínima interferencia de factores externos, pero no existen señales crónicas *in vivo*, (señalización paracrina, señales tridimensionales, etc.) por lo que se han limitado este tipo de estudios.

Se han desarrollado sistemas "organotípicos" cada vez más complejos para recapitular mejor el entorno nativo de la piel [51]. Estos "equivalentes de piel viva" son construcciones de ingeniería compuestas de células epiteliales escamosas estratificadas crecidas en una interfaz aire-líquido por encima de una matriz de tipo colágeno sembrada con fibroblastos dérmicos [52]. Estos modelos han mejorado considerablemente la capacidad de los investigadores para estudiar los mecanismos de alteraciones humanas (incluida la tumorigénesis y la reparación de heridas) en un sistema *in vitro* biológicamente más relevante [53]. No obstante, la complejidad de la cicatrización de heridas *in vivo* no puede recrearse completamente en una placa de cultivo, y los modelos animales son una herramienta necesaria para elucidar la patología subyacente de la enfermedad humana.

Sin embargo, existen algunas diferencias entre la piel de ratón y la piel humana (Tabla 1.4); aunque la piel del ratón consta de tres capas, como lo hace la piel

humana (es decir, epidermis, dermis, hipodermis), existen diferencias significativas en la anatomía y fisiología de cada capa.

**Tabla 4** Diferencias entre la piel de ratón y la piel humana. Tomada y modificada de: Wong VW, et al. (2011). *Surgical Approaches to Create Murine Models of Human Wound Healing. Journal of Biomedicine and Biotechnology* [55].

	Ratón	Humano
Ciclo del Cabello	Aproximadamente 3 semanas.	Altamente variable.
Arquitectura Epitelial	No hay crestas epiteliales.	Crestas epiteliales presentes.
Glándulas Sudoríparas apocrinas	Ausentes en la piel, presentes en las glándulas mamarias.	Presentes en regiones axilares, inguinales y perianales de la piel.
Propiedades Biomecánicas	Delgada, flexible, suelta.	Espesa, relativamente rígida, adherente a los tejidos subyacentes.
Espesor Hipodérmico	Dependiente del ciclo del cabello.	Menos variable.
Capa muscular Subcutánea	Presente en todo como <i>panniculosus carnosus</i> .	Presente solo en la región del cuello como platisma.
Método principal de cicatrización	Contracción.	Formación de tejido de granulación y reepitelización.

Las heridas murinas se curan de manera diferente a la humana, principalmente debido al proceso de contracción. Esto es en parte, debido a una capa extensa

subcutánea del músculo estriado llamada *panniculus carnosus* que está ausente en seres humanos. En los ratones, esta capa muscular permite que la piel se mueva independientemente de los músculos más profundos y es responsable de la rápida contracción de la piel después de la herida [55].

#### **1.6.4 Tratamientos actuales para la Cicatrización**

Aunque la piel humana tiene una capacidad natural para promover la auto-regeneración después del daño, esta capacidad puede verse comprometida bajo condiciones específicas, como pérdida de piel extensa, quemaduras profundas, heridas crónicas, úlceras no curables y diabetes [57, 58].

Diversos enfoques no quirúrgicos se han desarrollado y se han introducido numerosos medicamentos para ayudar a la gestión de heridas.

##### **1.6.4.1 Fármacos**

*La pentoxifilina*, una metilxantina que mejora la perfusión de los lechos vasculares periféricos, es útil en pacientes con úlceras secundarias a la enfermedad vascular periférica. Mejora la microcirculación capilar disminuyendo la viscosidad de la sangre y reduciendo la agregación plaquetaria. También puede inhibir el factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , una citocina inflamatoria implicada en heridas que no cicatrizan.

*Iloprost*, un análogo de la prostaciclina, es un tratamiento establecido para la claudicación intermitente, la isquemia grave de las extremidades y la prevención de gangrena inminente, y para reducir el dolor y los síntomas clínicos asociados con la enfermedad de Raynaud. Iloprost por vía intravenosa es útil para promover la curación de las úlceras arteriales y úlceras de vasculitis secundaria a enfermedades del tejido conectivo tales como artritis reumatoide y la esclerodermia.

*El trinitrato de glicerilo*, un donante de óxido nítrico, es eficaz en el manejo de fisuras anales crónicas cuando se aplica tópicamente como ungüento al 0,2%. El óxido nítrico causa vasodilatación, y estudios sugieren un importante papel del

trinitrato de glicerilo en el tratamiento de heridas crónicas de etiología isquémica, incluidas las úlceras vasculíticas.

*Los antagonistas del calcio* tales como diltiazem y nifedipino son útiles en el tratamiento de las úlceras vasculíticas secundarias a la enfermedad de Raynaud y enfermedades del tejido conectivo.

*Los corticosteroides sistémicos* son útiles en el tratamiento de úlceras secundarias a enfermedades del tejido conectivo, incluyendo artritis reumatoide, esclerodermia y otros trastornos vasculíticos. Promueven la curación atenuando la respuesta inflamatoria excesiva.

*La fenitoína*, aplicada tópicamente, promueve la cicatrización de la herida mediante la inhibición de la enzima colagenasa. Es eficaz en algunas úlceras de bajo grado y úlceras tróficas.

*Los retinoides* (derivados de la vitamina A) tienen un impacto en la curación de heridas a través de sus efectos sobre la angiogénesis, la síntesis de colágeno y la epitelización. La vitamina A es necesaria para el mantenimiento epidérmico normal. Aunque el valor de los retinoides en las heridas crónicas no está claro, se ha demostrado que la tretinoína tópica (0.05-0.1%) acelera la reepitelización de las heridas con dermatitis, y las heridas de espesor parcial y completo en modelos animales.

*Los analgésicos* son necesarios para muchas úlceras. Pueden ir desde analgésicos simples hasta opiáceos en individuos cuyo dolor es severo. El dolor por úlceras asociadas con neuropatía puede beneficiarse del tratamiento con ciertos antidepresivos tricíclicos (como amitriptilina) o fármacos antiepilépticos (como la gabapentina) [98].

*Colágeno*, es un elemento muy importante en el proceso de cicatrización el cual acelera la reparación tisular, disminuye la respuesta inflamatoria local, estimula el proceso de granulación y ejerce un buen efecto desbridante, que es la capacidad para reducir la carga bacteriana, incentivar la formación de tejido conectivo, así

como activar células inflamatorias, la fagocitosis y la neovascularización en el tejido reparado.

Actualmente se comercializa un apósito con colágeno heterólogo en polvo, denominado Catrinx®; que es un compuesto de polvo micronizado estéril de cartílago traqueal bovino, formado además por otros componentes como el factor de crecimiento derivado del cartílago (FCDC), que incide en la cicatrización [93, 94].

*Quitina en polvo*, es una sustancia extraída del esqueleto de diferentes insectos, las conchas de los crustáceos y el cartílago bovino. Al aplicarla sobre una herida es despolimerizada por la acción de enzimas lisosomales abundantes en el sitio de la lesión, lo cual permite la formación de fibroblastos y, por consiguiente, de fibra colágena.

El empleo efectivo de la quitina en la cicatrización de heridas, úlceras crónicas de la piel y quemaduras está relacionado con la propia composición del tejido conectivo, que contiene cantidades variables de glicosaminoglicano, asociadas a proteínas. Estudios histoquímicos registran que la producción de mucopolisacáridos “prepara y dirige” a los fibroblastos para producir colágeno, de cuya orientación y entrecruzamiento dependen las propiedades mecánicas del tejido cicatrizado. Se utiliza en forma de ungüentos y polvos [95,96].

A continuación se presentan algunos fármacos que se utilizan en conjunto para el tratamiento de heridas, los cuales presentan un efecto directo en la cicatrización (Tabla 4).

**Tabla 4** Efectos de algunos fármacos comúnmente usados en la Cicatrización de heridas. Tomada y modificada de: Enoch, S., Grey, J. E., & Harding, K. G. (2006). *Non-surgical and drug treatments. BMJ : British Medical Journal*, 332(7546), 900–903 [98].

Clase y nombre del medicamento	Efecto
<i>AINES</i> Ibuprofeno	Afecta la fase inflamatoria al inhibir la producción de ciclooxigenasa; reduce la resistencia a la tracción de la herida.
Colchicina	Afecta la fase inflamatoria y la fase proliferativa al disminuir la proliferación de fibroblastos; altera la fase de remodelación degradando la matriz extracelular recién formada.
<i>Los corticosteroides (prednisolona)</i>	Afecta la fase hemostática al disminuir la adhesión plaquetaria; la fase inflamatoria se ve comprometida al afectar la fagocitosis; afecta a la fase de remodelación y reduce la actividad de los fibroblastos e inhibe la síntesis de colágeno.
<i>Antiplaquetarios (aspirina)</i>	Afecta la fase hemostática inhibiendo la agregación plaquetaria; inhibe la inflamación mediada por los metabolitos del ácido araquidónico.
<i>Anticoagulantes</i>  Heparina          Warfarina	Afecta la fase hemostática por su efecto sobre la formación de fibrina; puede conducir a la formación de trombos que causan trombocitopenia (síndrome del coágulo blanco).          Afecta la fase hemostática por su efecto sobre la formación de fibrina; puede causar necrosis tisular y gangrena.
<i>Vasoconstrictores (nicotina, cocaína, adrenalina)</i>	Afecta la fase proliferativa inhibiendo la neovascularización y disminuyendo la formación de tejido de granulación; daña la microcirculación y aumenta el rechazo del injerto y la necrosis de la úlcera.

#### **1.6.4.2 Tratamientos no farmacológicos**

Cuando las heridas son agudas se pueden utilizar los siguientes tratamientos [97]:

*Sutura*, costura de los bordes de una herida con hilo, cuando es leve.

*Adhesivos tópicos*; se ha popularizado cerrar los tejidos con estos productos, entre ellos el 2 -octil-cianoacrilato; líquido que al juntar los bordes de la herida, los conserva unidos mientras cicatrizan.

*Vendoles*; son cintas especiales, parecidas a las adhesivas, pero más delgadas y con igual resistencia, que no irritan la piel.

*Películas de poliuretano*, cintas transparentes con adhesivo, que ayudan a mantener los bordes de las heridas juntos; son hipoalergénicas e impermeables al agua; permiten que salga el dióxido de carbono y favorecen la penetración del oxígeno.

En heridas crónicas:

*Apósitos o gasas*, impregnados de medicamentos, pueden permanecer en la herida por más de 24 horas e incluso contener carbón activado y plata, en caso de heridas infectadas; otros son de arginato de calcio, cuyas fibras se hinchan al contacto con la sangre o la secreción de la herida y originan un material gelatinoso que atrapa bacterias y restos celulares.

*Parches*, su función es favorecer la cicatrización desde el fondo hasta la superficie y de los bordes de la herida hacia el centro, con ayuda de hidrogeles, hidrocoloides e hidropolímeros, conocidos agentes medicinales que permiten mantener la zona bien hidratada, sin necesidad de limpieza diaria ni molestias

*Aplicación de piel cultivada, sintética, animal o humana*, se utiliza en diferentes padecimientos, tales como quemaduras y úlceras venosas y diabéticas; sin

embargo, todavía se encuentran en fase de investigación clínica, por sus posibles efectos secundarios a largo plazo.

*Luz polarizada*, procedimiento utilizado desde hace años como fototerapia para aliviar o curar diversas afecciones, pues al aplicarse luz sobre los tejidos dañados, se estimulan las células afectadas de la zona y se modifica la electricidad propia de la membrana celular, lo cual normaliza el funcionamiento de las enzimas celulares cutáneas.

Por otro lado las prácticas y compuestos que surgen de la medicina tradicional se han utilizado para crear las condiciones óptimas para el proceso de regeneración de la piel y para prevenir el fracaso del proceso de curación, debido a sus actividades terapéuticas, disponibilidad, asequibilidad y bajo costo [59]. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la medicina tradicional, también denominada medicina "alternativa" o "complementaria", subraya el uso de terapias tradicionales para el mantenimiento de la salud y prevención.

Estas terapias comprenden prácticas, productos y conocimientos de diferentes países, que incluyen el uso de organismos vivos y compuestos naturales obtenidos de una amplia gama de fuentes (por ejemplo, animales, plantas, hongos y minerales). En la última década ha sido testigo de un crecimiento en el manejo racional de heridas crónicas y algunos nuevos desarrollos en vendajes de heridas, incluyendo intentos de incorporar factores de crecimiento recombinantes y células vivas. En particular, es el entorno de la herida local que ha sido considerado como el objetivo clave para las estrategias terapéuticas. Los apósitos proporcionan el ambiente más favorable para una curación exitosa al proteger el sitio local de la herida de traumatismos adicionales mientras proporcionan humedad y absorben el exceso de exudado. Los apósitos más complejos pueden tener propiedades biológicas adicionales, tales como ser antibacterianos, atraer células circulantes, estimular células locales a migrar y proliferar, así como estimular la deposición apropiada de la matriz [99].

### 1.6.4.3 Compuestos derivados de plantas

Los productos a base de hierbas se aplican como extractos, emulsiones, cremas y ungüentos, siendo comúnmente administrados por vía tópica, sistémica y oral [60, 61, 62]. A continuación se presentan (Tabla 5) algunos ejemplos de plantas utilizadas para la cicatrización de heridas.

**Tabla 5** Ejemplos de algunas plantas que actualmente son investigadas para el tratamiento de cicatrización de heridas (DMSO, sulfóxido de dimetilo; SM, sesamol). Tomado de: Pereira, R. F., & Bártolo, P. J. (2016). *Traditional Therapies for Skin Wound Healing. Advances in Wound Care*, 5(5), 208–229.

Planta	Principales Componentes	Formas Físicas y Vías de Administración	Evidencia Clínica y de Laboratorio	Referencias
<i>Aloe vera</i>	Azúcares solubles, polisacáridos no almidonado, lignina, polisacáridos, glicoproteínas y agentes antisépticos	Formas: Soluciones, cremas, mucilago, geles y apósitos. Vías: Tópica y oral.	Actividad anti-inflamatoria y antimicrobiana; estimula la proliferación celular, síntesis de colágeno y angiogénesis; promueve la contracción de la herida.	60,62, 63-65
<i>Hippophae rhamnoides</i>	Flavonoides, carotenoides, vitaminas (C, E, K), taninos, ácidos orgánicos, triterpenos, glicéridos de ácido palmítico, esteárico, oleico y aminoácidos.	Formas: extracto acuoso de hojas, aceite de semillas. Vías: Tópica y oral.	Actividades antioxidantes y anti-inflamatorias; estimula el proceso de curación; mejora la contracción y la epitelización de la herida; aumenta el contenido de hidroxiprolina y proteínas en la herida.	66, 67
<i>Angelica sinensis</i>	Aceites esenciales e ingredientes solubles en agua; el ácido ferúlico	Formas: Extractos de etanol, ácido ferúlico disuelto en DMSO. Vías: Solo	Estimular la proliferación de fibroblastos de piel humana, la secreción de	68

	es el principal componente activo.		pruebas <i>in vitro</i> .	colágeno y la expresión de TGF- $\beta$ en condiciones <i>in vitro</i> .	
<i>Catharanthus roseus</i>	Contienen dos clases de compuestos activos: alcaloides y taninos.	dos de y	Formas: extracto de etanol a partir de la hoja Vías: Tópica.	Actividad antimicrobiana contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> ; aumenta la resistencia de la herida y la epitelización.	69
<i>Calendula officinalis</i>	Triterpenoides y flavonoides.	y	Formas: extractos acuosos, hexano y extractos etanólicos disueltos en DMSO Vías: Tópica	geles, en y en Actividades antiinflamatorias y antibacterianas; estimula la proliferación y migración de fibroblastos <i>in vitro</i> ; estimula la producción de colágeno y la angiogénesis.	70, 71, 72
<i>Sesamum indicum</i>	SM es el principal componente antioxidante, otros incluyen sesamolina y sesaminol.		Formas: SM (pureza > 98%) y SM que contiene dexametasona Vías: intraperitoneal e intramuscular	Mejorar la resistencia a la tracción de la herida, la contracción y los niveles de hidroxiprolina en los modelos de herida normal y retardada en ratas.	73
<i>Morinda citrifolia</i>	Ácidos, alcoholes, fenoles, ésteres, antraquinonas, esteroides, flavonoides, triterpenoides, sacáridos, carotenoides, ésteres, cetonas, lactonas, lignanos y nucleósidos.		Formas: extracto de etanol/agua de hojas de plantas. Vías: Oral	Mejora el contenido de hidroxiprolina y reduce tanto el área de la herida como el tiempo de epitelización.	74,75

---

<i>Camellia sinensis</i>	Polifenoles, flavonoides, taninos, cafeína y aminoácidos.	Formas: vaselina pura y pomada del extracto etanólico de la planta (0.6%).  Vías: Tópica	En ratas Wistar con heridas creadas por incisión se redujo el tiempo de cicatrización y la longitud de la herida.	76,77
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	La mayoría de los componentes bioactivos incluyen terpenoides y polifenoles, tales como carnosol, ácido carnósico y ácido rosmarínico.	Formas: extracto acuoso y aceite esencial.  Vía: Tópica e intraperitoneal.	Reduce la inflamación y mejorar la contracción de la herida, re-epitelización, angiogénesis y deposición de colágeno en las heridas de grosor completo en ratones diabéticos.	78

---

#### 1.6.4.4 Productos derivados de Animales

Productos de origen animal, como miel y propóleos, se han utilizado en el cuidado de heridas desde la antigüedad debido a sus propiedades terapéuticas. La miel se ha aplicado como un material bioactivo natural que llena y cubre las heridas superficiales o profundas, proporcionando un ambiente húmedo y nutrición tópica. Propóleos también se han empleado como resultado de sus propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y antibacterianas. La piel de rana y sus secreciones también se han explorado en la medicina tradicional como pomada o apósito provisional que cubre la herida, evitando la penetración de patógenos y la deshidratación [79, 80].

#### 1.6.4.5 Organismos Vivos

El interés en el uso de organismos vivos para el tratamiento de heridas ha aumentado significativamente en los últimos años, proporcionando enfoques alternativos para la reparación de la piel. Los gusanos tienen una notable actividad antimicrobiana y la capacidad de estimular el desbridamiento de la herida,

mientras que las sanguijuelas son muy útiles en el tratamiento de las heridas venosas [100].

#### **1.6.4.6 Usos tradicionales de Minerales**

Los minerales también juegan un papel importante en la cicatrización de heridas, de los cuales destacan los siguientes.

*La plata* es un agente antimicrobiano de amplio espectro que se utiliza comúnmente en el tratamiento de lesiones cutáneas, en particular, heridas y quemaduras. La plata está disponible como el ingrediente activo de diversos productos, tales como soluciones (por ejemplo , nitrato de plata), cremas ( por ejemplo , Sulfadiazina (SSD)), apósitos de gasa (por ejemplo , Urgotul ® SSD) , espumas (PolyMem ® Silver) y apósitos ( por ejemplo , Acticoat ™ ). Entre la gran variedad de productos a base de plata, SSD es uno de los más utilizados, siendo considerado el patrón oro para el tratamiento tópico de quemaduras [81,82].

*El zinc*; el tratamiento con sulfato de zinc oral puede ser beneficioso en pacientes con úlceras crónicas que tienen niveles bajos de zinc sérico. La administración tópica de zinc parece ser superior a la terapia oral debido a su acción en la reducción de infecciones y material necrótico mediante sistemas de defensa local mejorado y actividad colagenolítica y la liberación sostenida de iones de zinc que estimula la epitelización de heridas en individuos normozincémicos. El óxido de zinc en vendas de pasta protege y alivia la piel inflamada peri-ulcerosa [101].

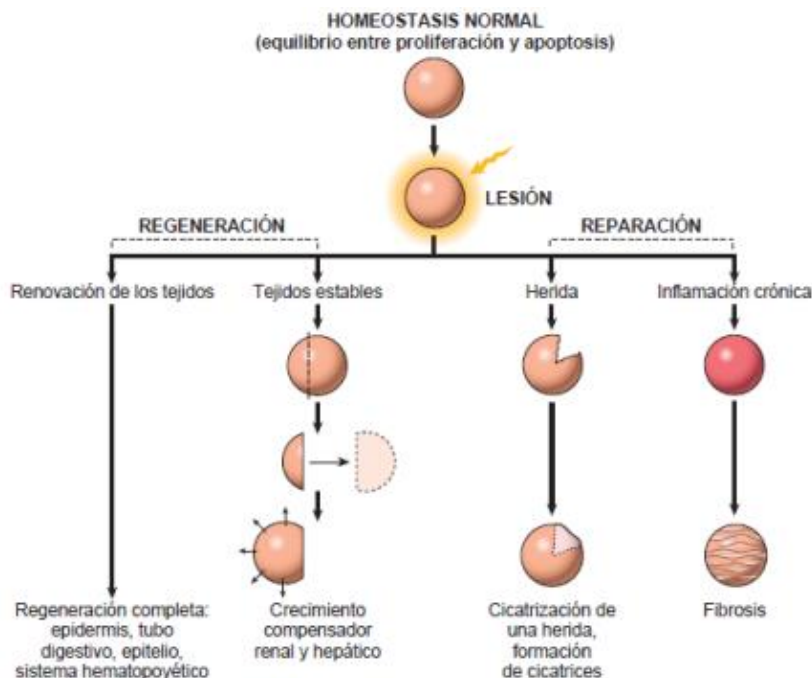
*El cobre*; los apósitos que contienen óxido de cobre, mejoran la cicatrización de heridas mediante la estimulación de la proliferación de fibroblastos dérmicos y el incremento de colágeno. Por lo tanto, la introducción de óxido de cobre en productos ordinarios los transforma en productos extraordinarios [102].

## 1.7 Regeneración

Cuando se habla de curación de heridas, se hace una distinción entre regeneración y reparación. La regeneración se utiliza para referirse a la sustitución completa del tejido dañado con tejido nuevo no asociado con tejido cicatricial, mientras que la reparación se utiliza para referirse al restablecimiento de la continuidad del tejido (Fig. 8). La regeneración se puede lograr por dos medios:

- Restauración, definida como "juntar lo que está roto"
- Reconstrucción, definida como "reemplazar y reconstruir lo que es derribado".

La Regeneración es el reemplazamiento, por células de la misma estirpe, de un tejido desaparecido por causas fisiológicas o patológicas. El reemplazamiento de un tejido por un sistema u otro depende de la capacidad de regeneración de las células. A diferencia de la regeneración en la cicatrización se realiza la sustitución de un tejido desaparecido por tejido conjuntivo [104].



**Fig. 8** Diferencia entre cicatrización y regeneración de tejidos. Tomado de: Ramirez Ramirez Hector. (2015). Regeneración, reparación y cicatrización. [Figura]. Recuperado de ResearchGate [44].

## **1.8 Generalidades del Óxido de zinc**

El óxido de zinc es un compuesto inorgánico con la fórmula ZnO y peso molecular de 81.379 g/mol. El ZnO es un polvo blanco que es insoluble en agua , y se utiliza ampliamente como un aditivo en numerosos materiales y productos, incluyendo cauchos, plásticos, cerámica, vidrio, cemento, lubricantes, pinturas, ungüentos, adhesivos, selladores, pigmentos, alimentos, baterías, ferritas, retardantes del fuego, y cintas de primeros auxilios. Se encuentra naturalmente como el mineral zincite, pero la mayoría de óxido de zinc se produce sintéticamente [105]. El óxido de zinc se puede utilizar en ungüentos, cremas, y lociones para la protección contra las quemaduras solares y otros daños a la piel ocasionadas por la luz ultravioleta. También es ampliamente utilizado para tratar una variedad de otras condiciones de la piel, en productos tales como talcos y cremas protectoras para tratar la dermatitis del pañal, crema calamina, champús anticaspa, y pomadas antisépticas.

El óxido de zinc favorece la cicatrización, protege la piel y alivia las irritaciones. Además del tratamiento en dermatitis del pañal, la pomada de óxido de zinc está indicada para el tratamiento de muchos problemas cotidianos de la piel. Promueve la curación, protege y ayuda a bloquear la humedad. Su uso está indicado para quemaduras menores, cortes y raspaduras. El óxido de zinc es ligeramente astringente y se usa tópicamente como una aplicación calmante y protector en el eccema y ligeras excoiaciones, heridas, y para las hemorroides. La pasta de óxido de zinc con el ácido salicílico se utiliza con frecuencia en el tratamiento del pie de atleta y otras dermatomycosis. Se desea una acción astringente para reducir la inflamación y para cerrar las fisuras [106].

### **1.8.1 Fisiología del Zinc y su papel en la Salud**

El zinc se encuentra ubicuo en el cuerpo, con el 85% almacenado en el músculo y el hueso, el 11% en la piel y el hígado, y el resto en otros tejidos [83]. Dadas las 3000 proteínas que requieren zinc, no debería sorprender que el zinc sea crucial

en innumerables procesos fisiológicos; en el crecimiento, la función inmune, el mantenimiento de tejidos y la cicatrización de heridas [84].

Aunque la toxicidad del zinc es rara y relativamente benigna, la deficiencia de zinc es un problema de salud global con más de 2 mil millones de personas en riesgo de deficiencia dietética. La deficiencia de zinc puede presentarse con un amplio rango sintomático, desde náuseas hasta alteraciones en el crecimiento, gustación, olfacción, visión nocturna y cicatrización de heridas [85].

El aumento de la demanda de zinc durante el proceso de cicatrización de heridas se satisface durante periodos prolongados aplicando óxido de zinc a la herida. Cuando se suministra óxido de zinc, los iones de zinc permanecen dentro del fluido de la herida durante un período de tiempo prolongado, lo que da lugar a niveles de zinc constantes dentro de la herida [86].

La forma principal que toma el zinc en el entorno celular es como parte de metaloenzimas y está involucrado en la estimulación de múltiples vías enzimáticas. En un nivel celular básico, pero crítico, el zinc es necesario para la síntesis y replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y, por lo tanto, es esencial para el crecimiento [107]. El zinc está implicado en la hemostasia a través de su interacción con las plaquetas, y es necesario para la producción de anticuerpos y la función celular inmune [108]. El zinc desempeña un papel central en la proliferación de células inflamatorias y modula la inflamación cutánea [109].

A lo largo de las fases de proliferación y maduración, se requiere zinc para la síntesis de colágeno. El elemento también es necesario para la proliferación de fibroblastos y queratinocitos y acelera el proceso de reepitelización, mientras se fortalece la herida [109,110].

### **1.9 Metodologías Farmacológicas en el restablecimiento epitelial**

La administración de fármacos a través de la piel es útil para el tratamiento tópico de enfermedades de la piel o para la absorción transdérmica de fármacos. La vía tópica ofrece una superficie grande y variada, además de la facilidad de aplicación

a través de la autoadministración y proporciona una alternativa a la administración oral de fármacos, así como a la inyección hipodérmica [111].

La tasa y el alcance de la absorción del fármaco a través de la piel depende de la fisiología de la piel y las propiedades fisicoquímicas de los fármacos, así como del sistema de administración. Las formas de dosificación actuales, es decir, parches, ungüentos, cremas, etc., están asociadas con varias limitaciones. Los parches tienen varias desventajas, la más común es irritación de la piel, debido a sus propiedades oclusivas que causan la obstrucción de los conductos sudoríparos, lo que a su vez evita la pérdida de vapor de agua de la superficie de la piel, presenta dificultad para aplicar en superficies curvas, dolor al despegarse y un atractivo estético pobre. Las preparaciones semisólidas como cremas y ungüentos superan algunos de estos inconvenientes pero tienen otras limitaciones [112].

Debido a su peculiar comportamiento reológico, los semisólidos pueden adherirse a la superficie de aplicación durante períodos suficientemente largos antes de que se eliminen por lavado. Esta propiedad ayuda a prolongar la administración de medicamentos en el sitio de aplicación. Una forma de dosificación semisólida es ventajosa en términos de su fácil aplicación, formulación rápida y capacidad para administrar tópicamente una amplia variedad de fármacos.

Los ungüentos son preparados semisólidos utilizados para aplicación externa en la piel o en las membranas mucosas. Su composición se ablanda pero no se derrite con la aplicación a la piel. Terapéuticamente, los ungüentos funcionan como protectores de la piel y emolientes, pero se usan principalmente como vehículos para la aplicación tópica de sustancias medicamentosas.

Las cremas son formas de dosificación semisólidas que contienen una o más sustancias farmacéuticas disueltas o dispersas en una base adecuada, habitualmente una emulsión de aceite en agua o dispersión acuosa microcristalina de ácidos grasos de cadena larga o alcoholes que son lavables con agua y son cosmética y estéticamente aceptables.

Los geles son sistemas semisólidos que consisten en suspensiones de pequeñas partículas inorgánicas o grandes moléculas orgánicas interpenetradas por un líquido. Los geles pueden ser a base de agua o a base de solvente orgánico [113].

Las pastas son formas de dosificación semisólida que contienen una o más sustancias farmacológicas incorporadas en una base con grandes proporciones de sólidos finamente dispersos.

La elección de las materias primas adecuadas para el desarrollo de una formulación se realiza sobre la base de los requisitos de administración del fármaco y la necesidad particular de impartir una emoliencia suficiente u otras cualidades cuasi medicinales en la formulación.

Las principales vías de entrada de drogas en la piel son la región folicular, los conductos sudoríparos o el estrato córneo ininterrumpido entre estos apéndices [114,115]. La ruta particular de una sustancia depende principalmente de las propiedades fisicoquímicas de la droga y del estado de la piel [116].

### **1.10 La nanotecnología en la farmacología**

La nanotecnología, tal como la define la Iniciativa de Nanotecnología de los Estados Unidos, es "la comprensión y el control de la materia en dimensiones de aproximadamente 1-100 nanómetros, donde los fenómenos únicos permiten nuevas aplicaciones". En la última década, las nanopartículas diseñadas se han convertido en una clase importante de nuevos materiales con varias propiedades que los hacen muy atractivos para el desarrollo comercial. De hecho, se han utilizado cada vez más para fabricar diversos artículos industriales, como cosméticos o ropa, y para infinitas aplicaciones en la industria electrónica, aeroespacial y de la informática. Además, como la necesidad del desarrollo de nuevos medicamentos es apremiante, y dadas las funciones inherentes a nanoescala de los componentes biológicos de las células vivas, la nanotecnología se ha aplicado a diversos campos médicos como la oncología y la medicina cardiovascular [117].

### **1.10.1 Las nanomatrices como elección de encapsulamiento**

Los materiales y muy en especial las nanomatrices son estudiados y desarrollados no solo para minimizar y tratar de controlar el grave daño ecológico y la devastación de los recursos naturales, sino que en recientes investigaciones se están aplicando en la biomedicina y la fabricación de nanomatrices, capaces de controlar y posiblemente de eliminar ciertos tipos de enfermedades comunes y graves causadas por diversas afecciones.

Estas nanomatrices, atacan directamente en la zona dañada, reduciendo reacciones secundarias producidas por fármacos tradicionales. La nanoencapsulación en materiales inorgánicos biocompatibles es una tecnología de vanguardia para controlar la liberación de drogas en el sitio de acción [122].

Los métodos de síntesis de nanopartículas suelen agruparse en dos categorías, las aproximaciones «de arriba hacia abajo» y las «de abajo hacia arriba» [118]. La primera consiste en la división de sólidos másicos en porciones más pequeñas. Este enfoque puede involucrar la molienda o el desgaste, métodos químicos, y la volatilización de un sólido seguido por la condensación de los componentes volatilizados. La segunda aproximación, «de abajo hacia arriba», consiste en la fabricación de nanopartículas a través de la condensación de átomos o entidades moleculares en una fase gaseosa o en solución. Este último enfoque es mucho más popular en la síntesis de nanopartículas [119].

Existen diversos métodos que utilizan la aproximación de “abajo hacia arriba” para la síntesis de nanopartículas, los más empleados son aquellos que utilizan procedimientos químicos. Por lo general, inician con la reducción de los iones metálicos a átomos metálicos, seguido por la agregación controlada de estos átomos. El método químico es el más conveniente para la obtención de nanopartículas uniformes y pequeñas. Uno de los métodos más representativos de esta aproximación se describe a continuación [121].

### 1.10.2 Método Sol-Gel

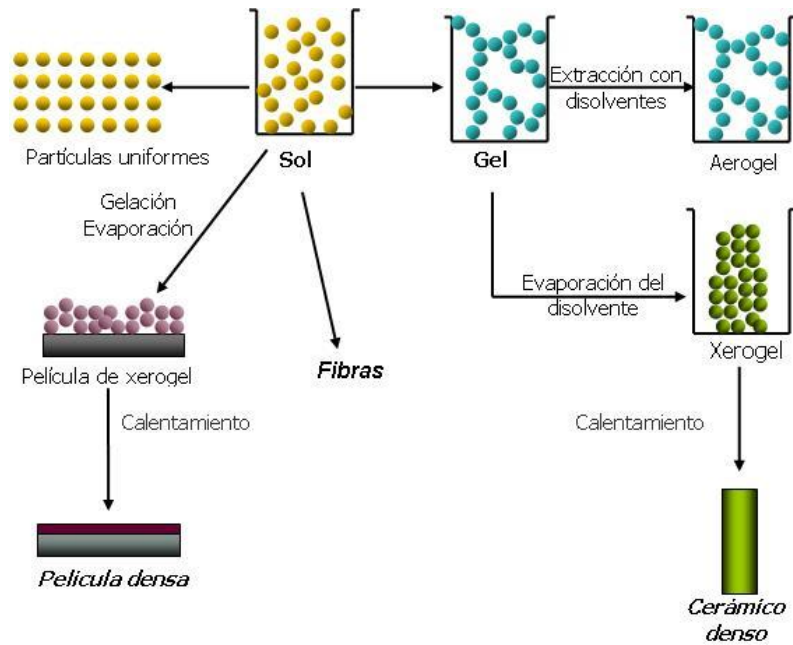
El método sol-gel es un proceso químico en fase húmeda ampliamente utilizado en la ciencia de los materiales. Este método se utiliza principalmente para la fabricación de nanomateriales. Se parte de una solución química o sol que actúa como precursor de una red integrada ya sea de partículas discretas o de una red de polímeros. Los precursores típicos del proceso sol-gel son los alcóxidos metálicos y los cloruros metálicos, que sufren varias reacciones de hidrólisis y policondensación para formar una dispersión coloidal, que luego de una polimerización lenta forma un gel [120].

El método sol-gel está comprendido dentro de los métodos de química suave para la obtención de materiales inorgánicos avanzados de alta tecnología que incluyen películas delgadas, fibras, partículas, etc. Gracias a que el método permite una manipulación a nivel molecular de las diversas etapas de una reacción sol-gel, es posible sintetizar nuevos materiales de alta pureza controlando las características de la microestructura. En particular, es uno de los métodos que ofrecen mayores ventajas cuando se trata de producir estructuras homogéneas a escalas extremadamente finas, es decir, del orden de nanómetros.

De manera general, el método sol-gel comprende dos etapas principales que son: la dispersión de partículas sólidas de tamaño coloidal (1-100 nm) en una fase líquida (formación de un sol) y la gelificación del sol; aunque se utilizan también otras variantes como son: a) hidrólisis y condensación de un alcóxido, o bien, de los nitratos precursores, seguidos por un secado hipercrítico del gel, b) hidrólisis y policondensación de los alcóxidos precursores, seguidos por un envejecimiento del gel y un secado en condiciones ambientales (Fig.9)[87].

En general, los alcóxidos son muy sensibles a la humedad es por ello que la hidrólisis para la formación del gel es llevada a cabo usando alcoholes como un solvente común para los diferentes líquidos inmiscibles. Un gel polimérico es una red macromolecular infinita, la cual está hinchada por solvente. Un gel puede ser creado cuando la concentración de la especie dispersa aumenta. El solvente es

atrapado en la red de partículas y así la red polimérica impide que el líquido se separe, mientras el líquido previene que el sólido colapse en una masa compacta. La deshidratación parcial de un gel produce un residuo sólido elástico que se conoce como *xerogel*. Finalmente, este material es completamente deshidratado y eventualmente tratado térmicamente en flujo de gas para obtener el material nanoestructurado final [88].



**Fig. 9** Proceso general de síntesis de Sol-gel. Tomado de: ALVARADO RIVERA J. Procesamiento y caracterización de recubrimientos híbridos cerámico-polímero [Internet] [123].

## II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De todos los órganos corporales ninguno puede inspeccionarse con mayor facilidad ni se encuentra tan expuesto a una lesión como la piel. Una serie de factores juegan un papel con respecto a la salud de la piel. Estos incluyen los regímenes de higiene personal, el estado nutricional, la exposición a los medicamentos, la radiación, el tabaquismo, la hipoxia, las lesiones e infecciones entre muchos otros. Mismos que causan lesión a la piel en grados variables, es decir causan daño epidérmico o superficial, mientras que las heridas profundas causan lesión subdérmica e inclusive dérmico (las más profundas). Con grados variables de reacción inflamatoria, cicatrización, con y sin reepitelización. Dentro del espectro de lesiones de la piel se encuentran desde cortaduras, daño mecánico, eléctrico, químico, microbiano, lacerante, prurito, psoriasis, queratosis, quistes, ronchas o urticaria, cáncer, úlceras y quemaduras; asociadas o no a patologías primarias como diabetes mellitus.

En este sentido, estudios en los que han participado personas con diabetes con úlceras del pie que no necesitaron de amputación, los costes del tratamiento oscilan entre los \$20,000 y los \$350,000. Cuando se habla sobre costes de tratamiento asociado a úlceras de pie diabético, es importante considerar cada aspecto de la terapia. La ENSANUT 2012 identifica a 6.4 millones de diabéticos (9.2 % de los adultos). De este total, el 25% con un buen control metabólico, y el 30% de los pacientes mal controlados presentan complicaciones, lo que resulta un gran problema para este tipo de población. Así mismo, las quemaduras ocasionan aproximadamente 265, 000 muertes al año, que en su gran mayoría tienen lugar en los países de ingreso bajo y mediano. Las lesiones por quemaduras no fatales son una de las principales causas de morbilidad, se producen mayormente en el ámbito doméstico y laboral. Este aspecto es un gran problema de salud pública a nivel mundial. Las enfermedades de la piel tienen la misma importancia en una pequeña lesión que puede ocurrir de manera cotidiana a cualquier persona, hasta lesiones graves como las antes mencionadas.

### III JUSTIFICACIÓN

Debidos a todos estos problemas en la piel mencionados es necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos para este tipo de enfermedades, que sean accesibles a las personas en cuanto costo y disponibilidad. Por lo que en investigaciones dirigidas, se busca lograr obtener nuevos compuestos que puedan acelerar el proceso de cicatrización y/o regeneración de la piel, para restaurar la composición de la piel.

En este sentido, el glucomanano en la piel se ha reportado como un promotor de la acumulación de fibroblastos, y un estimulante de la producción de colágeno en las heridas de piel. Esta molécula se ha extraído de tubérculos de la planta *Amorphophallus konjac*, y se ha informado como componente activo en el *Aloe vera* para la cicatrización de heridas después de su interacción con receptores de manosa; con estos antecedentes surge el interés de buscar a la molécula en el fruto llamado xoconostle, debido al parecido que existe entre su mucílago y el del *Aloe vera*.

Así mismo, el desarrollo de nanomateriales con potencial farmacológico ha cobrado sumo interés dentro de la industria farmacéutica, de tal manera que moléculas con potencial terapéutico, como en este caso el glucomanano puedan funcionalizarse teniendo de esta manera una forma farmacéutica de liberación continua. El óxido de zinc es ampliamente empleado tanto en la fabricación de nanomateriales como en el cuidado de lesiones de la piel. Por lo que el desarrollo de nanopartículas de GM-ZnO puede ser una alternativa en el manejo terapéutico de enfermedades lesivas de piel.

Adicionalmente, una de las principales ventajas de trabajar con xoconostle es su alto periodo de almacenamiento sin sufrir cambios en la composición de glucomanano. Dado que el xoconostle es un fruto poco explotado, este fruto puede ser muy prometedor para acelerar el proceso de cicatrización y/o regeneración de la piel.

## **IV HIPOTÉISIS**

### **4.1 Hipótesis nula**

El Glucomanano extraído del xoconostle NO puede ser encapsulado en nanopartículas de ZnO, ni es un potencial cicatrizante y/o regenerador de heridas.

### **4.2 Hipótesis alternativa**

El Glucomanano extraído del xoconostle puede ser encapsulado en nanopartículas de ZnO, y ser un potencial cicatrizante y/o regenerador de heridas.

## **V OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar el efecto cicatrizante del glucomanano, GM/ZnO a diferentes concentraciones utilizando como modelo animal a la rata desnuda.

### **5.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Extraer, purificar y caracterizar glucomanano a partir de *Opuntia joconostle*.
- Desarrollar diferentes concentraciones y caracterizar nanopartículas de glucomanano-ZnO.
- Desarrollar una forma farmacéutica utilizando como principio activo al glucomanano encapsulado en ZnO.
- Valorar el efecto cicatrizante del glucomanano, y las nanopartículas GM/ZnO en un modelo animal de rata desnuda.

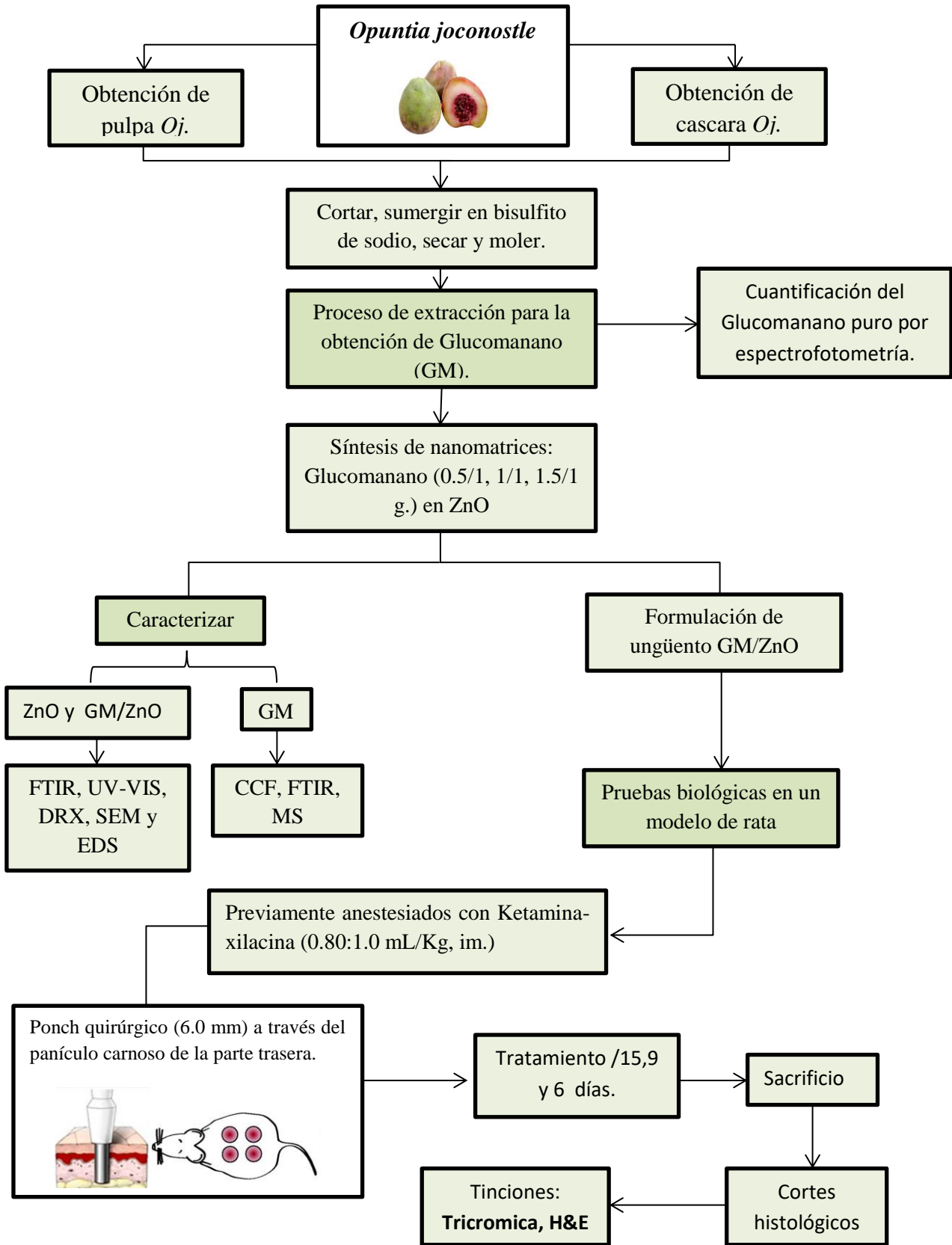


Fig. 10 Diagrama general del trabajo desarrollado.

## **VI METODOLOGÍA CIENTÍFICA**

### **6.1 Obtención de glucomanano a partir de pulpa y cascara de xoconostle**

Al fruto xoconostle se le retiró la cascara y la pulpa, para el caso de la pulpa se cortó en pedazos de 2-3 mm de espesor. Ambos productos fueron sumergidos en bisulfito de sodio al 1% (w / v) durante 1 min. Posteriormente el proceso de secado se realizó a 60°C por 12 horas, finalmente la pulpa y cascara secas se muelen para generar los dos tipos de harina.

#### **6.1.1 Extracción y purificación de glucomanano**

Para cada tipo de harina se pesaron 20 g., se colocaron en un vaso de precipitados y se pusieron en agitación con 200 mL de etanol al 50% (v/v) durante 90 min a temperatura ambiente, enseguida se realiza una centrifugación (3000 rpm, 30 min) para eliminar el etanol acuoso. El sedimento resultante se añade a 200 mL de agua desionizada y se agita por 4 horas a temperatura ambiente. Después esta solución se diluye a 300 ml con agua desionizada, se realiza una filtración para facilitar la centrifugación (3000 rpm, 30 min) buscando eliminar los materiales insolubles. El sobrenadante se somete a rota vapor (40 °C) para reducir el volumen a aproximadamente 1/3 del volumen original, en seguida el glucomanano en la solución se precipita con etanol al 95% (v/v) (200 mL) a 4°C durante toda la noche, posteriormente se somete a centrifugación (3000 rpm, 30 minutos). El sedimento resultante se lava dos veces con etanol anhidro (proceso de deshidratación), se aísla por filtración al vacío y finalmente es secado por congelación durante 48h. El material seco se muele, obteniendo glucomanano de pulpa (PGM) y cascara (CGM).

### **6.1.2 Ensayo colorimétrico 3,5-DNS para cuantificar el glucomanano**

#### *-Preparación del reactivo 3,5 DNS*

Solución A: Disolver 0.7 g de fenol en 1.5 mL de hidróxido de sodio al 10% (w/w), agregar 5 mL de agua desionizada y 0.7 g de bisulfito de sodio.

Solución B: Pesar 22.5 g de tartrato de sodio y potasio, agregarlo a una solución de hidróxido de sodio al 10 % (30 mL) y añadir 88 mL de 3,5-DNS al 1% (w/w).

Mezclar la solución A con la solución B y almacenarlo en un frasco ámbar a temperatura ambiente para ser usado 7-10 días después.

#### *-Construcción de las curvas de calibración D-Glucosa, D-Manosa.*

A partir de las soluciones madre respectivamente (D-Glucosa, D-Manosa) 1 mg/mL se preparan diferentes concentraciones (0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2.0 mg/mL) y 2 mL de agua desionizada la cual fue utilizado como blanco, se colocaron en seis matraces aforados de 25 mL, a cada matraz se le agregaron 2 mL de agua desionizada, 1.5 mL del reactivo 3,5-DNS, se pusieron a reaccionar en baño maría con agitación por 5 minutos y posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente antes de aforar con agua desionizada. A continuación se mide la absorbancia a 550 nm y se grafican las absorbancias obtenidas contra el contenido (mg) de D-Glucosa y para D-Manosa.

#### *-Preparación de las muestras de glucomanano y reacciones colorimétricas.*

Solución tampón de hidróxido de sodio-ácido fórmico (0,1 mol/L): Colocar 1 mL de ácido fórmico en un matraz de 250 mL, añadir 60 mL de agua destilada. Pesar 0.25 g de NaOH disuelto, añadirlo a la solución y aforar a 250 mL.

Se agregó PGM o CGM obtenido (200 mg) a 50 mL de una solución tampón de hidróxido de sodio-ácido fórmico (0,1 mol/L) y se mezcló durante 4 h a temperatura ambiente. Después, la mezcla se diluye a 100 mL con la solución tampón en un matraz aforado, seguido de centrifugación (3000 rpm x 30 min). Se colocó la solución de la muestra PGM o CGM obtenida (10 mL) a un matraz

aforado de 25 mL seguido de la adición de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3M (5 mL). La solución resultante se agitó y se hidroliza durante 90 min en un baño de agua hirviendo, y se deja enfriar a temperatura ambiente antes de la adición de NaOH 6M (5 mL). Después, la solución se completa hasta 25 mL con agua desionizada para formar el hidrolizado de PGM/CGM. Tanto la solución de la muestra PGM/CGM e hidrolizado se sometieron a reacciones colorimétricas, como se describió anteriormente.

## **6.2 Caracterización de PGM Y CGM**

### **6.2.1 Técnica cromatografía en capa fina (CCF)**

En una placa de gel de sílice ( $\text{SiO}_2$ ) se trazó con un lápiz una línea a 0.5 cm del borde inferior y del borde superior. Las muestras PGM y CGM se disuelven en agua desionizada en tubos de ensayo, con ayuda de una micropipeta de vidrio se toma la muestra. Al tocar brevemente la placa de gel de sílice con la micropipeta el líquido se absorbe en la placa por capilaridad. Se pincha tres veces en el punto para conseguir una mancha de pequeño tamaño que da mejor resolución.

La placa se deposita dentro de una cubeta de cromatografía, a la que previamente se ha añadido una pequeña cantidad del eluyente deseado. El nivel de eluyente debe estar por debajo del punto de aplicación. Se tapa la cubeta y se deja que el eluyente ascienda por capilaridad. Los eluyentes utilizados fueron: Acetato de etilo, cloruro de metileno, acetona, metano. Antes de que el disolvente llegue al otro extremo de la placa se saca de la cubeta con unas pinzas, tras dejar evaporar el disolvente de la placa, se revela la placa con el visor de UV para finalmente observar el corrimiento de las muestras.

### **6.2.2 Técnica de infrarrojo con transformación de Fourier (FTIR)**

Esta técnica proporciona un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales de las sustancias inorgánicas y orgánicas, por lo cual es posible realizar una identificación de los materiales.

Una pequeña muestra es colocada en una celda infrarroja, donde es sometida a una fuente de luz infrarroja, la cual hace un barrido desde las longitudes de onda de  $4000\text{ cm}^{-1}$  hasta  $600\text{ cm}^{-1}$ . La intensidad de la luz transmitida a través de la muestra es medida en cada número de onda, lo que permite que la cantidad de luz absorbida por la muestra sea calculada por la diferencia entre la intensidad de la luz antes y después de pasar por la celda de muestra. Esto se conoce como el espectro infrarrojo de la muestra. El estudio se realizó en un espectrómetro de marca Digilab SCIMITAR Series y posteriormente mediante el software del equipo se llevó a cabo la transformación de Fourier.

### **6.2.3 Técnica de Espectrometría de masas (MS)**

La espectrometría de masas es una poderosa técnica micro-analítica usada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas. La detección de compuestos puede ser llevada a cabo con cantidades realmente pequeñas de muestra y obtener información característica como el peso y algunas veces la estructura del analito. Está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones se separan de acuerdo con su masa y su carga, y finalmente se detectan por un dispositivo adecuado.

### **6.3 Síntesis de nanomatrices de PGM-ZnO y CGM-ZnO**

El proceso de síntesis se basó en la disolución de óxido de zinc (ZnO, 1 g) en etanol (50 mL) y la disolución parcial de glucomanano en agua destilada. Se realizaron diferentes concentraciones del encapsulado manteniendo constante la concentración de ZnO y variando las concentraciones de glucomanano (0.5, 1.0, 1.5 g). El glucomanano se disolvió parcialmente en 20 mL de agua destilada en todos los casos. Una vez disuelto fue transferido a un sistema de reflujo con agitación y temperatura constantes, al alcanzar los  $70^{\circ}\text{C}$ , el ZnO se va incorporando por goteo lentamente mediante un embudo de separación a la solución. Terminado esto la solución se mantiene así por 1 hora, en seguida se detiene el sistema de reflujo y el embudo de tres bocas se sumerge en agua fría

por 15 minutos. Posteriormente el producto es sometido a rota vapor a 40°C con vacío para eliminar los solventes, después es secado en la estufa a 60°C hasta peso constante, finalmente se pulverizó para obtener las nanomatrices CGM-ZnO y PGM-ZnO.

## **6.4 Caracterización de CGM-ZnO y PGM-ZnO**

### **6.4.1 Técnica de infrarrojo con transformación de Fourier (FTIR)**

Los nanomateriales fueron caracterizados por infrarrojo con transformación de Fourier como se explicó anteriormente.

### **6.4.2 Técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

La microscopía electrónica de barrido es una técnica que sirve para analizar la morfología de materiales sólidos de todo tipo (metales, cerámicos, polímeros, biológicos, etc.), con excepción de muestras líquidas. La resolución nominal del equipo es de 3 nm, lo cual permite estudiar características de los materiales a una escala muy pequeña. Con esta técnica se pueden detectar todos los elementos químicos con número atómico mayor a 4 de manera cualitativa y semicuantitativa. El microscopio electrónico de barrido fue un Zeiss (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), operado a 100 kV con una resolución de punto a punto de 0.4nm y las microfotografías fueron tomadas con una cámara CCD (MegaVision, Santa Barbara, CA).

### **6.4.3 Técnica de Difracción de Rayos X (DRX)**

La Difracción de Rayos X es un método utilizado para identificar las fases presentes en polvos policristalinos desconocidos. El análisis se efectúa mediante la comparación de patrones de difracción recopilados de una muestra desconocida con los patrones de difracción de compuestos conocidos.

Esta técnica no destructiva se empleó para identificar las estructuras o fases cristalinas de las nanomatrices obtenidas. El espectrofotómetro utilizado es un equipo de Difracción de Rayos X (DRX) D8-Discover, Bruker con lector LynxEye, voltaje de 40 Kv, como se muestra en la fig. 30. Previo al análisis las muestras fueron pulverizadas, empaquetadas y posteriormente analizadas a temperatura ambiente (25°C), con intervalo de  $2\theta$  localizado entre 5° a 170°, con un tiempo de incidencia de 1 segundo. Se utilizó una radiación de Cu y Mo a longitud de onda de 1.54 Å.

### 6.5 Preparación de la forma farmacéutica: Ungüento cetílico

**Tabla 7** Formulación para un ungüento

Petrolato Blanco	27.52 g.
Lanolina	3.2 g.
Alcohol cetílico	1.28 g.
GM-ZnO, GM, ZnO	3.0 g.

Para la elaboración del ungüento se fundieron las materias sólidas descritas en la tabla 7.1, sobre un baño caliente manteniendo la temperatura a 70°C. El principio activo se incorporó minutos después de preparar la base en un punto intermedio antes de que se solidificara por completo. Se formularon 5 tipos de ungüentos:

- Ungüento con ZnO como P.A.
- Ungüento con GM-ZnO (33/67%) como P.A.
- Ungüento con GM-ZnO (50/50%) como P.A.
- Ungüento con GM-ZnO (60/40%) como P.A.
- Ungüento con GM (100%) como P.A.

## **6.6 Evaluación de la actividad cicatrizante (Modelo animal).**

Se utilizaron ratas macho de cepa desnuda de 60 días de edad (n=30), con un peso promedio de 150 a 200 g. proporcionadas por el Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Las ratas se mantuvieron en cajas de acrílico con libre acceso de agua y alimento, a una temperatura de 24°C, con un 50% de humedad y un ciclo de luz-oscuridad de 12-12 horas. El uso y cuidado de los animales se realizó en concordancia con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y al comité de investigación de usos de animales de laboratorio de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

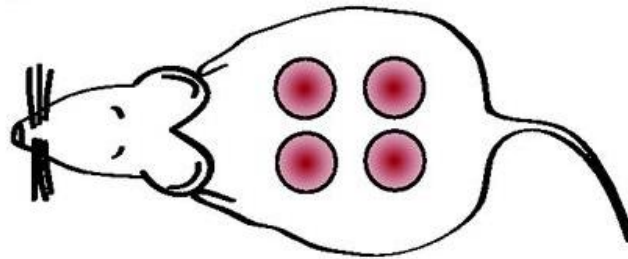
### **6.6.1 Protocolo de administración**

Todos los procedimientos de manejo y cirugía de los animales, fueron sujetos a los protocolos aprobados por el comité institucional bajo la normatividad vigente (NOM-062-ZOO-1999), sobre el manejo y el uso de animales de laboratorio. Los animales fungirán como control y problema con la finalidad de mantener condiciones ideales en el proceso inflamatorio.

Las ratas fueron divididas en 3 grupos (n=10), cada grupo fue sometido a los mismos tratamientos con la única variante del tiempo (6, 9, 15 días de tratamiento). Tres días antes de la cirugía se les administró antibiótico (0.10:100 mL/g, sc) para evitar complicaciones de carácter infeccioso. Con previa anestesia de los animales con ketamina / xilacina (0.80:1.0 mL/Kg, im.) acompañada de un analgésico (metamizol sódico 0.04:200 mL/g, im), se realizaron cuatro heridas a 15 ratas y tres heridas al resto, de forma circulares tipo “ponch quirúrgico” que se extienden a través del panículo carnoso en la región interescapular de la parte trasera de cada rata, con un diámetro de 6.0 mm y una profundidad de 2.0 mm utilizando un Biopunch HealthLink.

Cabe mencionar que ninguno de los fármacos empleados en el proyecto, representa un riesgo para el personal que labora en el Bioterio. Los elementos de protección del personal que se utilizaron fueron guantes, bata, cubre bocas y

material quirúrgico estéril. Además de que se dará cumplimiento a las normas de RPBI y control de medicamentos.



**Fig.11.** Ejemplificación de las biopsias de piel en las ratas [89]. *Tomado de: Nunan Robert, et al. (2014). Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. Disease Models & Mechanisms 7: 1205-1213.*

De cada grupo formado ( $n=10$ ) se subdividieron 2 grupos ( $n=5$ ), el primer grupo recibió 4 tipos de tratamiento: Ungüento con ZnO, GM-ZnO (33/67%), GM-ZnO (50/50%), GM-ZnO (60/40%), el segundo grupo fue tratado con GM (100%), pomada de la campana y un “ponch” intacto como control; todos ellos fueron de aplicación tópica sobre la herida generada. La aplicación se realizó diariamente con previa curación de las heridas, se tomaron fotos de cada lesión y de igual manera se midieron los diámetros de los ponchs a los largo de los días. Al término de cada tiempo (6, 9,15 días) se realizó eutanasia, a través de una cámara de dióxido de carbono siguiendo los criterios de la NOM-064-ZOO-2000. La zona de lesión fue retirada y fijada en paraformaldehído al 4% en solución buffer de fosfatos, para su posterior inclusión en parafina y análisis histológico.

## **6.6.2 Técnicas histológicas**

Preparación del tejido cutáneo para desarrollar las técnicas histológicas: El tejido cutáneo extraído fue colocado en paraformaldehído al 4% en solución buffer de fosfatos (PBS) 0.1mM pH 7.4, durante 72 horas para después iniciar su proceso de deshidratación, inclusión en parafina y cortes de 5  $\mu$ m de espesor en el micrótopo (Histocut Reichter-Jung. Cambridge Germany).

## **6.6.3 Tinciones**

### **6.6.3.1 Tinción de Hematoxilina-Eosina**

- Colocar las laminillas en hematoxilina de Harris 5 minutos.
- Lavar con agua destilada hasta quitar el color morado.
- Diferenciar en alcohol ácido (1 baño rápido).
- Lavar con agua de la llave.
- Colocar en solución de carbonato de Litio 1%, hasta el vire de morado a azul.
- Lavar con agua destilada.
- Colocar en solución de eosina durante 1 minuto.
- Lavar bien en agua destilada.

### **6.6.3.2 Tinción Tricrómica de Masson**

- Colocar las laminillas en la solución de Bouin por 24 horas.
- Lavar con agua de la llave hasta retirar el color amarillo de las laminillas.
- Colocar en solución de Hematoxilina de Weigert por 35 minutos.
- Lavar con agua destilada.
- Colocar en solución de Escarlata de Biebrich durante 7 minutos.
- Lavar con agua destilada.
- Colocar en solución de Ácido Fosfomolibdico durante 20 minutos.
- Colocar en solución de Azul de anilina durante 10 minutos.
- Lavar con agua destilada.

## VII RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOMATRICES DE GM-ZnO Y GM.

### 7.1 Extracciones de PGM y CGM

En la Tabla 8 se muestran los porcentajes de extracto que se obtuvieron a partir de pulpa y cáscara del xoconostle en peso seco. Como se puede observar los rendimientos son variados tanto en el extracto de cáscara (CGM) como el de pulpa (PGM).

**Tabla 8.** Porcentaje del extracto en relación con el peso seco del fruto (pulpa y cáscara).

Sin embargo la Tabla 9 nos muestra que los rendimientos obtenidos en el extracto

	PULPA (peso seco)	(%) Extracto PGM	CÁSCARA (peso seco)	(%) Extracto CGM
Extracción 1	20.23 g.	0.6500	16.00 g.	0.7562
Extracción 2	19.85 g.	0.7355	14.43 g.	1.4760
Extracción 3	16.23 g.	0.6839	16.60 g.	0.9397
Extracción 4	22.18 g.	0.7168	12.767 g.	1.5773
Extracción 5	19.50 g.	0.8000	9.728 g.	0.9765
Extracción 6	14.47 g.	0.9882	21.959 g.	1.4299
Extracción 7	18.54 g.	0.7820	29.257 g.	1.3808
Extracción 8	19.00 g.	1.2947	29.259 g.	1.9241

de cáscara son mayores con un (10.4605%) en comparación con el porcentaje de pulpa (6.6511%) en 150 gramos de peso seco.

**Tabla 9.** Porcentaje del extracto total en relación con el peso seco del fruto.

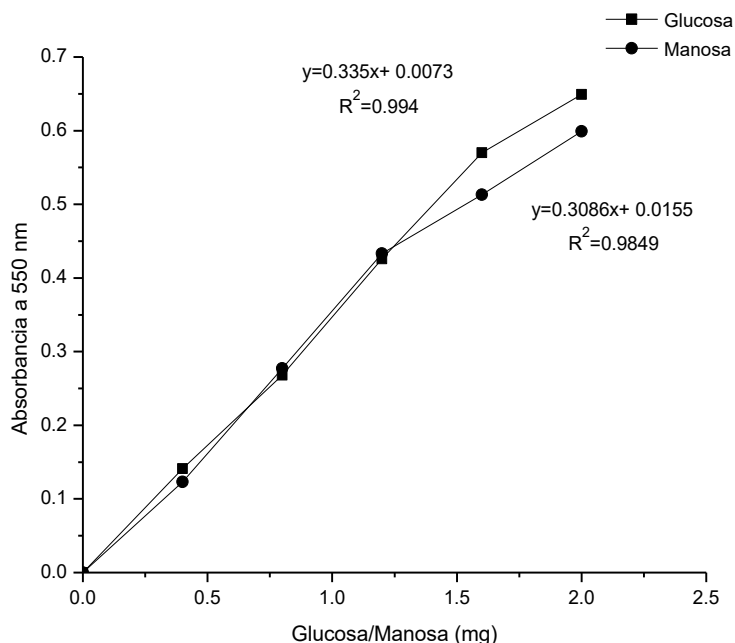
	PULPA (peso seco)	(%) Extracto PGM	CÁSCARA (peso seco)	(%) Extracto CGM
Extracción	150.00 g.	6.6511	150.00 g.	10.4605

Esto se debe a que en la cáscara se ha reportado un 8.77% de fibra dietética total mientras que en la pulpa solo un 0.93 %. Notablemente se observa una diferencia significativa, la cual explica nuestros resultados.

## 7.2 Ensayo Colorimétrico 3,5-DNS

Una vez obtenidos los extractos CGM y PGM se utilizó la técnica 3,5-DNS para la determinación de azúcares reductores presentes en las muestras y así conocer el grado de pureza de ambos extractos. Lo que ocurre durante esta técnica es la hidrólisis de polisacáridos presentes y una reacción redox entre el 3,5-DNS y los azúcares reductores presentes.

Para poder cuantificar la presencia de azúcares reductores en las muestras se realizaron curvas de calibración correspondientes a glucosa y manosa. Como se puede observar en la Fig.12 se graficaron los miligramos de Glucosa/Manosa con respecto a la absorbancia, para el caso de Glucosa el coeficiente de correlación resulta tener un mejor comportamiento con respecto al coeficiente de manosa.



**Fig. 12.** Curvas de calibración Glucosa/Manosa para el ensayo colorimétrico 3,5-DNS.

Una vez determinados los coeficientes de correlación, se utilizó la  $f(y)$  correspondiente a glucosa para obtener los (mg) de Glucosa/ Manosa presentes en las muestras PGM y CGM obteniendo los resultados que se muestran en la tabla 10.

Donde se evidencia que el glucomanano obtenido de la pulpa presenta un grado de pureza del 85%, siendo superior en comparación con el GM obtenido de la cáscara con un 71%. Por lo tanto cuando se realizan las extracciones de glucomanano utilizando la cáscara de xoconostle se extraen componentes no deseados para nuestro proceso. Esto debido a que en la cáscara se encuentra la mayor cantidad de minerales al igual que en las semillas del fruto [125].

**Tabla 10.** Determinación de azúcares reductores presentes en los extractos PGM y CGM mediante el ensayo colorimétrico 3,5-DNS.

Extracto 1.6 mg.	PGM	CGM
	3,5-DNS	3,5-DNS
Manosa y Glucosa soluble	1.362 mg.	1.145 mg.
% Pureza	85 %	71 %

Estos resultados mostraron una correlación con los datos obtenidos por cromatografía en capa fina.

### 7.3 Cromatografía en Capa Fina

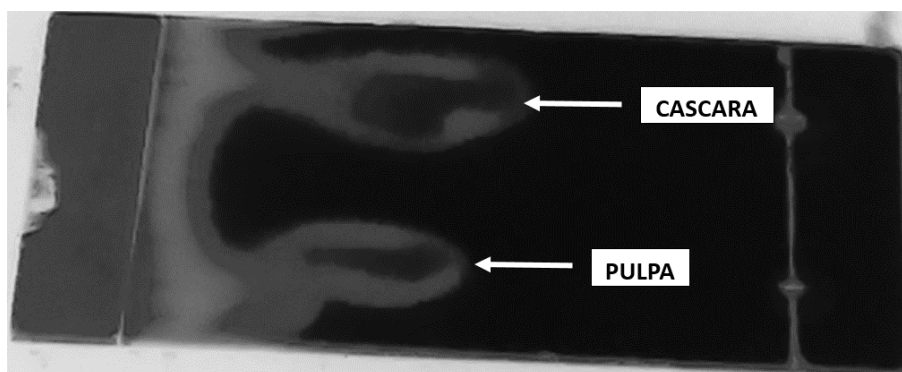
Esta técnica es útil para conocer la pureza de una sustancia. Se observó que el eluyente de elección por prueba y error fue acetona (Tabla 11) debido a la polaridad que presenta la molécula de glucomanano, los eluyentes más polares interaccionan mejor con moléculas más polares.

En el revelado de la placa (Fig. 13) para PGM se observa la presencia de un compuesto activo (glucomanano) en el UV que evita que el indicador absorba la luz en la zona en la que se encuentra el producto, y el resultado es la visualización de una mancha en la placa que indica la presencia de un compuesto.

En la muestra CGM se observa la presencia de dos compuestos dada la aparición de dos manchas en la placa, indicando una menor pureza del glucomanano de cáscara.

**Tabla 11.** Resultados de Cromatografía en capa fina

Eluyente	PGM	CGM
Acetato de Etilo	-----	-----
Cloruro de Metileno	-----	-----
Acetona	Marca	Marca
Metanol	-----	-----



**Fig. 13** Cromatografía en capa fina de PGM y CGM.

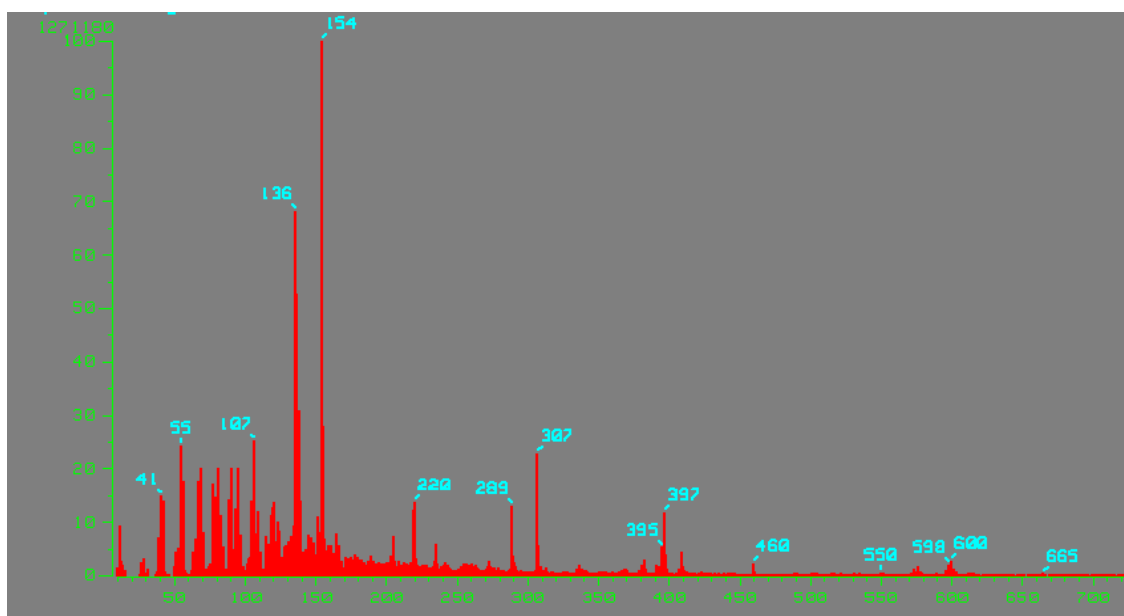
#### 7.4 Espectrometría de Masas

Demostado el grado de pureza la homología entre extractos se realizó espectrofotometría de masas (MS) al extracto con mayor pureza (PGM). La MS permite identificar compuestos por la producción de iones en fase gaseosa y su posterior separación y detección en función a la relación masa carga ( $m/z$ ), que confiere un alto nivel de especificidad.

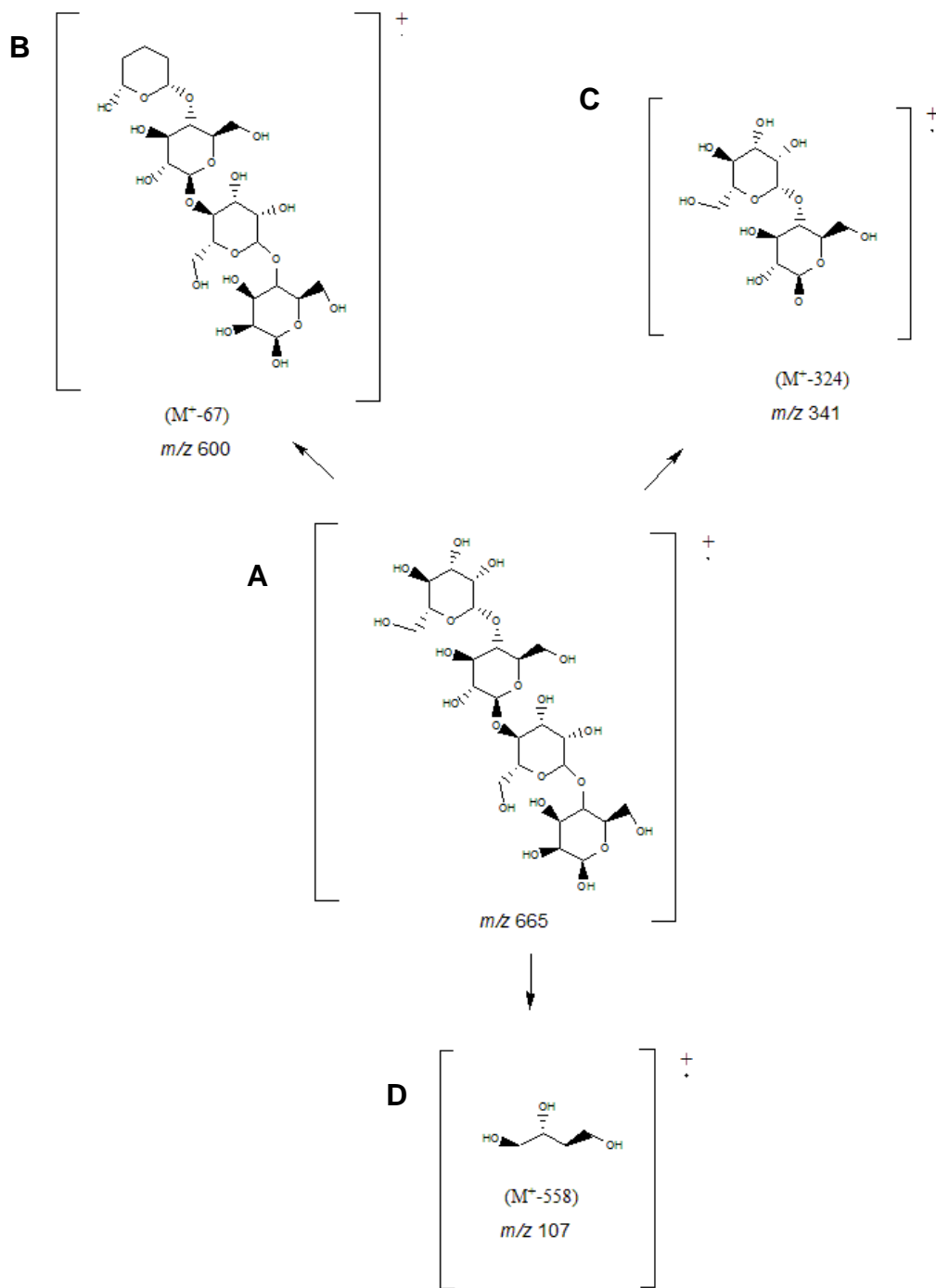
El espectro de masas (Fig. 14) permite observar el pico ion molecular del compuesto ( $m/z$  665  $M^+$ ) y confirma el peso molecular propuesto para  $C_{24}H_{42}O_{21}$ . Cada pico representa la fragmentación de la molécula, dando como resultado

distintos pesos moleculares que van de mayor a menor. Los picos con relación  $m/z$  600, 341 y 107 corresponden con el patrón de fragmentación que se propone en la Fig. 15.

La disociación inducida por colisión (CID) de glucomanano protonado ( $m/z$  665) dio lugar a una pérdida de grupos  $-OH$ , lo que lleva a la obtención del primer fragmento (B) ion molecular  $m/z$  600. La segunda disociación se generó por la ruptura del segundo enlace  $\beta 1-4$  del glucomanano, obteniendo la segunda fragmentación (C) ion molecular propuesta  $m/z$  341. Finalmente el fragmento (D)  $m/z$  107 se produjo por la pérdida de unidades de  $\beta$ -D-glucohexapiranosil,  $\beta$ -D-manohexapiranosil y ruptura de enlaces C2-C3, C5-O quedando la estructura propuesta para ese ion molecular.



**Fig. 14.** *Espectro de glucomanano (PGM) resultante de ionización por electrospray, cada pico representa un estado de carga diferente y la masa de las especies.*



**Fig. 15.** Patrón de fragmentación de glucomanano. (A) Mólcula de Glucomanano, (B, C, D) patrones de fragmentación a partir de glucomanano.

La diferencia de intensidad entre los picos ion molecular que se muestran en el espectro de masas (Fig.14), se debe a que los iones del analizador de masas

detectados por un multiplicador de electrones y la cantidad de corriente eléctrica generada posteriormente al procesamiento de datos dependerá de la abundancia de dichos iones impactando sobre el detector. Por lo tanto, los picos de mayor intensidad se generaron por la gran abundancia de iones que estos presentan en el momento de ser detectados. Los picos seleccionados por lo tanto, para los patrones de fragmentación fueron los de mediana o menor señal dado que se buscaron los fragmentos que tuvieran una mayor estabilidad molecular. Con este análisis se corroboró que la molécula obtenida a partir de la pulpa y cáscara de xoconostle corresponde firmemente a glucomanano [126].

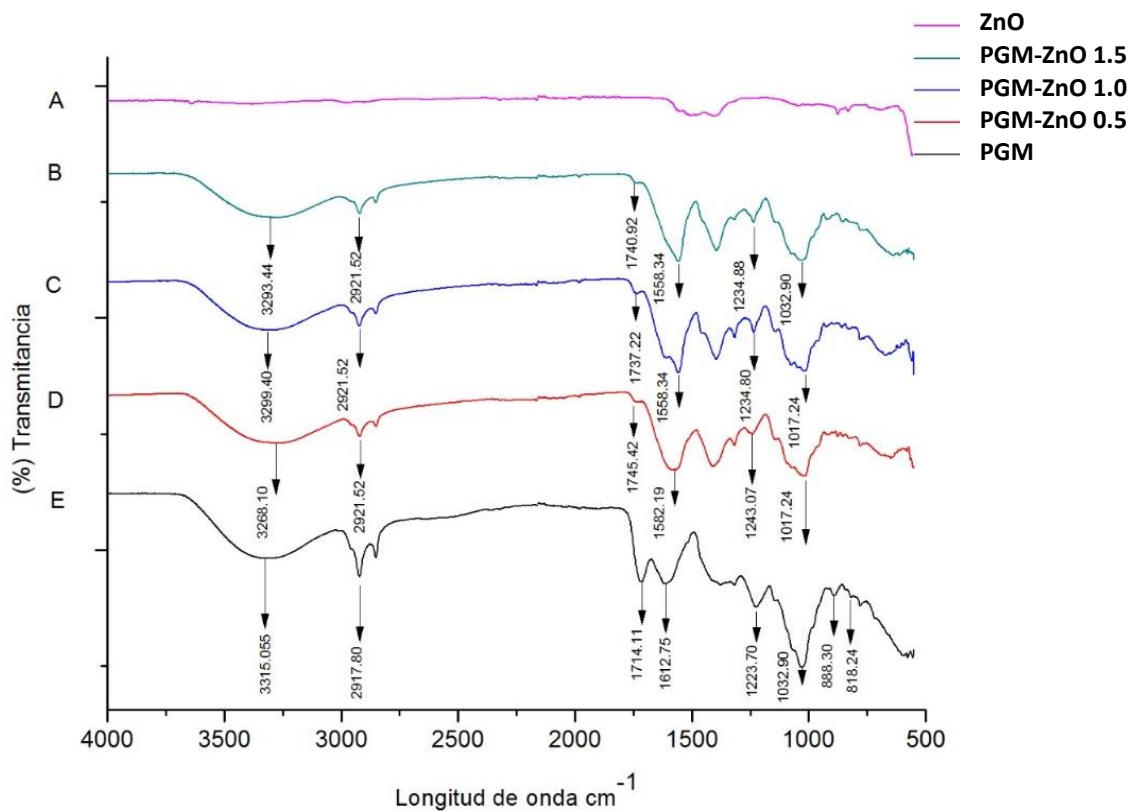
### **7.5 Técnica de espectroscopía de transformada de Fourier (FTIR).**

La espectroscopia de transformada de Fourier es una técnica que proyecta un haz de luz monocromático sobre la muestra, iluminando con un rayo que contiene muchas frecuencias de luz a la vez el cual y mide la cantidad de ese rayo que absorbe la muestra. A continuación, el haz se modifica para que contenga una combinación diferente de frecuencias, dando un segundo punto de datos. Posteriormente, los datos son procesados para inferir cuál es la absorción en cada longitud de onda. El procesamiento requerido resulta ser un algoritmo común llamado transformada de Fourier (de ahí el nombre "espectroscopía de transformada de Fourier").

Una FTIR fue aplicada para el estudio de ambos tipos de glucomanano PGM y CGM, los espectros muestran un modo de absorción en  $3315.0\text{ cm}^{-1}$  tipo alargamiento de los grupos hidroxilos ( $\nu_{\text{O-H}}$ ). Hacia  $2917\text{ cm}^{-1}$ , se localizan los modos de vibración tipo alargamiento ( $\nu_{\text{Csp}2\text{-H}}$ ), así como el modo de vibración del  $\text{CH}_3$  fuera de fase degenerada  $\delta_{\text{CH}_3}$ . En  $2849.9\text{ cm}^{-1}$  se presenta el modo de vibración de estiramiento ( $\nu_{\text{Csp}2\text{-H}}$ ). Las bandas a  $1612.75$ ,  $1714\text{ cm}^{-1}$  y  $1588.9$ ,  $1717.84$  en PGM y CGM respectivamente, se localizan las vibraciones de tipo alargamiento simétricas  $\nu_{\text{C=O}}$  y el modo de vibración de doblaje de deformación fuera de fase degenerado  $\delta^{\text{as}}_{\text{CH}_3}$ . Las bandas de absorción localizadas en

1223.70 y 1243.07  $\text{cm}^{-1}$  (PGM y CGM) son asignadas al modo de vibración tipo alargamiento de los grupos C-C ( $\nu_{\text{C-C}}$ ), y C-O ( $\nu_{\text{C-O}}$ ). Las bandas ubicadas en 1032  $\text{cm}^{-1}$  corresponden al modo de vibración ( $\nu_{\text{CH}_2}$ ) tipo balanceo, así como también se le asocia al modo de vibración ( $\nu_{\text{C-O-C}}$ ). Hacia regiones de baja energía del espectro infrarrojo en 888, 818 y 884, 818  $\text{cm}^{-1}$  se ubica el modo de vibración ( $\gamma_{\text{O-H}}$ ) y ( $\gamma_{\text{C-H}}$ ), de doblaje fuera del plano.

En las figuras 16 y 17 (A) se presenta el espectro de FTIR del nanoreservorio ZnO el cual muestra una banda de absorción ubicada en 3642.4  $\text{cm}^{-1}$ , representa al modo de vibración molecular de los grupos hidróxidos terminales ( $\nu_{\text{O-H}}$ ), enlazados en las aristas de los átomos de Zn del nanocatalizador (ZnO). En 3403.0  $\text{cm}^{-1}$  se presenta el modo de vibración tipo alargamiento de los grupos hidroxilos ( $\nu_{\text{O-H}}$ ) asignados a los grupos hidroxilos ( $\text{OH}^-$ ) del agua (H-OH), solvente (etanol, R-OH) y a la hidroxilación del nanocatalizador (Zn-OH). La banda de adsorción localizada entre 1035.88  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a vibraciones de tipo alargamiento de los grupos C-C ( $\nu_{\text{C-C}}$ ), y C-O ( $\nu_{\text{C-O}}$ ), las cuales se deben a especies metoxipiente, así como a solventes, productos y subproductos de la reacción de síntesis del material. Hacia 561.1  $\text{cm}^{-1}$  se ubica el modo de vibración de tipo flexión ( $\nu_{\text{Me-O}}$ ), de las interacciones metal-oxígeno de los grupos Zn-O [129].

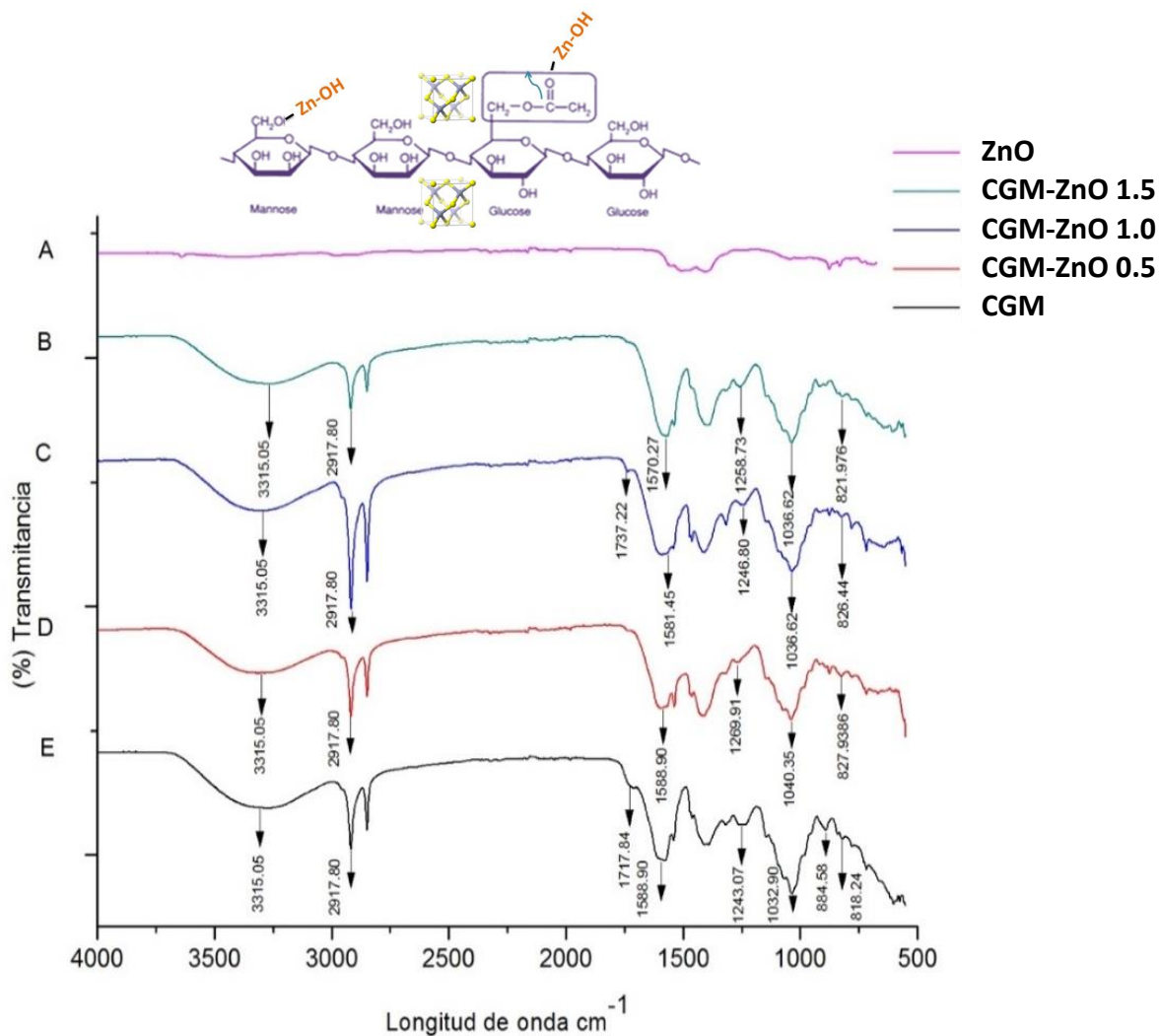


**Fig. 16.** Espectros de IR (A) ZnO, (B) PGM-ZnO 1.5, (C) PGM-ZnO 1.0, (D) PGM-ZnO 0.5, (E) PGM.

Después de la caracterización de Glucomanano y ZnO, se sintetizaron las nanomatrices con ZnO a diferentes concentraciones. En la Fig. 16 se muestran los espectros FTIR (B, C, D) de las nanomatrices sintetizadas PGM-ZnO.

Se observan diferencias entre los espectros de nanomatrices en relación con PGM y ZnO; las intensidades de las bandas se ven disminuidas, las bandas de absorción en 1714.11 y 1612.75  $\text{cm}^{-1}$  presentes en PGM se ven afectadas en los espectros (B, C, D) sugiriendo una modificación al modo vibracional del enlace  $\nu_{\text{C=O}}$  evidenciado con el desplazamiento de la primera banda a 1745.42, 1737.22, 1740.92  $\text{cm}^{-1}$  y 1582.19, 1558.34, 1558.34  $\text{cm}^{-1}$  (B, C, D), respectivamente. La banda de absorción en 2917.80  $\text{cm}^{-1}$  situada en el espectro PGM se presenta en las nanomatrices con menor intensidad y desplazamientos a 2921.52 en los tres espectros, evidenciando el enlace (-CH) propio del GM. Las interacciones del ZnO

con PGM afectaron los modos vibracionales de C-O-C que corresponden a las bandas de absorción  $1032.90$  y  $1223.70\text{ cm}^{-1}$ . Se confirma la interacción del ZnO con PGM en las nanomatrices por la presencia de las bandas a  $561\text{ cm}^{-1}$  (B, C, D) que corresponden al enlace ( $\nu_{\text{Zn-O}}$ ). Se observa que al aumentar la concentración de glucomanano en la síntesis de las nanomatrices, las interacciones del ZnO con el glucomanano van disminuyendo esto se explica por la disminución en las bandas progresivamente a  $561\text{ cm}^{-1}$ .



**Fig. 17.** Espectros de IR (A) ZnO, (B) CGM-ZnO 1.5, (C) CGM-ZnO 1.0, (D) CGM-ZnO 0.5, (E) CGM.

En la figura 17 se presentan los espectros FTIR correspondientes a las nanomatrices sintetizadas con glucomanano extraído de la cáscara. La banda de

absorción presente en CGM a  $29717.80\text{ cm}^{-1}$  no presenta algún cambio en las nanomatrices (B, C, D) en comparación con PGM. A  $1717.84$  también se observan desplazamientos a  $1737.22\text{ cm}^{-1}$  y disminución en la intensidad de las bandas en las nanomatrices debido a la modificando al modo vibracional del enlace  $\nu_{\text{C=O}}$ . También se mostraron los cambios en los modos vibracionales de C-O-C que corresponden a las bandas de absorción  $1032.90$  y  $1243.07\text{ cm}^{-1}$  ( $1269.91$ ,  $1040.35$ ) ( $1246.80$ ,  $1036.62$ ) ( $1258.73$ ,  $1036.62$ ) en B, C y D respectivamente. La interacción del ZnO con CGM en las nanomatrices también se mostró a  $500\text{ cm}^{-1}$  (B, C, D) que corresponden al enlace ( $\nu_{\text{Zn-O}}$ ). Se confirma que en el glucomanano de cáscara también se presenta el mismo comportamiento en el enlace Zn-O al aumentar la concentración de glucomanano en la síntesis de las nanomatrices.

## 7.6 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

El fundamento de la microscopia electrónica de barrido radica en que los electrones emitidos por un cátodo de tungsteno pasa a través de una columna en la que se a hecho un vacío al rededor de  $10^{-7}$  Torr. En ella el haz inicial es concentrado por una serie de lentes electromagnéticos que producen una disminución de su diámetro hasta hacerse casi puntual ( hasta unos  $10\text{ nm}$ ). Al mismo tiempo , la intensidad de corriente se disminuye desde unos  $10^{-14}\text{ A}$  hasta unos  $10^{-10}\text{ A}$ . Esta disminución en la intensidad implica una menor cantidad de electrones primarios. El haz de electrones con estas ultimas características, es decir en forma puntual, es desplazado sobre toda la superficie de la muestra a modo de un pincel que va barriendo la muestra con continuas idas y venidas.

Esta tecnica fue aplicada a los diferentes compuestos. La figura 18A presenta la micrografía del nanoreservorio de ZnO, se observan aglomerados de partículas cristalinas tipo zincita hexagonal bien definidas, con un promedio de tamaño de  $89\text{ nm}$  y de acuerdo a la escala nanométrica de los materiales, la nanomatriz de ZnO si corresponde a un nanomaterial.

La micrografía (B) muestra el encapsulado PGM-ZnO 0.5 en donde se observa un incremento en el tamaño de partícula (95 nm); dado que el glucomanano se encuentra en menor concentración en comparación con el ZnO permite que las condiciones sean favorables para que el ZnO pueda coordinar al glucomanano en el sitio  $\text{CH}_2\text{OH}$ , siendo visible una estructura amorfa en general y algunos cristales de óxido de zinc que no interaccionan con el glucomanano.

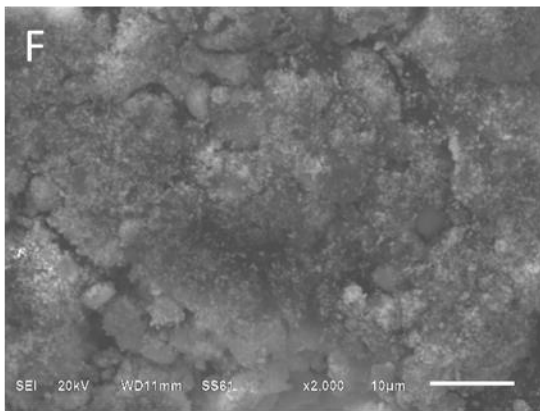
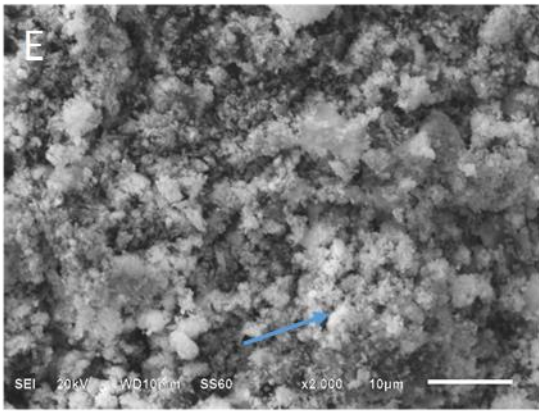
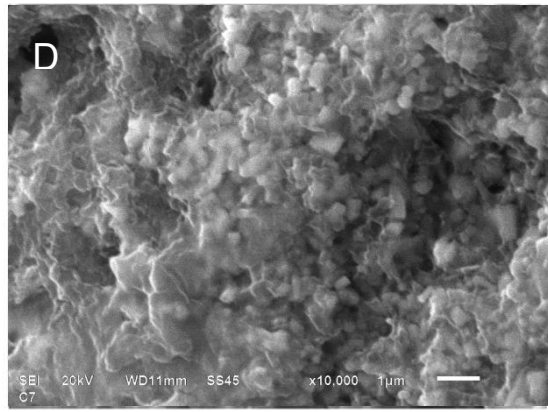
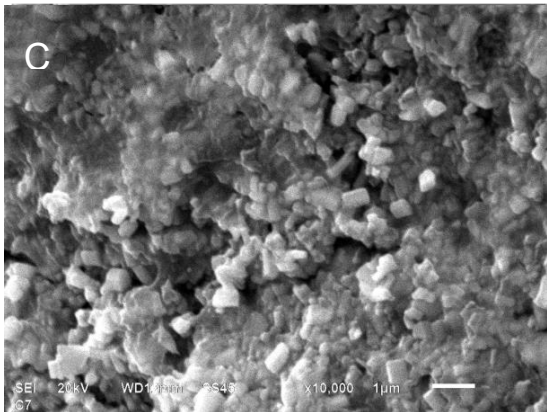
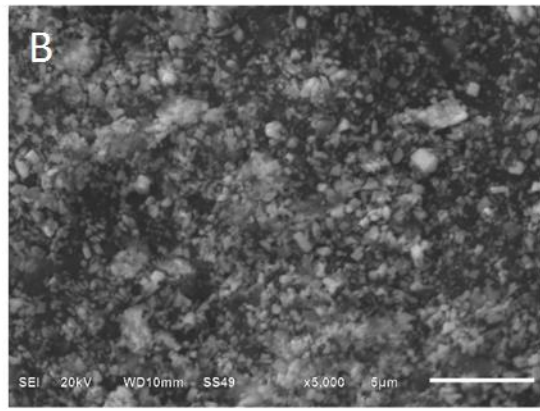
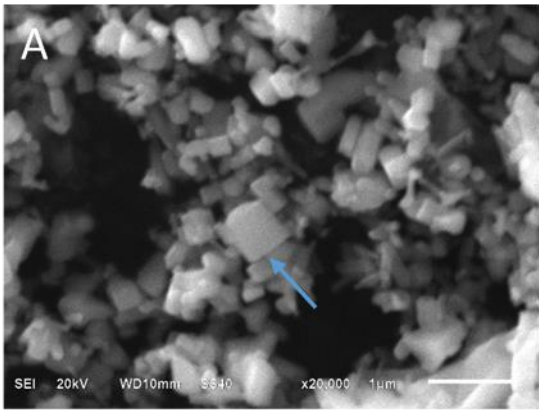
Cuando se igualan las concentraciones de glucomanano con óxido de zinc PGM-ZnO 1.0 (C), los estudios revelan que bajo estas condiciones se forma un aglomerado de partículas que tienden a formar una película, se observan menos interacciones del ZnO con el glucomanano. El tamaño de partícula que se obtuvo a esta concentración fue de 100 nm.

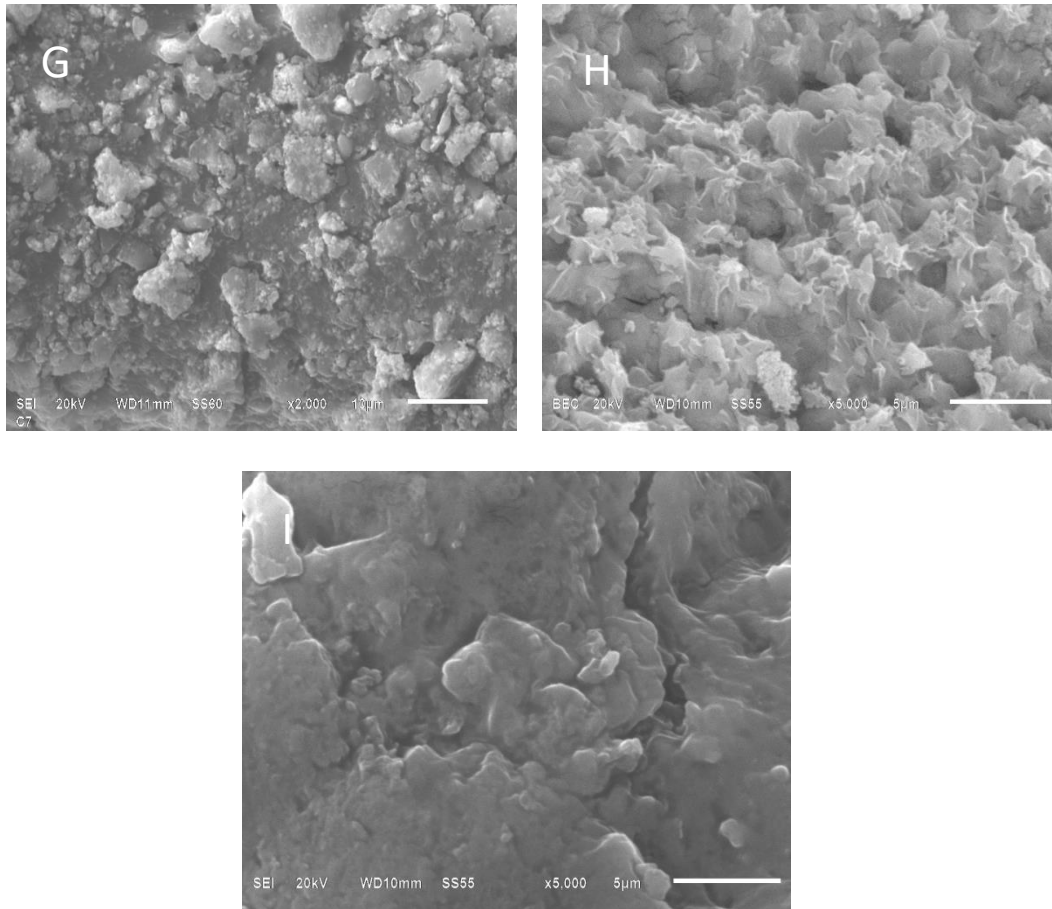
Al aumentar la concentración de glucomanano PGM-ZnO 1.5 (D) se observa que las interacciones del ZnO disminuyen en la molécula de glucomanano, originándose una estructura más compacta y amorfa. Con un tamaño de partícula de 98 nm.

La micrografía (E) muestra a CGM-ZnO 0.5, en donde se observan estructuras más amorfas y se pueden notar las modificaciones en las estructuras del nanomaterial, el tamaño de partícula es 96 nm.

Para CGM-ZnO 1.0 (F), en estas condiciones del encapsulado se observa una estructura que forma una película más uniforme y compacta en comparación con PGM-ZnO bajo las mismas condiciones, también disminuye la presencia del ZnO.

El aumento de la concentración de glucomanano GC-ZnO-1.5 (G) en la micrografía revelan estructuras totalmente amorfas y en donde el ZnO presenta muy pocas interacciones en la molécula de glucomanano, con un tamaño de partícula de 93 nm.





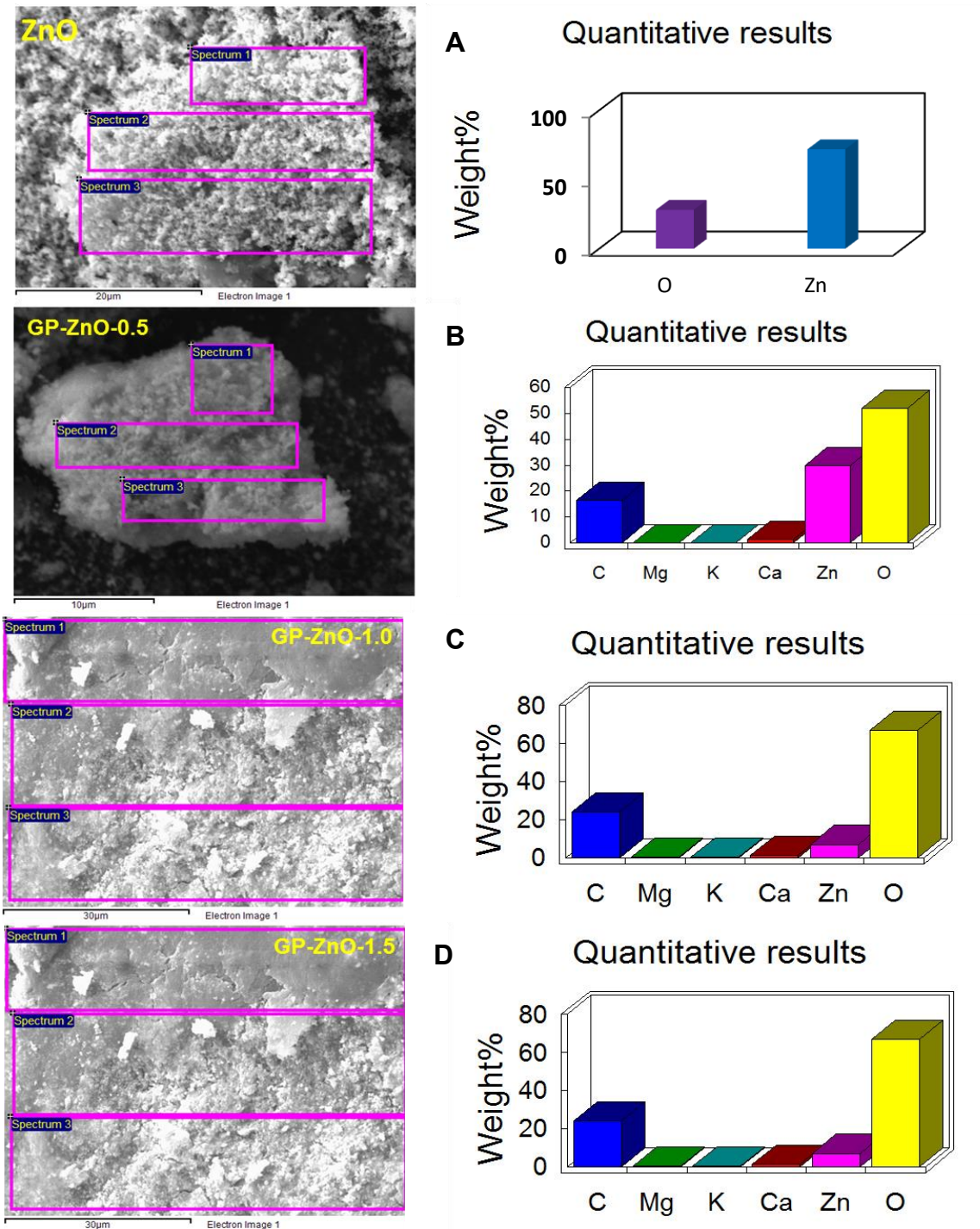
**Fig. 18.** Análisis de Microscopía Electrónica de Barrido **(A)** Fotomicrografía ZnO. **(B)** Fotomicrografía PGM-ZnO 0.5. **(C)** PGM-ZnO 1.0. **(D)** PGM-ZnO 1.5. **(E)** CGM-ZnO 0.5. **(F)** CGM-ZnO 1.0. **(G)** CGM-ZnO 1.5. **(H)** PGM. **(I)** CGM. Las ampliaciones mostradas corresponden a 20,000X, 10,000X, 5,000X y 2,000X como se indica en cada microfotografía.

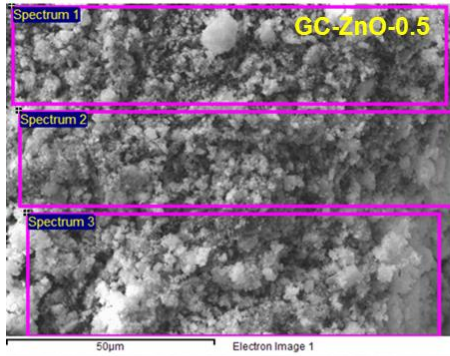
En la micrografía (H) se muestra el glucomanano (PGM), con una forma característica del glucomanano reportado de KGM. La micrografía muestra un material amorfo y con una superficie rugosa con un tamaño de aproximadamente 2400 nm.

La micrografía del glucomanano a partir de la cascara (Fig. 18I), muestra un material amorfo, presentando un superficie más densa respecto al glucomanano a partir de la pulpa con un tamaño de partícula menor que el de PGM, 1200 nm.

## 7.7 Espectrómetro de energía dispersa (EDS)

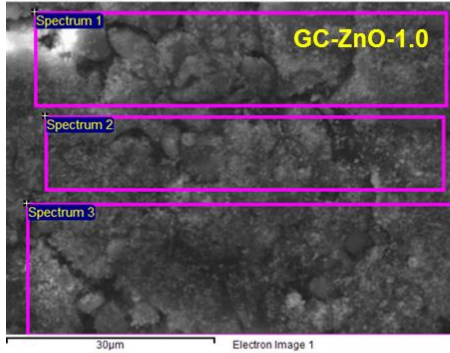
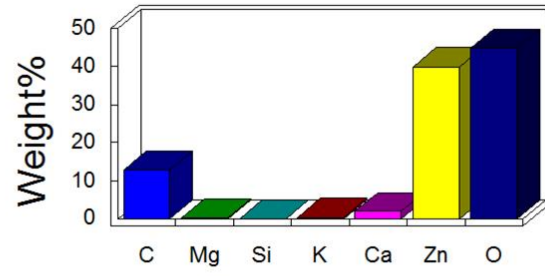
El Detector de Energía Dispersiva EDS, permite coleccionar Rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis de composición química e imágenes de distribución de elementos presentes en la muestra. Con esta técnica se obtuvieron los resultados mostrados a continuación.





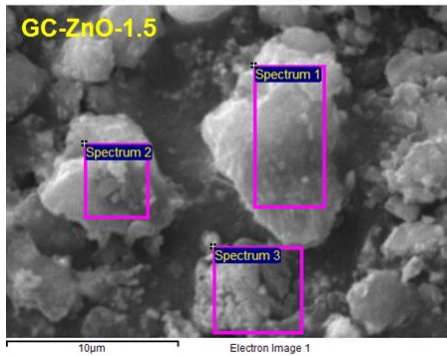
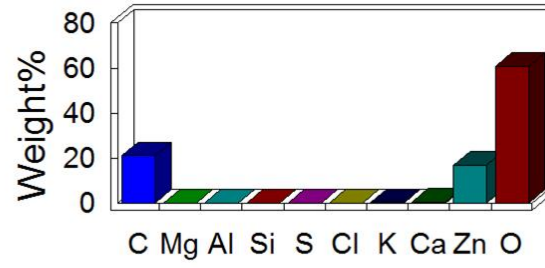
**E**

Quantitative results



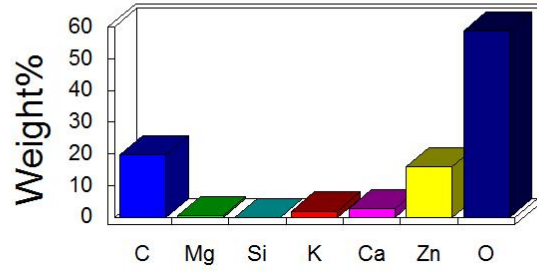
**F**

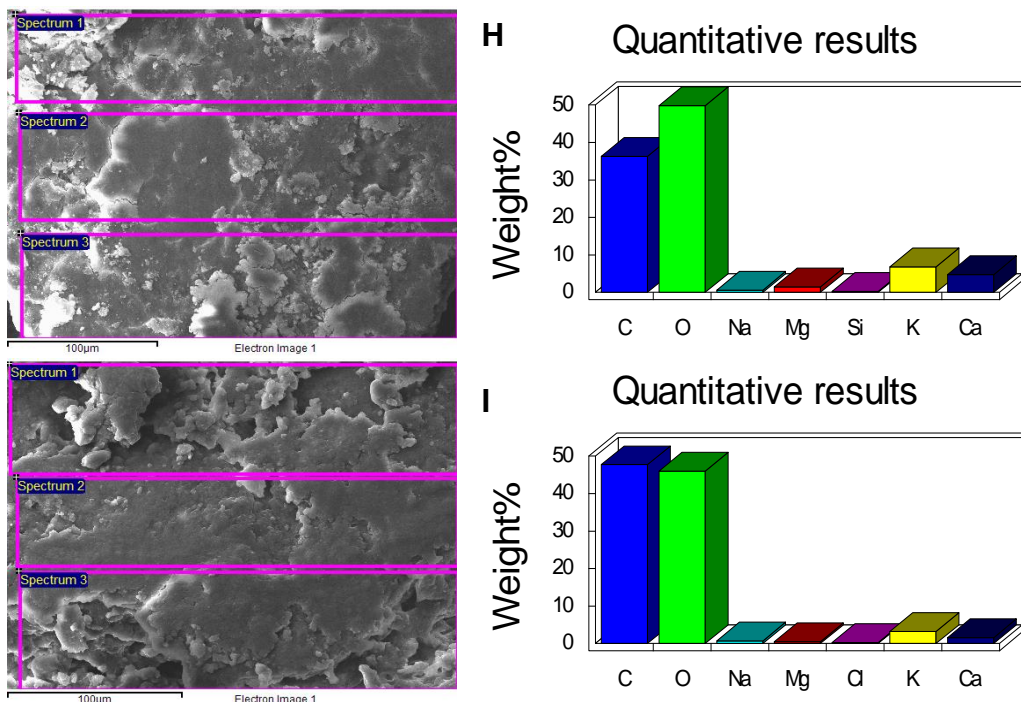
Quantitative results



**G**

Quantitative results





**Figura 19.** SEM (EDS) de las nanomatrices de glucomanano-ZnO, PGM, CGM y ZnO **(A)** ZnO. **(B)** PGM-ZnO-0.5. **(C)** PGM-ZnO-1.0. **(D)** PGM-ZnO-1.5. **(E)** CGM-ZnO-0.5. **(F)** CGM-ZnO-1.0. **(G)** CGM-ZnO-1.5. **(H)** PGM. **(I)** CGM. Las ampliaciones mostradas a un área de análisis de 10, 20, 30 y 50  $\mu\text{m}$ , según se indica en la fotomicrografía de la izquierda.

Los resultados por SEM (EDS) muestran de forma semicuantitativa el porcentaje de cada elemento (átomo) presente en las nanomatrices sintetizadas.

En la Fig. 19A, se muestra el análisis químico para el ZnO, el cual presenta un porcentaje en masa de oxígeno de 28.12 y de zinc de 71.88, estos resultados nos llevan a la estipulación de una fórmula empírica para la nanomatrix de ZnO de  $\text{ZnO}_{1.6}$  respecto a la fórmula estructural del ZnO.

Los datos de PGM-ZnO 0.5 (19B), demuestran un incremento en el porcentaje de oxígeno (54.54 %) y la aparición de carbono (17.85 %) que corresponden a átomos propios de la estructura del glucomanano; disminuyendo así el porcentaje de Zinc (26.04 %) en la muestra. Además se observó la presencia de los microelementos de magnesio (0.17%), potasio (80.24%), calcio (1.15%).

Al igualar las concentraciones de glucomanano y ZnO (19C) el porcentaje de oxígeno tiende a aumentar (58.67%) considerablemente por la presencia de oxígenos en el óxido de zinc y en el glucomanano, así también aumenta el

porcentaje de carbonos (19.92 %) y se ve afectado el porcentaje de zinc (18.26 %). Esta afectación en el zinc se debe al incremento de la concentración de GM en la cuál con los estudios revelados en SEM, FTIR, las interacciones del ZnO en el glucomanano son poco frecuentes.

En la fig. 19D (PGM-ZnO 1.5) se observa que los porcentajes de carbono (24.14 %) y oxígeno (66.83 %) son similares, a excepción del Zn (6.99 %) en donde su porcentaje es menor a medida que se va aumentando la concentración de GM.

El análisis químico de la nanomatriz de glucomanano cáscara a baja concentración (19E) nos muestra el porcentaje de zinc (31.79 %), el porcentaje de carbono (15.81 %) y oxígeno (50.64%).

En la Fig. 19F (CGM-ZnO 1.0) se observan las zonas analizadas, indicando un incremento en el porcentaje de carbono (19.92 %) y oxígeno (58.71 %) con respecto a la concentración anterior. También se observa la disminución del Zn (19.08%).

Cuando la concentración de glucomanano es superior a la del óxido de zinc (19G) los porcentajes de carbono (20.82%) y oxígeno (68.31%) tienden a aumentar y el zinc disminuir (15.98%).

En la Fig. 19H se observan los porcentajes correspondientes a carbono (36.26 %) y oxígeno (49.80 %) propios de la molécula de glucomanano obtenida de pulpa. De igual forma aparecen elementos trazas. Por otro lado en la Fig. 19I correspondiente a CGM se pueden observar los porcentajes de carbono (47.69 %) y oxígeno (46 %) propios de la molécula.

## **7.8 DRX**

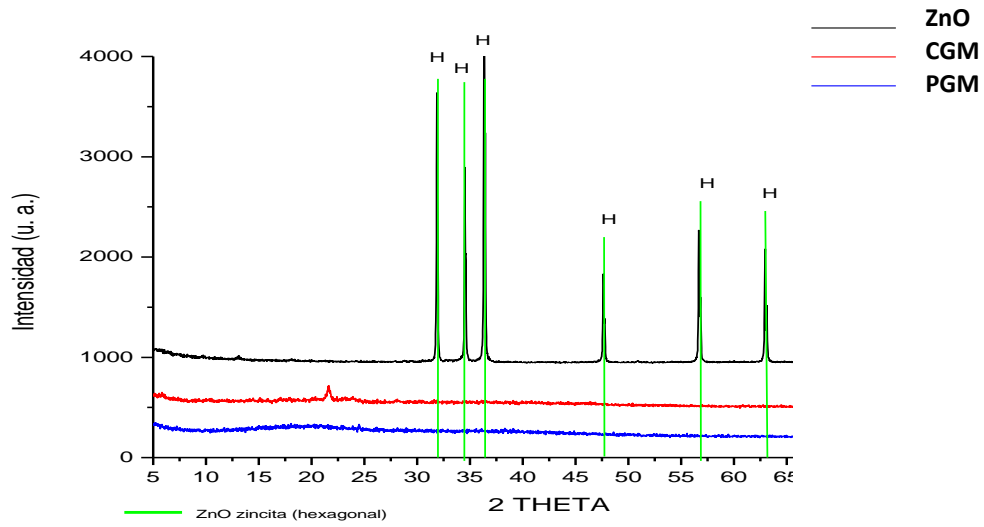
La difracción de rayos X es uno de los fenómenos físicos que se producen al interaccionar un haz de rayos X, de una determinada longitud de onda, con una sustancia cristalina. La difracción de rayos X se basa en la dispersión coherente del haz de rayos X por parte de la materia (se mantiene la longitud de

onda de la radiación) y en la interferencia constructiva de las ondas que están en fase y que se dispersan en determinadas direcciones del espacio.

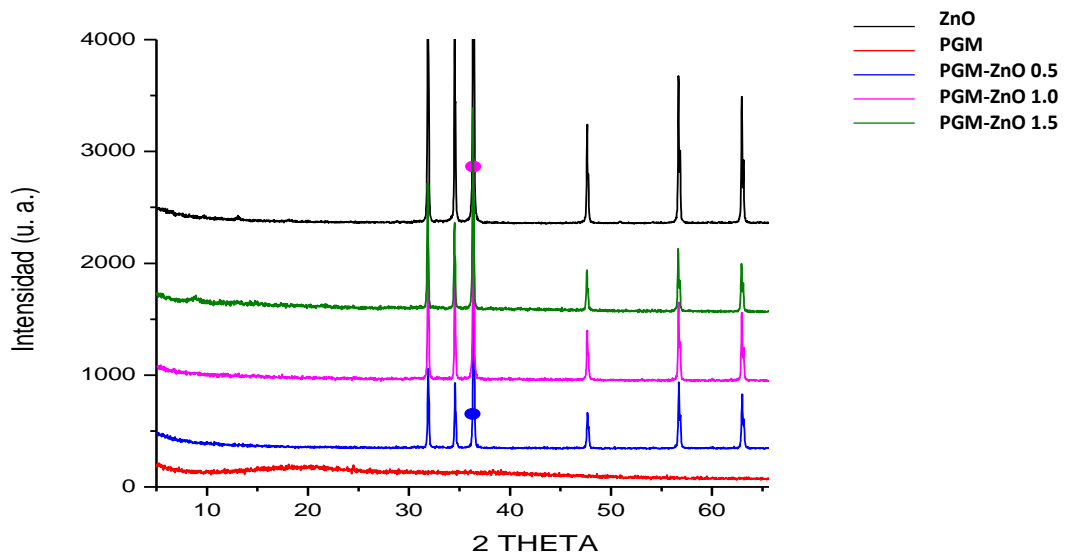
Los difractogramas del nanomaterial de ZnO, PGM y CGM, se muestran en la figura 20. En el patrón de difracción de rayos X del nanopolvo de ZnO los picos de difracción ubicados a  $31.84^\circ$ ,  $34.52^\circ$ ,  $37.00^\circ$ ,  $47.63^\circ$ ,  $56.71^\circ$ ,  $62.96^\circ$  han sido indexados como fase de zincita hexagonal de ZnO, según la base de datos utilizada [131, 132].

Los difractogramas de rayos X de PGM indican que el patrón de DRX muestra un reflejo débil pero amplio que cae a aproximadamente  $2\theta = 20^\circ$  evidenciando que la muestra es amorfa. Se ha reportado que KGM tiene un cristal hidratado de baja cristalinidad en la misma posición [130]. En CGM el difractograma muestra un reflejo a  $2\theta = 22^\circ$ , se observa un ligero desplazamiento y un pico más definido en comparación con PGM.

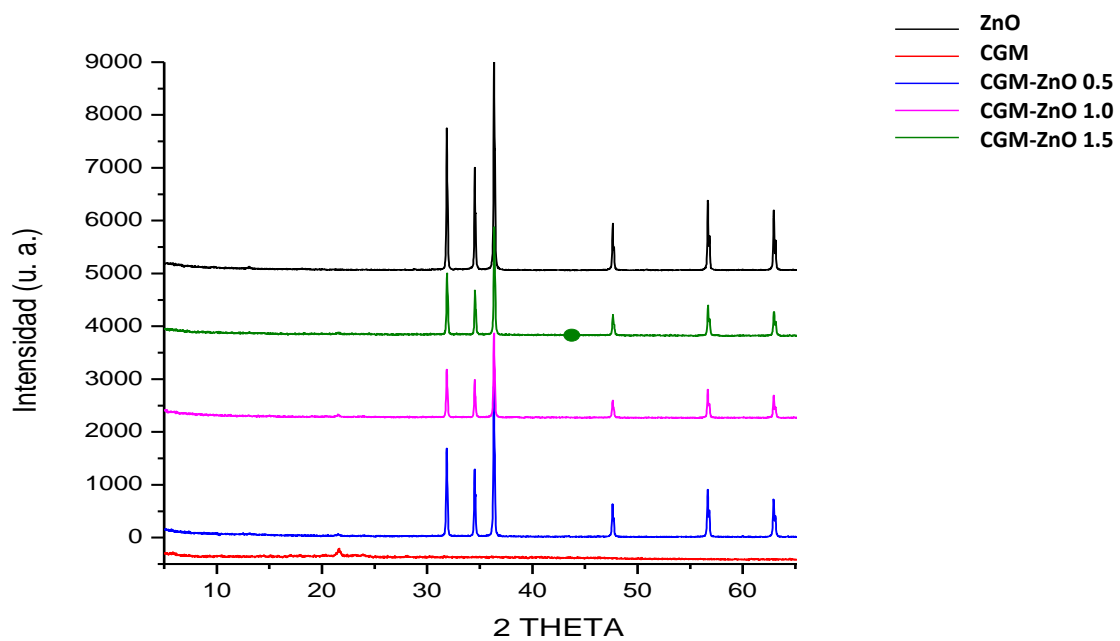
Los difractogramas de los nanomateriales (PGM-ZnO y CGM-ZnO) a diferentes concentraciones (0.5, 1.0 y 1.5), se muestran en la figura 10 y 11; se pueden apreciar los picos característicos del ZnO en todos los difratogramas, la estructura amorfa del glucomanano no se observa a simple vista dado que la intensidad que presenta es muy baja en comparación con los picos del ZnO, aproximadamente representa un 3.7% del pico de ZnO a  $2\theta = 37^\circ$ . Con este análisis se muestra la presencia de Glucomanano y ZnO en los diferentes nanomateriales.



**Fig. 20.** Difractogramas del nanomaterial de ZnO y del glucomanano a partir de la cáscara y pulpa.



**Fig. 21.** Difractogramas de los nanomateriales de glucomanano con ZnO, PGM y ZnO.

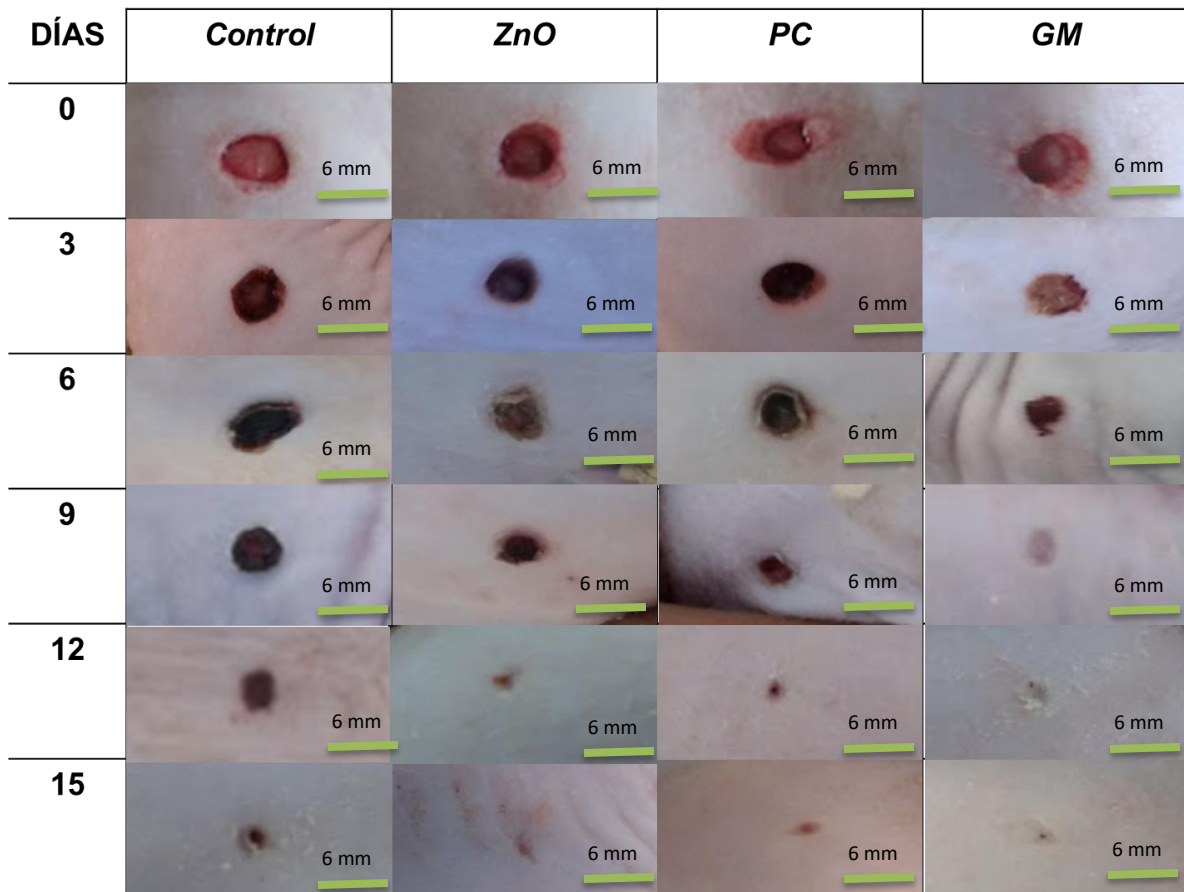


**Fig. 22.** Difractogramas de los nanomateriales de glucomanano con ZnO, CGM y ZnO.

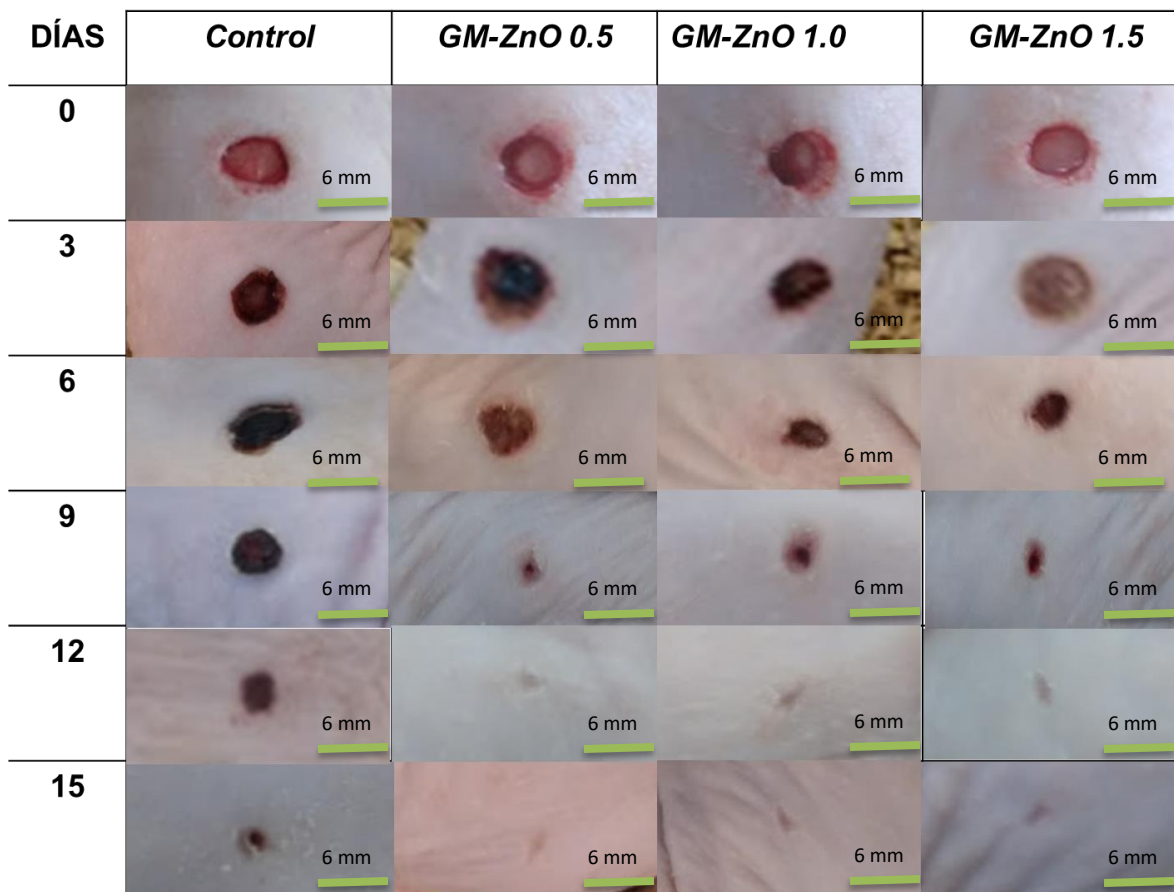
## **VIII RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LAS NANOMATRICES GM-ZnO EN UN MODELO DE RATA NUDE**

### **8.1 Evaluación cuantitativa de cierre por segunda intención con nanomatrices GM-ZnO**

Se realizó la evaluación en un modelo de rata nude para demostrar de manera contundente el efecto de cierre de segunda intención que ejercen las nanomatrices sintetizadas. Las imágenes fueron capturadas durante 15 días, en la figura 23 y 24 se observa de forma clara la reparación tisular de los animales tratados con ZnO, PC, GM y las nanomatrices GM-ZnO (0.5, 1.0, 1.5), respecto al grupo control. Los resultados nos indican que el grupo control mostró una retracción gradual (%) del sitio de lesión durante el día 3 (5 %), 6 (15%), 9 (18 %), 12 (28 % ), 15 (48 %). Por otra parte en el grupo tratado únicamente con ZnO, denotó un porcentaje de retracción de la lesión del 10, 21, 35, 53, 83 % respectivamente. Así mismo la administración de PC registró un 6, 20, 33, 56, 80 % a los 3, 6, 9, 12 y 15 días. Finalmente los datos obtenidos del grupo tratado con GM mostraron mejores resultados correspondiendo al 15 % a los 3 días, 30 % a los 6 días, 55 % a los 9 días, 87 % a los 12 días y 100 % a los 15 días ( Fig. 23 ).



**Fig. 23** Evaluación cualitativa del cierre por segunda intención en modelo de rata nude con ZnO, PC, GM. Se emplearon 30 ratas macho nude, con una lesión de 6 mm de diámetro.

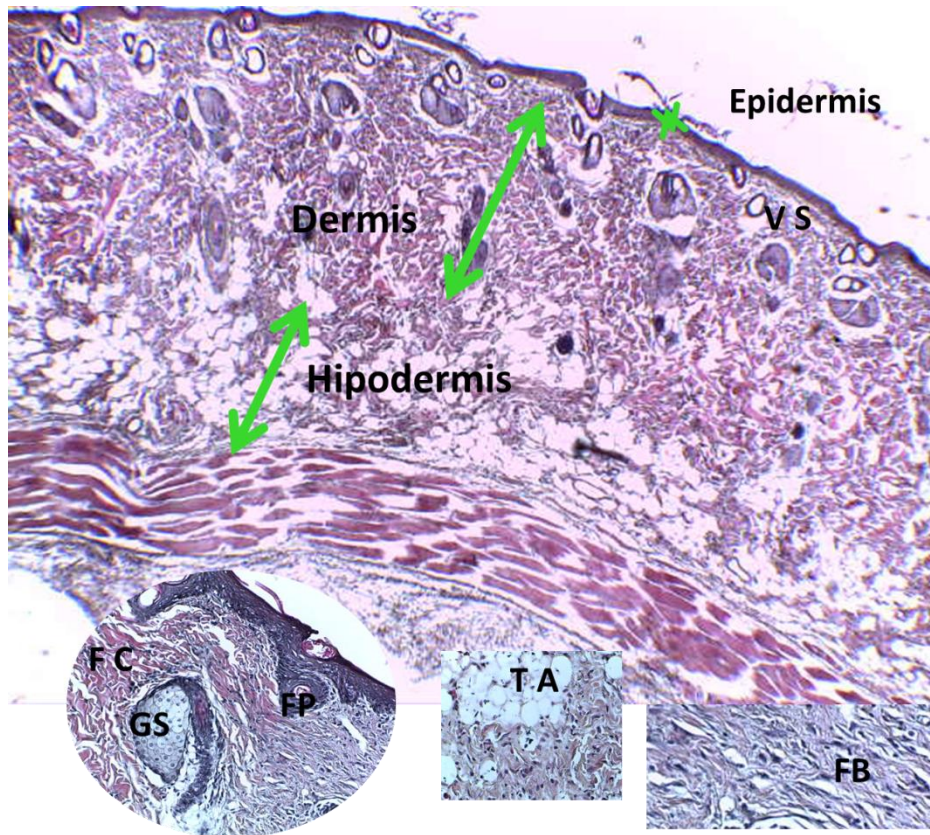


**Fig. 24.** Evaluación cuantitativa del cierre por segunda intención en modelo de rata nude con nanomatrices de GM-ZnO. Se emplearon 30 ratas macho nude, con una lesión de 6 mm de diámetro.

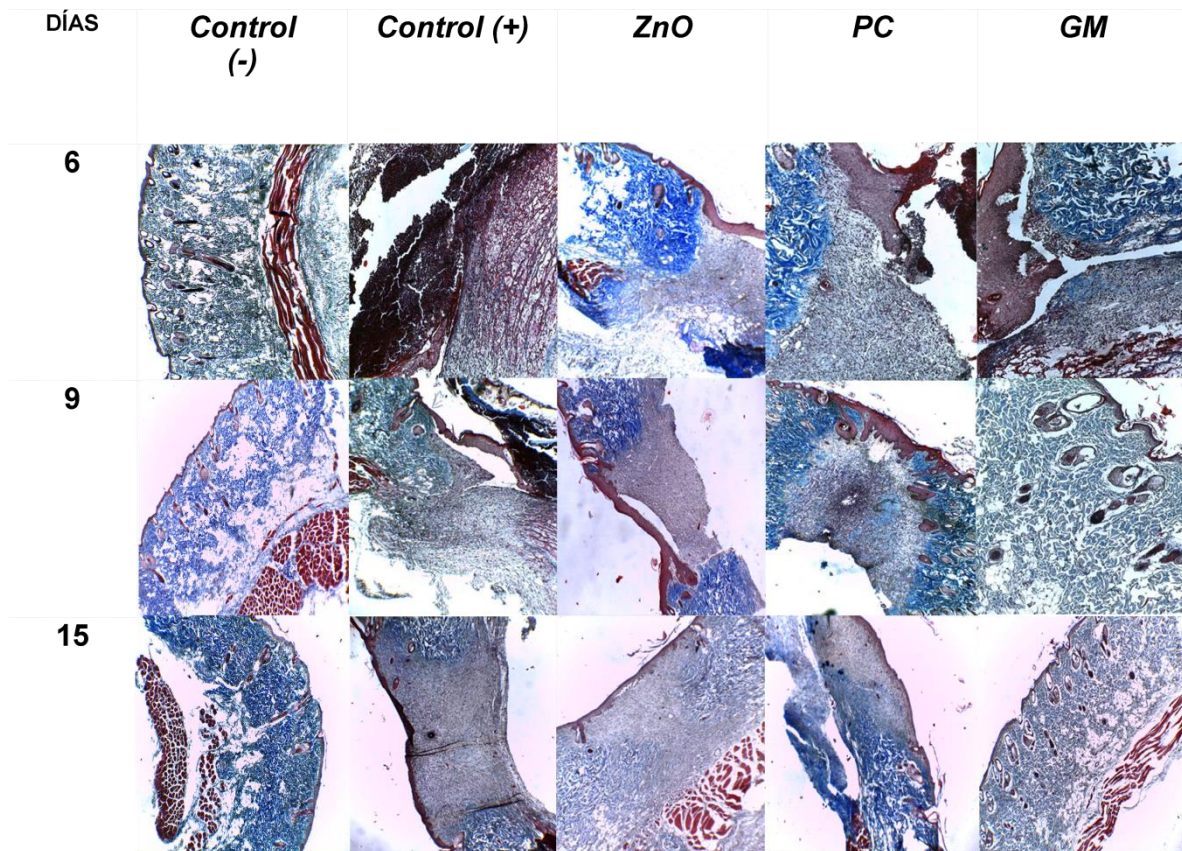
Los tratamientos con las nanomatrices GM-ZnO (Fig. 24) presentan similitudes en cuanto al comportamiento durante los días de tratamiento.

Los resultados nos indican que el grupo tratado con GM-ZnO 0.5, denotó un porcentaje de retracción de la lesión del 6, 22, 47, 78, 90 % respectivamente. Así mismo la administración de GM-ZnO 1.0 registró un 7, 29, 43, 72, 87 % a los 3, 6, 9, 12 y 15 días. Finalmente los datos obtenidos del grupo tratado con GM-ZnO 1.5 fueron 6 % a los 3 días, 26 % a los 6 días, 48 % a los 9 días, 74 % a los 12 días y 89 % a los 15 días. En comparación con los grupos tratados con ZnO y PC al finalizar los tratamiento, se obtienen porcentajes de retracción superiores en los grupos tratado con nanomatrices de GM-ZnO.

Sin embargo cuando se aplicó el tratamiento únicamente con GM se llegó a un porcentaje de retracción del 100%, evidenciando el potencial de esta molécula.



**Fig. 25.** Composición estructural de la Piel de rata nude (cepa desnuda). (FC) Fibras de colágeno, (GS) Glándulas Sebáceas, (FP) Folículos pilosos, (TA) Tejido Adiposo, (FB) Fibroblastos y (VS) Vasos sanguíneos.



**Fig. 26.** Evaluación histológica del cierre por segunda intención en modelo de rata nude con ZnO, PC y GM. Se emplearon 30 ratas macho nude, con una lesión de 6 mm de diámetro. (Tinción tricrómica de Masson).

Se obtuvieron así mismo los cortes histológicos correspondientes a los tiempos 6, 9 y 15 días de tratamiento. La tinción tricrómica se utilizó para poder identificar la presencia de fibras de colágeno y el tejido conectivo en general respecto a otros tipos celulares. La tinción H & E se utilizó para diferenciar estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura, como por ejemplo los núcleos celulares; y el uso de eosina que tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa. En la figura 26 y 28 se muestran los controles positivos y negativos, los grupos con tratamiento ZnO, PC y GM teñidas con Tricrómica de masson y H & E. El control negativo únicamente fue utilizado para observar la estructura de la piel propia de la rata nude.

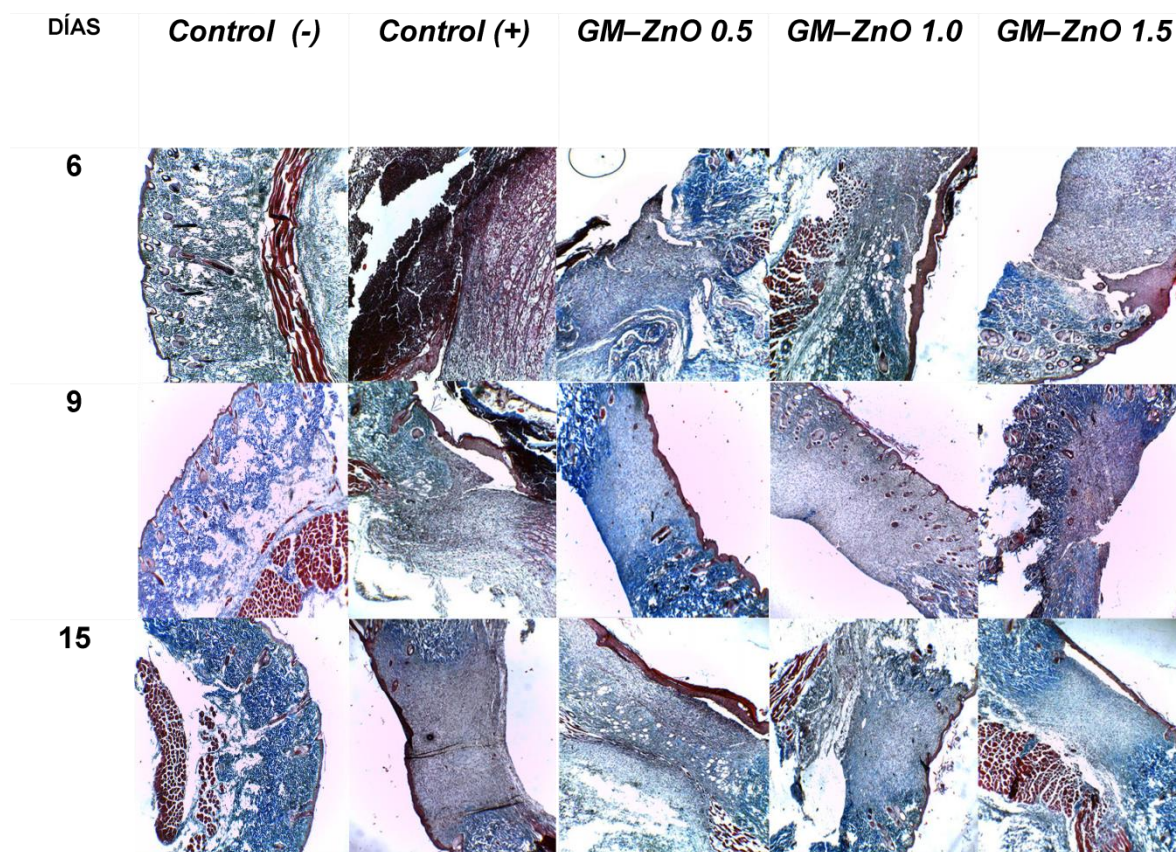
En el control positivo, se observa la presencia de la costra (color rojo) a los 6 días de tratamiento, esto se estableció ya que la costra al presentar componentes (plaquetas, eritrocitos) acidófilos tienden a teñirse de este color. Se aprecia también la ausencia de la capa epidermica en el sitio de lesión, aún no se distinguen las capas dermicas e hipodermicas . Para los días 9 y 15 se pudo observa la dermis, aunque su conformación no es uniforme, no se presentan glandulas sebáceas, tejido adiposo, folículos pilosos ni el tejido subcutáneo (hipodermis). Con dicha información se concluye que a los 15 días después de la lesión no se restaura al 100% el tejido. Este resultado tiene correlación con los datos obtenidos en la figura 23 en donde se observa un porcentaje de retracción del 48 %.

El tratamiento con ZnO a los 6 días nos muestra una composición estructural similar al grupo control (+) en el día 15. Se muestra un efecto favorable con la aplicación del ZnO, para el día 15 se observan la epidermis y dermis del tejido con una mejor estructuración que el control (+), también se distinguen los fibroblastos, leucocitos, fibras de colágeno y folículos pilosos. No se aprecian todas las estructuras propias de la piel.

Para los grupos tratados con PC en el día 6 se notan residuos de costra y la presencia de la epidermis y dermis. Células como fibroblastos y leucocitos; para el día 9 es evidente la formación de glándulas sebáceas vasos sanguíneos y folículos pilosos. En el día 15 se observan las tres capas de la piel (epidermis, dermis, hipodermis) con una composición más completa en comparación con el tratamiento de ZnO.

El tratamiento con Glucomanano en el día 6 muestra la migración de fibroblastos y leucocitos, se aprecia la epidermis y dermis. Para el día 9 los cambios estructurales son evidentes pues se observa en su mayoría una estructura uniforme con altas características presentes en el control (-). Se aprecian glandulas sebáceas, fibras de colágeno, folículos pilosos y vasos sanguíneos y linfáticos. En el día 15 la restauración es completa se formaron las tres capas de la

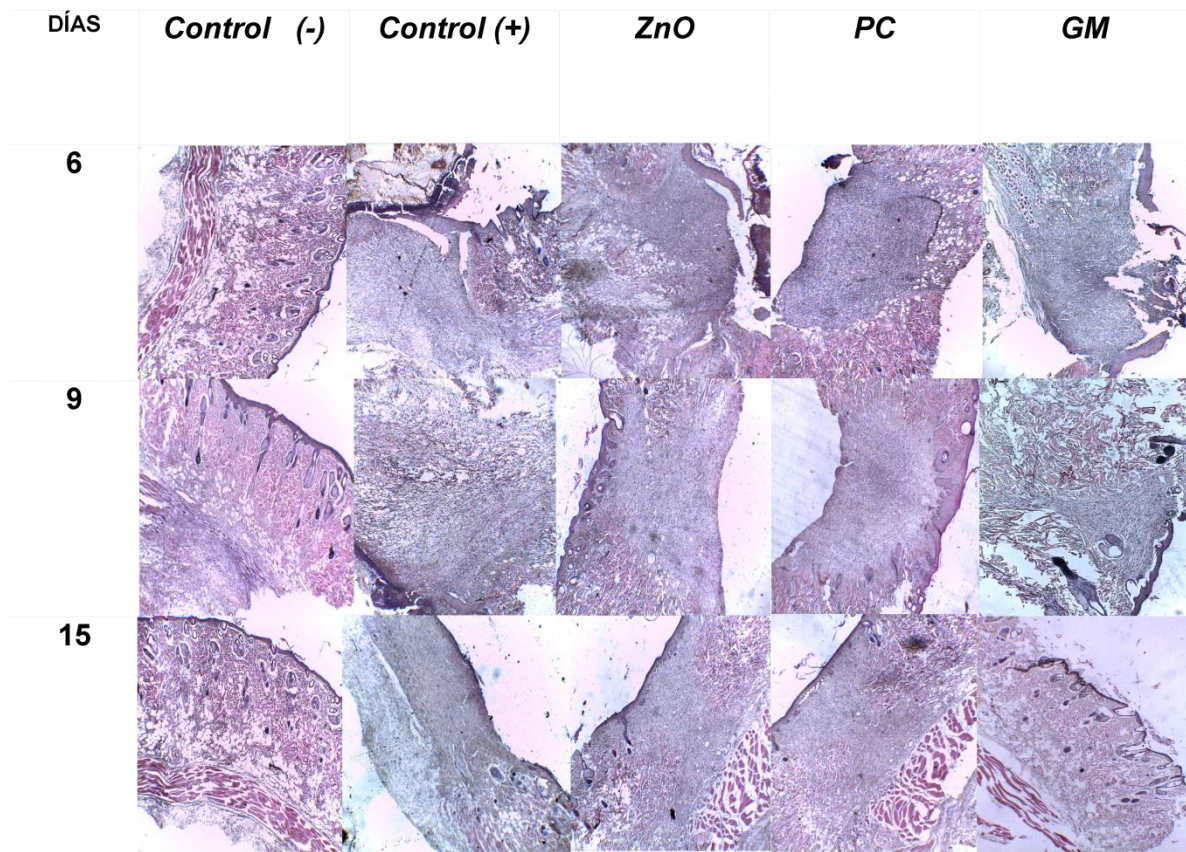
piel, se observa la similitud con el control negativo. Se comprueba el efecto del glucomanano puro en donde se sugiere la probabilidad de regeneración del tejido.



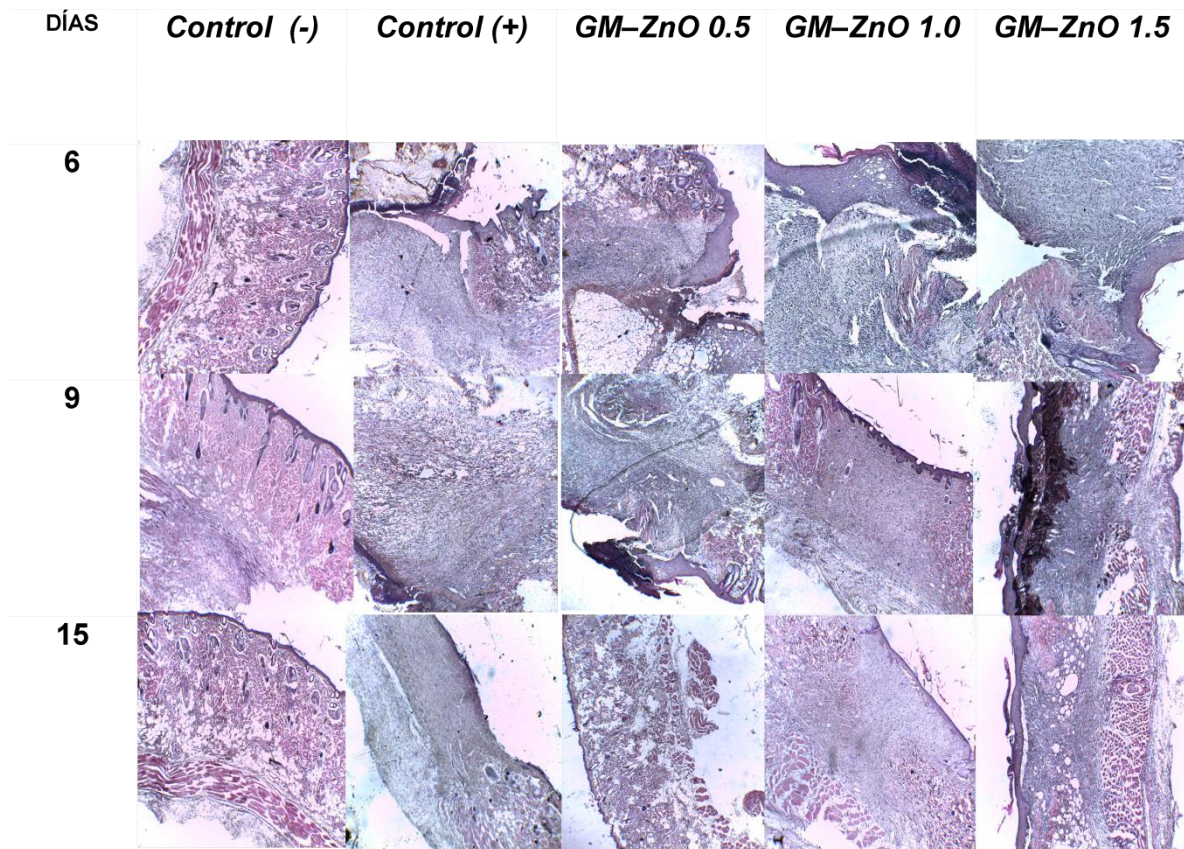
**Fig. 27.** Evaluación histológica del cierre por segunda intención en modelo de rata nude con nanomatrices de GM-ZnO. Se emplearon 30 ratas macho nude, con una lesión de 6 mm de diámetro. (Tinción tricrómica de Masson).

En la figura 27 y 29 se muestra la evaluación de las nanomatrices GM-ZnO. En la primera nanomatriz GM-ZnO 0.5 a los 6 días se observa la epidermis y dermis del tejido, fibras de colágeno y fibroblastos. Conforme se fue aumentando la concentración de glucomanano (GM-ZnO 1.0-1.5) se observa una mejor estructuración de la piel en donde ya se forman algunas glándulas sebáceas, folículos pilosos y vasos sanguíneos. Lo mismo se observa en el tiempo 9 y, para el día 15 se observan ya las 3 capas de la piel (epidermis, dermis e hipodermis); sin embargo la celularidad que se presenta en el sitio de lesión corresponde en su

mayoría a tejido conjuntivo como fue el caso de PC y ZnO. Por lo cual se presentó para estos grupos un proceso de cicatrización.



**Fig. 28.** Evaluación histológica del cierre por segunda intención en modelo de rata nude con ZnO, PC y GM. Se emplearon 30 ratas macho nude, con una lesión de 6 mm de diámetro. (Tinción H & E).



**Fig. 29.** Evaluación histológica del cierre por segunda intención en modelo de rata nude con las nanomatrices GM-ZnO. Se emplearon 30 ratas macho nude, con una lesión de 6 mm de diámetro.(Tinción H & E).

## IX DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la Tabla 8 nos mostraron variaciones en el porcentaje de extracto GM, se ha reportado que el porcentaje de azúcares presentes en el fruto xoconostle se mantiene en niveles altos dentro de los primeros 14 días después de la cosecha ya que posteriormente tiende a disminuir de 1.08 mg/g a 0.81 mg/g dado que con el paso del tiempo los azucares tienden a la degradación, esto reportado por Pimienta-Barrios (2008). Estos mismos comportamientos observamos en nuestros resultados ya que no se pudieron controlar los tiempos de almacenamiento por cuestiones de los largos periodos de extracción. Sin embargo para disminuir las diferencias en cuanto a su composición, todos los frutos fueron recolectados en una zona de producción en San Martín de las Pirámides, México [124].

La molécula de glucomanano fue extraída y purificada específicamente de este fruto, debido a los reportes sobre su potencial, en donde Shahbuddin, MacNeil, & Rimmer (2011) describen la forma en la cual el glucomanano es útil para la reparación de las heridas y lo mencionan como componente principal de la planta *Amorphophallus konjac*, también se ha atribuido que el potencial que presenta el *Aloe vera* se debe principalmente a este molécula (glucomanano) entre otros carbohidratos. De aquí partimos para buscar un componente con un alto potencial en el fruto xoconostle reconocido como un fruto mexicano que puede ser explotado al máximo.

El glucomanano es un componente esencial del fruto que se encuentra tanto en la cáscara como en la pulpa. Esta molécula fue obtenido por Hess y Ludtke a partir de pulpa de sulfito de picea. Así mismo, en 1940, Lewis, Brauns y Buchanan aislaron una sustancia parecida a la piel que permaneció insoluble en la solución de cupramonio de la pulpa de madera de coníferas. Como de costumbre, la capa secundaria de la pared celular se disolvió, pero bandas muy pequeñas de material de hidratos de carbono permanecieron sin disolver. Se descubrió que contenían principalmente manosa, junto con cantidades menores de glucosa. Cuando la solución acuosa del presente glucomanano se concentra o se vierte en éter, se

forma una sustancia cristalina que precipita de la solución en forma de espiral o aguja: la sustancia se observa bajo el microscopio como una banda de película o una cuerda de agar-agar que muestra una propiedad anisotrópica óptica [140].

En la tabla 9 se muestra que el porcentaje de extracto GM tuvo un mayor rendimiento en la cáscara de xoconostle. De acuerdo con estudios realizados por Barros et al., 2010 se conoce que la cáscara contiene un 8.77% de fibra dietética total mientras que en la pulpa solo un 2.31 %, nuestros resultados confirman de igual manera que la cáscara presenta una mayor cantidad de fibra dietética (glucomanano) con respecto a la pulpa; sin embargo la diferencia que obtenemos en este trabajo entre pulpa y cáscara es del 3.81 % mientras que datos indican una mayor diferencia del 6.46%. Esto debido a que nuestro método es específico para la obtención de glucomanano y Barros et al., 2010 reportó el método enzimático gravimétrico para la obtención de fibra soluble e insoluble para posteriormente mediante suma se obtuviera el total de fibra, nuestra técnica por lo tanto es directa acompañada de varios pasos de purificación.

En la planta *Amorphophallus konjac* se ha registrado un rendimiento del 90% en 2 gramos de peso seco, utilizando la misma técnica de purificación y cuantificación (3,5 DNS), debido a que esta planta es altamente rica en glucomanano según los estudios realizado por Melinda Chua et al. (2012). Mientras que nuestros rendimientos fueron del 10.4605% y 6.6511%.

Las curvas de calibración Glucosa/Manosa para el ensayo colorimétrico 3,5 DNS también fueron reportadas por Melinda Chua et al. Se mostraron valores del coeficiente de correlación de Pearson correspondientes a  $R^2= 0.9992$  y  $R^2= 0.9964$  respectivamente; nuestra grafica mostró  $R^2= 0.994$  y  $R^2= 0.984$ . El coeficiente de correlación de Pearson es un índice que puede utilizarse para medir el grado de relación de dos variables siempre y cuando ambas sean cuantitativas. Si  $r = 1$ , existe una correlación positiva perfecta. El índice indica una dependencia total entre las dos variables denominada relación directa: cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace en proporción constante, con esto valoramos la sensibilidad de nuestro reactivo (3,5 DNS), por lo tanto podemos establecer que

nuestro reactivo tiene una sensibilidad mayor cuando reacciona con la glucosa que con la manosa; la diferencia entre los resultados obtenidos por Melinda Chua et al. con los nuestros se pueden deber a diferentes factores como grados de pureza de los reactivos, equipos utilizados, etc.

Una vez purificado el GM y por medio de las técnicas 3,5 DNS y CCF, se pudo demostrar que a pesar que la pulpa tiene bajo contenido de GM, este presenta un porcentaje de pureza mayor que el obtenido de la cáscara (Tabla 10). Se ha demostrado que la técnica 3,5 DNS es altamente sensible y reproducible para la determinación de la pureza de los extractos de glucomanano (KGM) en comparación con la técnica Colorimetría de ácido fenol-sulfúrico (Chua M. 2010), por lo cual esta técnica fue utilizada en este trabajo. El método para la extracción y purificación de glucomanano nos mostró un 85%, 71% de pureza para PGM y CGM ; en otros estudios realizados para KGM utilizando las mismas técnicas se mostraron purezas del 92% y 95% reportadas por Melinda Chua y Sugiyama et al., 1972. Las diferencias entre las distintas purezas con nuestro resultado se deben principalmente a que la planta *Amorphophallus konjac* presenta casi en su totalidad como componente principal al glucomanano por otro lado nuestro fruto xoconostle es rico principalmente en carbohidratos, ácidos grasos, minerales y componentes antioxidantes por lo cual se tiene una mayor probabilidad de obtener impurezas, principalmente en CGM por su alto contenido en minerales [10,125].

Otra técnica utilizada fue la cromatografía en capa fina se observó que el glucomanano podía eluir únicamente con el eluyente acetona; esto se debe a la composición que presenta nuestra molécula, conformada principalmente por carbono, oxígeno e hidrógeno; puede interaccionar mejor con la acetona. M. E. Tate and C. T. Bishop reportaron buenas separaciones de acetatos de carbohidratos en capas delgadas de gel de sílice G usando mezclas de etanol-benceno con (v / v) metanol 2-10%, ocuparon otro tipo de eluyentes dado el cambio de polaridad que presenta su compuesto. En otro estudio reportado para glucosa y manosa se utilizaron mezclas con butanol-etanol-agua. Sin embargo no existe un reporte en específico para Glucomanano.

Al concluir la etapa de extracción y purificación se continuó con la caracterización puntual de la molécula. Se realizó una espectrofotometría de masas, la cual puede proporcionar información sobre la composición y estructura molecular, ya que permite determinar la distribución de las moléculas de una sustancia en función de su masa, al analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación entre masa y carga ( $m/z$ ). Puede utilizarse para identificar los diferentes elementos químicos que forman un compuesto, o para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto. En este caso, se establecieron patrones de carbohidratos, así como el tipo de enlace entre ellos, incluso para pequeñas moléculas disociadas en la muestra, las estructuras propuestas posterior a su análisis se muestran en la Fig 15. En un estudio realizado [133] se analizaron seis isómeros de carbohidratos sintéticos que difieren en composición, conectividad o configuración. Sus datos mostraron que se pueden identificar isómeros de carbohidratos coexistentes, y se pueden detectar concentraciones relativas del isómero menor de hasta 0,1%. Estos resultados indican que la espectrometría de movilidad de iones es una herramienta efectiva para el análisis de carbohidratos complejos. En un estudio realizado por Bennati-Granier C. et al. se utilizó esta técnica para demostrar la presencia de celo-oligosacáridos nativos y oxidados. Mostrando el pico ion molecular los picos formados por fragmentación de la molécula  $m/z$  de 687.21, 705.22 y 721.21, respectivamente, que se fragmentaron usando MS.

Esta técnica también es ampliamente utilizada para demostrar la interacción de uno o más compuestos. En nuestro espectro de Glucomanano se pudieron identificar los patrones de fragmentación de la molécula respecto al peso molecular. En la primera fragmentación se eliminaron los grupos ( $-OH$ ) para que la molécula este positivamente cargada, es uno de los eventos más simples reportados en esta técnica; la eliminación de un solo electrón para darle carga a la molécula. Si algunos de los iones moleculares permanecen intactos el tiempo suficiente para llegar al detector, vemos un pico de ion molecular. Es importante reconocer el pico de ion molecular porque esto da el peso molecular del

compuesto. El pico del ion molecular es generalmente el pico del número de masa más alto, en nuestro espectro fue evidente esta característica. Con este análisis se corroboró que la molécula obtenida a partir de la pulpa y cáscara de xoconostle corresponde firmemente a glucomanano [126].

Posterior a esto se realizó FTIR. En el espectro obtenido para el glucomanano PGM y CGM se puede observar la presencia de grupos hidroxilo (-OH) que se atribuyen a la banda ancha localizada a  $3315.055\text{ cm}^{-1}$ . Zhang et al. (2001) reportó que los espectros KGM se caracterizan por la presencia de una banda ancha asignada a los modos de vibración de estiramiento de los grupos (-OH) y agua alrededor de  $3396\text{ cm}^{-1}$ . Se identificaron los grupos metilo situados a  $2917.80\text{ cm}^{-1}$  que se atribuyen a la vibración de estiramiento de (-CH). Xiao et al. (1999) registró picos de estiramiento de (-CH) de grupos metilo a  $2920\text{ cm}^{-1}$ .

El glucomanano está compuesto por unidades de manosa y glucosa que poseen un bajo grado de grupos acetilo en la cadena lateral C6 [127]. En el glucomanano PGM y CGM estas unidades se encontraron en los picos característicos de  $818.24\text{ cm}^{-1}$ ,  $888.30\text{ cm}^{-1}$  y  $818.24\text{ cm}^{-1}$ ,  $884.58\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente; considerando para estas unidades la forma  $\beta$ -piranosa.

Hua et al. (2004) reportaron que unidades de glucosa y manosa se asignaban a picos característicos en  $814$  y  $873\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, los que se atribuyen a la vibración de curvatura (C-H). La presencia de los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídico y  $\beta$ -1,4 manosídico en la molécula son asignados a la vibración de estiramiento C-O-C localizados a  $1032.90$  y  $1223.70\text{ cm}^{-1}$  para PGM y para CGM a  $1032.90$  y  $1243.07\text{ cm}^{-1}$ . Estudios FTIR realizados a KGM muestran picos en  $1151$  y  $1027\text{ cm}^{-1}$  que fueron asignados a fragmentos C-O-C [128]. Debido a que en la molécula de glucomanano las unidades de glucosa y manosa están unidas por el enlace  $\beta$ -1,4, se estableció que la existencia de este enlace se comprobaba por la vibración de estiramiento del carbonilo (C=O) localizado a  $1612.75$  y  $1714.11\text{ cm}^{-1}$  (PGM)  $1588.90$  y  $1717.84$  (CGM). Se reporta el pico de estiramiento de grupos carbonilo de KGM en  $1730\text{ cm}^{-1}$  por Maeda et al., (1980).

En los espectros FTIR para ZnO P. A. Arciniegas et al. ha reportado la presencia de los enlaces Zn-O y Zn-OH a las longitudes de onda 1000 y 400  $\text{cm}^{-1}$ , datos similares se reportan también por Agnieszka (2012), Zn-OH ( $\sim 900 \text{ cm}^{-1}$ ), y Zn-O ( $\sim 450 \text{ cm}^{-1}$ ). Nuestros resultados nos indicaron la presencia del enlace Zn-O a 561.1  $\text{cm}^{-1}$ .

Los espectros FTIR de las nanomatrices PGM-ZnO y CGM-ZnO presentan los modos de vibración tipo alargamiento y flexión similares a los del glucomanano puro, sin embargo hay disminución en la intensidad de las bandas de absorción respectivamente y desplazamientos en los enlaces C=O, C-O-C, -CH, se aprecia también el enlace Zn-O. La aparición de la banda correspondiente a Zn-O sugiere que si hay una coordinación entre GM-ZnO, esto se puede correlacionar con un estudio realizado en donde se formaba un injerto de KGM-g-PAM, sus estudios FTIR revelaron que la presencia de picos característicos de KGM y las bandas de amida proporcionaban una fuerte evidencia que apoya el injerto de acrilamida en KGM. Se propone la posibilidad de interacción del ZnO en los sitios  $\text{CH}_2\text{OH}$  y en los grupos acetilo  $\text{CH}_2\text{COOCH}_2$  tomando como base los cambios en los momentos vibracionales que se obtuvieron en los espectros. Características similares se han reportado en la síntesis de nanopartículas de quitosano/ZnO en donde reflejan las interacciones entre estas dos moléculas por la presencia de nuevas picos de absorción y desplazamientos de los momentos vibracionales [134].

Así mismo fue importante realizar microscopía electrónica de barrido para conocer la morfología de los materiales. Se ha reportado que el ZnO puede cristalizar de varias formas, la más estable y abundante es la estructura tipo Wurtzita (empaquetamiento hexagonal compacto donde  $\text{O}^{2-}$  forma la celda y el  $\text{Zn}^{+2}$  ocupa la mitad de los huecos), aunque también puede cristalizar en la forma tipo Blenda (empaquetamiento cúbico compacto donde  $\text{O}^{2-}$  forma la celda y el  $\text{Zn}^{+2}$  ocupa la mitad de los huecos). Las micrografías del ZnO revelaron la estructura tipo zincita hexagonal que corresponden a la estructura Wurtzita.

Un estudio SEM realizado por M. Alonso-Sande et al. (2009) para el glucomanano mostró estructuras similares a las obtenidas en este trabajo en PGM y CGM [134].

Las fotomicrografías de las nanomatrices PGM-ZnO a diferentes concentraciones mostraron que al incrementar la concentración de glucomanano se forma un tipo de película amorfa. Se ha reportado que el glucomanano KGM puede formar enlaces cruzados con ayuda de Ce (IV) uniendo las cadenas poliméricas una debajo de otra para la posterior formación de geles según lo reportado por Shahbuddin, Bullock et al. 2013. Con este precedente se puede proponer un tipo de interacción parecida en nuestras nanomatrices, utilizando al ZnO como puente entre las cadenas poliméricas por lo que se presentan estructuras más compactas y amorfas conforme se va aumentando la concentración de glucomanano. Lo mismo puede explicarse para CGM ya que las micrografías revelan similitudes. Sin embargo para poder respaldar estructuralmente los sitios de unión convendría realizar un mapeo de toda la zona a estudiar para poder ubicar cada uno de los elementos presentes en la película.

Por otro parte el espectrómetro de energía dispersa nos reveló el porcentaje de los elementos presentes. Se ha reportado EDS para el ZnO con una composición de Zn (66.92%), O (32.76 %), en nuestro análisis se obtuvieron 71.88 % y 28.12 % respectivamente, esto se debe a la diferencia de pureza entre estos compuestos. Para GM no se han reportado análisis EDS, sin embargo nos permitió identificar claramente los elementos que lo conforman.

El EDS para las nanomatrices GM-ZnO mostraron la presencia de los elementos que las conforman; sin embargo no confirma que todo el ZnO detectado esté interaccionando con el GM. Las interacciones del ZnO aunque presentes son escasas, dado que en la molécula de GM pocos son los sitios donde puede interaccionar el ZnO. Al incrementar las concentraciones de glucomanano en las nanomatrices se observa la disminución del ZnO, es decir que entre más moléculas de glucomanano menos son las interacciones que tiene el ZnO.

Finalmente se realizó DRX para concretar la información obtenida hasta el momento. En la figura 20 se mostró el patrón característico del ZnO, existen base de datos que facilitan la identificación de compuestos, para este caso nos ayudó a confirmar la forma cristalina del ZnO.

Estudios realizados para KGM señalan un reflejo débil y amplio a aproximadamente  $2\theta = 20^\circ$ , con baja cristalinidad [135]. Estos mismos comportamientos se observaron en nuestros resultados para PGM y CGM. En los difractogramas de las nanomatrices se mostraron las señales correspondientes a GM y ZnO lo que nos indica la presencia de ambos compuestos en la muestra. Se ha reportado para un compuesto KGM-g-PAM que la disminución en el pico a  $2\theta = 20^\circ$  indica que la conjugación de KGM con PAM redujo la cristalinidad de KGM. Se ha reportado un comportamiento similar en las nanopartículas de quitosano/ZnO en donde se reporta que los picos a de quitosano a  $10.67^\circ$  y  $19.99^\circ$  [137], se vuelven débiles en el patrón de XRD de nanopartículas de quitosano / ZnO. En nuestros resultados podemos ver claramente los picos a  $2\theta = 20^\circ$  en las nanomatrices GM-ZnO tienden a disminuir considerablemente al punto de ser imperceptibles. Probablemente todas las reacciones se produjeron principalmente en la superficie de GM, y no tuvieron un efecto significativo sobre la cristalinidad del polvo.

Una vez caracterizadas nuestras nanomatrices se realizó la evaluación en un modelo de rata nude durante 15 días. El modelo murino utilizado daba la posibilidad de obtener en la herida una nueva epitelización y formación de nuevo tejido, lo que la hace similar al proceso que ocurre en los humanos. Este modelo es versátil y se puede utilizar para evaluar la cicatrización de heridas tanto en entornos fisiológicos como fisiopatológicos.

En los datos obtenidos para el grupo control positivo a los 15 días se observó una retracción del 48%, algunos estudios realizados en ratas para evaluar cicatrización han demostrado que para este periodo de tiempo en los grupos controles las costras de la cicatriz se cayeron en promedio en el día 15 [139]. Tal efecto lo observamos también en nuestros resultados. El proceso de contracción comienza alrededor de una semana luego de la herida, los fibroblastos se han diferenciado en miofibroblastos y la herida se comienza a contraer [138]. Estudios demuestran que el pico máximo de contracción se presenta de los 5 a 15 días de la herida, dicha etapa se observó para el control positivo sin llegar al cierre total.

Mientras que con el tratamiento ZnO los comportamientos fueron distintos, se obtuvo un porcentaje de retracción del 83 % y la formación de las tres capas de la piel; sin embargo aunque este grupo mostró mejoría con respecto al control, el cierre fue por cicatrización por lo que en los cortes histológicos se muestra la alteración en la composición donde se encontraba la herida, dado que el sitio de lesión es sustituido por tejido conjuntivo.

La mejoría del grupo tratado con ZnO se atribuyen a diversos factores. Estudios han demostrado que el efecto final de óxido de cinc parece estar en la aceleración de la re-epitelización dentro de la herida. El ciclo de cicatrización–renovación tisular se debe a la redistribución del Zn en la zona de lesión, la cual es estimulada por IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , ya que contienen a este bioelemento en su estructura, sitio catalítico, enlaces tiólicos y en aminoácidos aromáticos formando compuestos de coordinación [107-110].

El zinc es esencial para la actividad de muchas enzimas involucradas en la cicatrización, por ser un acelerador, precursor y cofactor del mecanismo de señalización en fibroblastos, células endoteliales y en la angiogénesis de la placa queratinosa que bloquea la herida. El grupo enzimático Zn dependiente de mayor relevancia en el proceso de cicatrización son las matrices metaloproteinasas (MMP), proteínas capaces de degradar los componentes de las matrices extracelulares y que exhiben diversidad de especificidad proteolítica en un rango importante de proteínas y glicoproteínas, en las que se incluyen citocinas y sus receptores, así como para moléculas de adhesión. Las MMP son sintetizadas por diversos grupos celulares en el sitio de la herida: macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y en menor proporción por queratinocitos, el Zn en ellas se encuentra unido al sitio catalítico, por lo que es indispensable para su actividad en el proceso cicatrización – reparación [107-110]

Por otro lado, se evaluó un grupo administrado con una forma farmacéutica conocida como lo es la “Pomada de la Campana” (PC). Los animales administrados con PC, presentaron comportamientos similares al tratamiento con ZnO. Esto se puede ver atribuido a los componentes presentes en esta pomada

como son, Alantoína, ZnO, TiO<sub>2</sub>. Para el caso del compuesto Alantoína o 5-ureido-hidantoína, no se han establecido específicamente mecanismos de acción. Sin embargo se sabe que reduce el tiempo de cicatrización, es anti-irritante, hidratante, eliminador de tejido necrótico, estimula la mitosis de fibroblastos, por lo que fomenta la regeneración de la piel, ya que favorece y acelera el proceso natural del tejido [141]. El papel del TiO<sub>2</sub> principalmente es su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano y evitar la formación adicional de estructuras celulares. Se sugiere que a través de estrés oxidativo (ROS), las especies reactivas de oxígeno pueden entonces actuar sinérgicamente atacando fosfolípidos poliinsaturados en bacterias y causar daño al ADN [136]. Dadas estas propiedades acompañadas por el efecto ZnO, en nuestros resultados con PC se presentó un proceso de cicatrización más rápido en comparación con el control, se aprecia dicho fenómeno en el análisis histológico.

Actualmente la bioingeniería de nanopartículas se ha enfocado a los mananos sintéticos y de extractos naturales por su alta capacidad regenerativa. En este sentido una de las biomacromoléculas más estudiadas e informadas, el manan sulfato (MS). El MS combinado con nanopartículas de Ag, se ha encontrado como un potente inhibidor del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 y muchos otros virus con envoltura [142]. Así mismo se ha explorado su papel como agente reductor y limitador en la síntesis de AgNP. Previó que los AgNPs protegidos con MS (MS-AgNP) muestran una captación mejorada a través de las células que expresan el receptor de manosa a través de su potencial de direccionamiento. Estudios in silico de acoplamiento molecular, han concluido que el polisacárido MS exhibe mayor unión con el dominio rico en cisteína (Cys-MR) del receptor de multilectina manosa [143]. Estas interesantes propiedades estructurales con potencial de direccionamiento a los receptores de manosa sirven matriz ideal para la movilización de fibroblastos y diferentes células epiteliales, limitando la actividad bacteriana debido a su reconocimiento en dichos dominios [144].

En nuestro estudio, el grupo tratado únicamente con GM resultó tener un porcentaje de retracción del 100% y una adecuada formación de la capas de la piel sin tejido conectivo. Este efecto de cierre de segunda intención lo podemos atribuir a que se ha informado que los glucomananos promueven la acumulación de fibroblastos y queratinocitos, estimulan la producción de colágeno; también por su capacidad de estimular metabolitos de fibroblastos en heridas de piel. El glucomanano (GM) y glucanos son reconocidos por una gama de receptores de superficie celulares tales como el receptor de manosa (MR), receptores tipo Toll 2, 4 (TLR2, TLR4) y lectina de unión a manosa (MBL). Las células poseen lectinas que reconocen carbohidratos específicos que también están involucrados en muchas funciones biológicas tales como la respuesta inmune, el reconocimiento celular, la migración y el metabolismo [28-30].

En este sentido, la coadministración del GM-ZnO a diferentes concentraciones mostraron porcentajes de retracción mayores que los tratamientos con ZnO y PC sin embargo no mostraron a nivel histológico una mejor formación de las capas de la piel en comparación con el efecto que se obtuvo con GM, sin embargo a medida de que se aumentaron las concentraciones del GM se observan a nivel celular una mejor reorganización. Se esperaba que las nanomatrices GM-ZnO presentaran mejores resultados en la evaluación de la cicatrización, sin embargo se demostró que GM coadyuva en mejor medida a la recuperación de la lesión, por medio de procesos de regeneración tisular y promover la inhibición de los procesos oxidantes e inflamatorios, en consecuencia el efecto farmacológico resulta más efectivo ya que acelera la cicatrización de forma significativa, en comparación con los demás tratamientos.

## **X CONCLUSIONES**

El fruto de *Opuntia joconostle* ofrece una fuente importante de glucomanano tanto en cáscara como en pulpa, ya que a partir de ambos se logró extraer, purificar y caracterizar la biomolécula de interés por métodos analíticos que permitieron establecer inclusive la conformación molecular.

Se lograron desarrollar nanopartículas de glucomanano-ZnO a baja concentraciones de la biomolécula, en contraste a una mayor concentración de glucomanano se desarrollaron biopelículas funcionalizadas con zinc, mismas que fueron caracterizadas en su totalidad.

Se desarrolló una forma farmacéutica utilizando como principio activo al glucomanano en combinación con ZnO que mostró una relevante actividad cicatrizante/repitelizante, que actúa de mejor manera que una fórmula farmacéutica reconocida.

La regeneración del tejido epitelial dado por la formula farmacéutica a base de glucomanano con y sin la adición de zinc, es al menos un 50% más eficiente que la fórmula farmacéutica comercial, ya que recupera al 100% la estructura de la piel en un menor tiempo.

## XI BIBLIOGRAFÍA

1. Bravo, H. (1978). Las Cactáceas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. 331-743 p.
2. COMENTUNA, Red Nopal y CONABIO. (2008). Nopales, tunas y xoconostles. Consejo Mexicano del Nopal y Tuna, A.C., Red Nopal y Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad. 1° edición, México.
3. Colunga, P. (1984). Variación morfológica, manejo agrícola y grados de domesticación de *Opuntia* spp. en el Bajío Guanajuatense. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
4. Reyes-Agüero, J. A. (2005). Variación morfológica de *Opuntia* (Cactaceae) y su relación con la domesticación en la altiplanicie meridional de México. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 180 p.
5. Nobel, P. (2002). *Cacti. Biology and uses*. University of California Press. Pp 57-62.
6. Scheinvar, L. (1981). Especies, variedades y combinaciones nuevas de Cactáceas del Valle de México. *Phytologia* 49 (4): 324-328.
7. Guzmán-Maldonado, S. H., Morales-Montelongo, A. L., Mondragón-Jacobo, C., Herrera-Hernández, G., Guevara-Lara, F., & Reynoso-Camacho, R. (2010). Physicochemical, nutritional, and functional characterization of fruits xoconostle (*Opuntia matudae*) pears from central-México region. *Journal of Food Science*, 75, 485–492.
8. Ayadi, M. A., Abdelmaksoud, W., Ennouri, M., & Attia, H. (2009). Cladodes from *Opuntia ficus indica* as a source of dietary fiber: Effect on dough characteristics and cake making. *Industrial Crops Production*, 30, 40–47.
9. Barros, L., Carvalho, A.M., Sá Morais, J., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 120, 247–254.
10. Morales, P., Carvalho, A. M., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Molina, M., & Ferreira, I.C.F. R. (2011). Tocopherol composition and antioxidant activity of Spanish wild vegetables. *Genetic Resources and Crop Evolution*. doi:10.1007/s10722-011-9726-1.

11. Morales, P., Ramírez Moreno E., Sánchez-Mata, M. C., Carvalho, A. M., Ferreira I.C.F.R. (2012). Nutritional and antioxidant properties of pul and seeds of two xoconostle cultivars (*Opuntia joconostle* F.A.C weber ex Diguët and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico.
12. Almanza R.A. (1999). Cocina Indígena y popular. Recetario guanajuatense del Xoconostle. Comisión nacional para la cultura y las artes. México Distrito Federal.
13. Corrales G.J. y Flores V.C.A. (2000). Tendencias actuales y Futuras en el procesamiento del nopal y la tuna. Reporte de Investigación. Centro de investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la agricultura mundial, Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, Estado de México.
14. Sánchez M.H. (1982). Algunos usos Prehispánicos de las Cactáceas entre los Indígenas de México. Gobierno del Estado de México, Metepec, Estado de México.
15. Hernández, V. R. E. (1990). Algunas Opuntia en los remedios medicinales de los pobladores de San Luis Potosi, México. En: J.J López G. y M. J. Ayala O. Memoria de la 3ª Reunión nacional y 1ª Reunión internacional El nopal, su conocimiento y Aprovechamiento. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. pp 355-358.
16. Scheinvar L. (1999). Biosistemática de los xoconostles mexicanos y su potencial económico. En Memoria del VIII Congreso Nacional y VI Internacional Sobre Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.
17. Instituto de Biología. "Opuntia joconostle F. A. C. Weber ex Diguët - IBUNAM:MEXU:OPUS830201". UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2010-07-04. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2017-8-24. Disponible en:<<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:OPUS830201>>
18. Zhang H, Yoshimura M, Nishinari K, Williams MAK, Foster TJ, Norton IT (2001). Gelation behaviour of Konjac Glucomannan with different molecular weight. Biopolymers, 59: 38-50.
19. Chua M, Baldwin TC, Hocking TJ, Chan K. (2010). Traditional uses and potential health benefits of Amorphophallus konjac K. Koch ex N.E.Br. J Ethnopharmacol, 128(2):268-278.
20. Vanderbeek PB, Fasano C, O'Malley G, Hornstein J. Esophageal (2007) Obstruction from a hygroscopic pharmacobezoar containing glucomannan. Clin Toxicol (Phila);45(1):80-82.
21. Keithley J, Swanson B. (2005). Glucomannan and obesity: a critical review. Altern Ther Health Med;11(6):30-34

22. Alonso-Sande M, Teijeiro-Osorio D, Remuñán-López C, Alonso MJ. (2009) Glucomannan, a promising polysaccharide for biopharmaceutical purposes. *Eur J Pharm Biopharm*;72(2):453-462.
23. Fujiwara S, Hirota T, Nakazato H, Muzutani T, Mitsuoka. (2007) Effect of konjac mannan on intestinal microbial metabolism in mice bearing human flora and in conventional F344 mice. *Food Chem Toxicol*;29(9):601-606.
24. Vuksan V, Sievenpiper JL, Xu Z, et al. (2001) Konjac-Mannan and American ginseng: emerging alternative therapies for type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr*;20(suppl 5):370S-380S.
25. Burns, J. L., Mancoll, J. S., & Phillips, L. G. (2003). Impairments to wound healing. *Clinics in Plastic Surgery*, 30, 47–56.
26. De Feo, M., Gregorio, R., Renzulli, A., Ismeno, G., Romano, G. P., & Cotrufo, M. (2000). Recurrent postoperative mediastinitis with granulated sugar. *The Journal of Cardiovascular Surgery*, 41, 715–719.
27. Wilson, J., & Clark, J. (2004). Obesity: impediment to postsurgical wound healing. *Advances in Skin and Wound Care*, 17, 426–432.
28. Heber, G. (2007). Composition and method for dermal regeneration. Patent WO 2009/043111.
29. Shahbuddin, M., MacNeil, S., & Rimmer, S. (2011). The potential use of konjac glucomannan for wound healing and cell transportation. *European Cells and Materials*, 22(Suppl. 3), 43.
30. Shahbuddin, M., Shahbuddin, D., Bullock, A. J., Ibrahim, H., Rimmer, S., & MacNeil, S. (2013). High molecular weight plant heteropolysaccharides stimulate fibroblasts but inhibit keratinocytes. *Carbohydrate Research*, 375, 90–99.
31. Shahbuddin, M., Bullock, A. J., MacNeil, S., & Rimmer, S. (2014). Glucomannan- poly (N-vinyl pyrrolidinone) bicomponent hydrogels for wound healing. *Journal of Materials Chemistry, B*, 2, 727–738.
32. Informed Health Online [Internet]. Cologne, Germany: Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2006-. How does the skin work? 2009 Sep 28 [Updated 2013 Feb 7].
33. Jones, I., L. Currie, et al. (2002). "A guide to biological skin substitutes." *British Journal of Plastic Surgery* 55(3): 185-193.
34. Falanga, V., K. Faria, et al. (2007). Bioengineered skin constructs. *Principles of Tissue Engineering (Third Edition)*. Burlington, Academic Press: 1167-1185.
35. Yamaguchi, Y., V. J. Hearing, et al. (2005). "Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: Aiming for site-specific tissue regeneration." *Journal of Dermatological Science* 40(1): 1-9.
36. Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology an immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatol.* 12, 390-399.

37. Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional Capítulo: Renovación, reparación y regeneración tisular. España. 8va edición Editorial Elsevier.2010:79-110.
38. Ramzi S. Cotran, Stanley L. Robbins. (2006) Patología humana. Capítulo: regeneración de los tejidos regeneración celular y fibrosis. 7ma. edición. España. Editorial Elsevier. 61-78
39. Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case. (2007) Introducción a la microbiología. Capítulo: células madres. Buenos Aires - Argentina. 9na edición.
40. Patiño. J.F. Lecciones de cirugía. Capítulo: mecánica de la cicatrización. México. 2000.
41. Alonso Peña D. (2007) Atlas de dermatología del pie. Capítulo: cicatrices: forma de presentación, prevención y tratamiento. Madrid - España. 207 – 210.
42. Singer, A.J; Clark, R.A. Cutaneous Wound Healing. N. Eng. J. Med. 1999; 341: 738-746.
43. Enoch S y Leaper, DJ. (2007) Basic Science of Wound Healing. Surgery. 26: 31-37.
44. Ramirez Ramirez Hector. (2015). Regeneración, reparación y cicatrización. [Figura]. Recuperado de:  
[https://www.researchgate.net/profile/Hector\\_Ramirez11/publication/282574686\\_regeneracion\\_reparacion\\_y\\_cicatrizacion/links/56129a4c08aeed6ac8842a8d/regeneracion-reparacion-y-cicatrizacion.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Hector_Ramirez11/publication/282574686_regeneracion_reparacion_y_cicatrizacion/links/56129a4c08aeed6ac8842a8d/regeneracion-reparacion-y-cicatrizacion.pdf)
45. Eming et al. (2014) Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. Sci Transl Med. Dec 3;6(265):265sr6.
46. Adv Wound Care (New Rochelle). 2014 Jan 1;3(1):46-53.
47. Eming S.A., Martin P., Tomic-Canic M. (2014) Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. Sci. Transl. Med. 6 doi: 10.1126/scitranslmed.3009337.
48. Schultz GS, White M, Mitchell R, Brown G, Lynch J, Twardzik DR, Todaro GJ. (1987) Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor-alpha and vaccinia growth factor. Science. 235:350–352. [PubMed: 3492044].
49. Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. (2001) The pig as a model for human wound healing. Wound Repair Regen; 9:66–76. [PubMed: 11350644].
50. Ghahary A, Ghaffari A. (2007) Role of keratinocyte-fibroblast cross-talk in development of hypertrophic scar. Wound Repair and Regeneration. 15(supplement 1):S46–S53.

51. Chioni AM, Grose R. Organotypic modelling as a means of investigating epithelial-stromal interactions during tumourigenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2008;1(1, article 8).
52. Carlson MW, Alt-Holland A, Egles C, Garlick JA. (2009) *Current Protocols in Cell Biology*. Three-dimensional tissue models of normal and diseased skin. chapter 19:unit 19 19
53. Garlick JA. (2007) Engineering skin to study human disease—tissue models for cancer biology and wound repair. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*.103:207–239.
54. Galiano RD, Michaels V J, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. (2004) Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair and Regeneration*.12(4):485–492.
55. Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT, Gurtner GC. (2011) Surgical Approaches to Create Murine Models of Human Wound Healing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011:969618. doi:10.1155/2011/969618.
56. Scherer S S, Pietramaggiore G, Matthews J et al. (2009) Poly-N-acetyl glucosamine nanofibers: a new bioactive material to enhance diabetic wound healing by cell migration and angiogenesis. *Ann Surg*. Oct;250(4):661.
57. Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer S, and Schenke-Layland K: Skin tissue engineering—in vivo and in vitro applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63: 352.
58. Guo S. and DiPietro (2010) LA: Factors affecting wound healing. *J Dent Res*; 89: 219.
59. WHO: *Traditional Medicine Strategy 2002–2005*. World Health Organization, 2002.
60. Inpanya P, Faikruea A, Ounaroon A, Sittichokechaiwut A, and Viyoch J: (2012) Effects of the blended fibroin/aloe gel film on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed Mater*; 7: 035008.
61. Naeini AT, Miri R, Shafiei N, Tabandeh MR, Oryan A, and Nazifi S: (2012) Effects of topical application of *Calendula officinalis* gel on collagen and hydroxyproline content of skin in rats. *Comp Clin Pathol*; 21: 253.
62. Atiba A, Nishimura M, Kakinuma S, Hiraoka T, Goryo M, Shimada Y, Ueno H, and Uzuka Y. (2011) Aloe vera oral administration accelerates acute radiation-delayed wound healing by stimulating transforming growth factor- $\beta$  and fibroblast growth factor production. *Am J Surg*; 201: 809.
63. Tarameshloo M, Norouzian M, Zarein-Dolab S, Dadpay M, Mohsenifar J, and Gazor R: (2012) Aloe vera gel and thyroid hormone cream may improve wound healing in Wistar rats. *Anat Cell Biol*; 45: 170.

64. Eshghi F, Hosseinimehr SJ, Rahmani N, Khademloo M, Norozi MS, and Hojati O: (2010) Effects of Aloe vera cream on posthemorrhoidectomy pain and wound healing: results of a randomized, blind, placebo-control study. *J Altern Complement Med*; 16: 647.
65. Takzare N, Hosseini MJ, Hasanzadeh G, Mortazavi H, Takzare A, and Habibi P. (2009): Influence of Aloe vera gel on dermal wound healing process in rat. *Toxicol Mech Methods*; 19: 73.
66. Upadhyay NK, Kumar R, Mandotra SK, Meena RN, Siddiqui MS, Sawhney RC, and Gupta A. (2009) : Safety and healing efficacy of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil on burn wounds in rats. *Food Chem Toxicol*; 47: 1146.
67. Gupta A, Kumar R, Pal K, Singh V, Banerjee PK, and Sawhney RC. (2006): Influence of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) flavone on dermal wound healing in rats. *Mol Cell Biochem*; 290: 193.
68. Hsiao C-Y, Hung C-Y, Tsai T-H, and Chak K-F. (2012): A study of the wound healing mechanism of a traditional chinese medicine, *Angelica sinensis*, using a proteomic approach. *Evid Based Complement Alternat Med*; Article ID 467531.
69. Nayak BS. and Pereira LMP. (2006): *Catharanthus roseus* flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats. *BMC Complement Alternat Med*; 6: 41.
70. Parente LML, Júnior RSL, Tresvenzol LMF, Vinaud MC, de Paula JR, and Paulo NM. (2012): Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. *Evid Based Complement Alternat Med*; 2012: 375671.
71. Fronza M, Heinzmann B, Hamburger M, Laufer S, and Merfort I. (2009): Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *J Ethnopharmacol*; 10: 126.
72. Naeini AT, Miri R, Shafiei N, Tabandeh MR, Oryan A, and Nazifi S. (2012): Effects of topical application of *Calendula officinalis* gel on collagen and hydroxyproline content of skin in rats. *Comp Clin Pathol*; 21: 253.
73. Shenoy RR, Sudheendra AT, Nayak PG, Paul P, Kutty NG, and Rao CM. (2011): Normal and delayed wound healing is improved by sesamol, an active constituent of *Sesamum indicum* (L.) in albino rats. *J Ethnopharmacol*; 133: 608.
74. Singh DR: *Morinda citrifolia* L. (Noni): a review of the scientific validation for its nutritional and therapeutic properties. *J Diabetes Endocrinol* 2012; 3: 77.
75. Nayak BS, Sandiford S, and Maxwell A. (2009): Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf. *Evid Based Complement Alternat Med*; 6: 351.

76. Sharangi AB. (2009): Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.)—a review. *Food Res Int*; 42: 529.
77. Asadi SY, Parsaei P, Karimi M, Ezzati S, Zamiri A, Mohammadzadeh F, and Rafieian-Kopaei M. (2013): Effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract on healing process of surgical wounds in rat. *Int J Surg*; 11: 332.
78. Abu-Al-Basal MA. (2010): Healing potential of *Rosmarinus officinalis* L. on full-thickness excision cutaneous wounds in alloxan-induced-diabetic BALB/c mice. *J Ethnopharmacol*; 131: 443.
79. Bodeker GC, Ryan TJ, and Ong CK. (1999): Traditional approaches to wound healing. *Clin Dermatol*; 17: 93.
80. Mashreghi M, Rezazade Bazaz M, Mahdavi Shahri N, Asoodeh A, Mashreghi M, Behnam Rassouli M, and Golmohammadzadeh S. (2013): Topical effects of frog “*Rana ridibunda*” skin secretions on wound healing and reduction of wound microbial load. *J Ethnopharmacol*; 145: 793.
81. Rai M, Yadav A, and Gade A. (2009): Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*; 27: 76.
82. Neibert K, Gopishetty V, Grigoryev A, Tokarev I, Al-Hajaj N, Vorstenbosch J, Philip A, Minko S, and Maysinger D. (2012): Wound-healing with mechanically robust and biodegradable hydrogel fibers loaded with silver nanoparticles. *Adv Healthcare Mater*; 1: 621.
83. Tapiero H, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology. (2003): zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother*; 57(9):399–411.
84. Shankar AH, Prasad AS. Zinc and immune function. (1998): the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr*; 68(2 Suppl):S447–S463.
85. Samuel Kogan, BA; Aditya Sood, MD, MBA; and Mark S. Granick, MD. (2017): Zinc and Wound Healing: A Review of Zinc Physiology and Clinical Applications. *Wounds*; 29(4):102–106.
86. Agren, MS, Krusell M, Franzen L. (1991): Release and absorption of zinc from zinc oxide and zinc sulfate in open wounds. *Acta Derm Venerol*; 71(4):330-3.
87. Lalena, J. N., Cleary, E- A., Carpenter, E.E. y Dean, N. F. (2008). *Inorganic materials synthesis and fabrication*. New Jersey: John Wiley and Sons.
88. de-Jong, K. P. (2009). *Synthesis of solid catalysts*. Weinheim: Wiley-VCH.
89. Robert Nunan, Keith G. Harding, Paul Martin. (2014): Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Disease Models & Mechanisms*; 7: 1205-1213.
90. Equipo de Difracción de Rayos X (DRX) D8-Discover. <http://fisica.uc.cl/servicios.html>
91. Das S, Mishra B, Gill K, Ashraf MS, Singh AK, Sinha M, Sharma S, Xess I, Dalal K, Singh TP, and Dey S. (2011): Isolation and characterization of

- novel protein with anti-fungal and anti-inflammatory properties from Aloe vera leaf gel. *Int J Biol Macromol*; 48: 38.
92. Joseph, H. (2004). Chapter 1 - Wound Healing. *Small Animal Surgery Secrets (Second Edition)*. Philadelphia, Hanley & Belfus: 1-6.
  93. Ballesté J, Blanco J. (2002): Polvo de colágeno en la cicatrización de heridas por segunda intención. *Rev Rol Enfermer*; 25(12):854-8.
  94. Torrai JE, Casaroli-Marano RP, Martínez Cuervo F, Reina M, Soldevilla J, Vilaró S. (2000): El uso del colágeno en la cicatrización de heridas. *Rev Rol Enfermer*; 23(10):715-22.
  95. Beato Canfux A. (1996): Tratamiento de las quemaduras de espesor parcial con quitina en polvo. *Rev Cubana Med Mil*; 25(1):22-5.
  96. Rodríguez N. Quitina. (1995): agente rector de la estructura tisular. *Rev 16 de Abril*;186:17-8.
  97. González Tuero JH, Rodríguez Ramírez R, Machado Pineda M, González Quiala J, Cabrera Salazar J. (2004) Heridas. *Métodos de tratamiento. MEDISAN*;8(1).
  98. Enoch, S., Grey, J. E., & Harding, K. G. (2006). Non-surgical and drug treatments. *BMJ : British Medical Journal*, 332(7546), 900–903.
  99. WHO. (2012): *The Regional Strategy for Traditional Medicine in the Western Pacific (2011–2020)*. World Health Organization.
  100. B Pereira, R. F., & Bártolo, P. J. (2016). Traditional Therapies for Skin Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 5(5), 208–229.
  101. Lansdown AB1, Mirastschijski U, Stubbs N, Scanlon E, Agren MS. (2007): Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair Regen*. Jan-Feb;15(1):2-16.
  102. Philips N, Hwang H, Chauhan S, Leonardi D, Gonza-lez S. (2010) Stimulation of cell proliferation and expression of matrixmetalloproteinase-1 and interleukin-8 genes in dermal fibroblasts by copper. *Connect. Tissue Res*.
  103. David M. Ansell, Kirsty A. Holden and Matthew J. Hardman. (2012) Animal models of wound repair: Are they cutting it?. *John Wiley & Sons A/S Experimental Dermatology*, , 21, 581–585.
  104. María Álvarez Polo, Beatriz Casanova Melchor, Marta Fernández Palma, Verónica Yoon Kim. (2002). *Regeneración y cicatrización tisular. [Información]*.  
Recuperado de: <http://www.teide.net/catai/patol/leccion21/retis.htm>.
  105. Hernandezbattez, A; Gonzalez, R; Viesca, J; Fernandez, J; Diazfernandez, J; MacHado, A; Chou, R; Riba, J (2008). «CuO, ZrO2 and ZnO nanoparticles as antiwear additive in oil lubricants». *Wear* 265 (3–4): 422.

106. Hughes, G.; McLean, N. R. (1988). «Zinc oxide tape: a useful dressing for the recalcitrant finger-tip and soft-tissue injury» (Free full text). *Arch Emerg Med* 5 (4): 223-7.
107. Gray M (2003) Does oral zinc supplementation promote healing of chronic wounds? *J Wound Ostomy Continence Nurs* 30(6): 295–9.
108. Collins N (2003) Zinc supplementation: yea or nay? *Adv Skin Wound Care* 16(5): 226–30.
109. Tenaud I, Sainte-Marie I, Jumbou O, Litoux P, Dreno B. (1999): In vitro modulation of keratinocyte wound healing integrins by zinc, copper and manganese. *Br J Dermatol* 140(1):26–34.
110. Todorovic V. (2002): Food and wounds: nutritional factors in wound formation and healing. *Br J Community Nurs* 7(9): 43–54.
111. M.R. Prausnitz, R. Langer. (2008): *Nat Biotechnol.* 1261-1268
112. S. Dhiman, G.T. Singh, A.K. Rehni. (2011): Transdermal patches: a recent approach to new drug delivery system. *Int J Pharm Pharm Sci.* 26-34.
113. B. Anand et al., (2001). “Applications of Organogels in Pharmaceuticals,” *J. Sci. Ind. Res.* 60 (4), 311–318.
114. “Structure, Function, Diseases, and Topical Treatment of Human Skin,” in *Dermatological Formulations — Percutaneous Absorption*, B.W. Barry, Ed. (Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1983), pp. 1–48.
115. G.L. Flynn, “Topical Drug Absorption and Topical Pharmaceutical Systems,” in *Modern Pharmaceutics*, G.S. Banker and C.T. Rhodes, Eds. (Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1990), pp. 263–325.
116. Piyush Gupta, Sanjay Garg (2002). *Recent Advances in Semisolid Dosage Forms for Dermatological Application. Pharmaceutical Technology*, 144-162.
117. Medina, C., Santos Martínez, MJ, Radomski, A., Corrigan, OI, y Radomski, MW (2007). Nanopartículas: importancia farmacológica y toxicológica. *British Journal of Pharmacology* , 150 (5), 552-558.
118. Rao, C. N. R., Müller, A., y Cheetham, A. K. (2004). *The Chemistry of Nanomaterials* (vols. 1 y 2). Weinheim: Wiley-VCH.
119. Wachs, I. E. (2001). *Characterization of catalytic materials*. New York: Momentum Press.
120. de-Jong, K. P. (2009). *Synthesis of solid catalysts*. Weinheim: Wiley-VCH.
121. Zanello Rodolfo (2012). *Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño*. Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico, Universidad Nacional Autónoma de México. Vol. 5, No. 1.
122. Ramos D., et al (2000). Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. *Rev Cubana Farm*, Vol. 34. No.1.
123. ALVARADO RIVERA J. *Procesamiento y caracterización de recubrimientos híbridos cerámico-polímero* [Internet]. Recuperado de: <https://qro.cinvestav.mx/~ceramics/hibridos.htm>

- 124.Cano C., I.M.; et al. (1999). In: Aguirre R.J.R. y Reyes, A. J. A. (ed.). VIII Congreso Nacional y VI Internacional sobre el conocimiento y aprovechamiento del nopal. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Instituto de Investigación de Zonas Desérticas. San Luis Potosí, México.pp. 52-53.
- 125.Salvador H. Guzmán-Maldonado, Ana L. Morales-Montelongo, Candelario Mondragón-Jacobo, Guadalupe Herrera-Hernández, Fidel Guevara-Lara, and Rosalía Reynoso-Camacho (2010). Physicochemical, Nutritional, and Functional Characterization of Fruits Xoconostle (*Opuntia matudae*) Pears from Central-México Region. Vol. 75, Nr. 6.
- 126.William Reusch (2013). Espectrometría de masas [Internet]. Recuperado de:  
<https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/massspec/masspec1.htm>
- 127.Kaname K, Kohsaku O, Kenichi H, Ryuichi O, Takaya S, Kei M (2003). Constitution of konjac glucomannan; chemical analysis and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers.*, 53:183-189.
- 128.Yu H, Huang Y, Ying H, Xiao C (2007). Preparation and Characterization of a quaternary ammonium derivative of Konjac glucomannan. *Carbohydrate Polym*, 69: 29-40.
- 129.G. Xiong , U. Pal , J. G. Serrano , K. B. Ucer , and R. T. Williams (2006). Photoluminescence and FTIR study of ZnO nanoparticles: the impurity and defect perspective. No. 10, 3577–3581.
- 130.Ogawa, K.; Yui, T.; Mizuno, T. (1991). X-Ray-diffraction study of glucomannans and their acetates. *Agr. Biol. Chem.*, 55, 2105–2111.
- 131.J. Zhou, F. Zhao, Y. Wang, Y. Zhang, and L. Yang (2007). Size-controlled synthesis of ZnO nanoparticles and their photoluminescence properties, *Journal of Luminescence*, vol. 122-123, no. 1-2, pp. 195–197.
- 132.Z. M. Khoshhesab, M. Sarfaraz, and M. A. Asadabad (2011) Preparation of ZnO nanostructures by chemical precipitation method, *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry*, vol. 41, no. 7, pp. 814–819.
- 133.S. Warnke, G. von Helden, K. Pagel; Mermelada. *Chem. Soc.* 135 , 1177-1180 (2013).
- 134.M. M. AbdElhady (2012). Preparation and Characterization of Chitosan/Zinc Oxide Nanoparticles for Imparting Antimicrobial and UV Protection to Cotton Fabric. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* Volume 2012.
- 135.Ogawa, K .; Yui, T .; Mizuno, T. Estudio de difracción de rayos X de glucomanos y sus acetatos. *Agr. Biol. Chem.* 1991, 55 , 2105 - 21111.

136. Wong MS, Chu WC, Sun DS, Huang HS, Chen JH, Tsai PJ, et al. (2006) Visible-light-induced bactericidal activity of a nitrogen-doped titanium photocatalyst against human pathogens. *Appl Environ Microbiol*;72:6111–6116.
137. Henlin Xu, Youhui Yang, Yueming Jiang, Yuanming Sun, Yudong Shen and Jie Pang (2008). Synthesis and Characterization of Konjac Glucomannan-Graft-Polyacrylamide via  $\gamma$ -Irradiation. *Molecules*, 13(3), 490-500.
138. Mark J. Eichler, Mark A. Carlson (2006). Modeling dermal granulation tissue with the linear fibroblast-populated collagen matrix: A comparison with the round matrix model. *Journal of Dermatological Science* 41, 97–108.
139. Samuel Kogan, BA; Aditya Sood, MD, MBA; y Mark S. Granick, MD (2017). *Wound Healing*. Volumen 29 - Número 4 – abril.
140. Tetsuo Koshijima (1962) Studies on Mannan in Wood Pulp, *Agricultural and Biological Chemistry*, 26:2, 98-105.
141. Oliveira SM, Silva JBP, Hernandez MZ, Lima MCA, Galdino SL, Pitta IR. Structure, reactivity, and biological properties of hidantoines. *Quim Nova*. 2008;31(3):614-22.
142. T.S. Stewart, C.E. Ballou, A comparison of yeast mannans and phosphomannans by acetolysis, *Biochemistry* 7 (1968) 1855–1863.
143. M.V. Mugade, V.B. Pokharkar, In-silico comparative molecular docking studies of mannan and mannan sulphate with mannose receptor, *J. Pharm. Drug Deliv. Res.* 5 (3) (2016) 1–4.
144. K.P. Bankura, D. Maity, M.M. Mollick, D. Mondal, B. Bhowmick, M.K. Bain, et al., Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran stabilized silver nanoparticles in aqueous medium, *Carbohydr. Polym.* 89 (4) (2012) 1159–1165.

