



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina
Licenciatura en Biomedicina
Instituto de Fisiología
Laboratorio de Fisiología Celular

**“Determinación del efecto cicatrizante del extracto de
Calendula officinalis L. en sinergia con membranas de
ácido poliláctico y alcohol polivinílico en heridas
posquirúrgicas de modelo murino de la cepa Wistar”**

Tesis para obtener el grado de:
Licenciado en Biomedicina

Presenta:
Miriam Yesenia Cortés Sánchez

Directora:
D.C. Maura Cárdenas García

Codirectora:
D.C. María Guadalupe Hernández Linares

Puebla de Zaragoza, Puebla.
Diciembre de 2020.

Índice

1	Resumen.....	1
2	Introducción.....	1
3	Antecedentes.	3
3.1	Antecedentes generales.....	3
3.1.1	Generalidades anatómicas de la piel.	3
3.1.2	Epidermis.	4
3.1.3	Dermis.....	6
3.1.4	Hipodermis.	9
3.1.5	Concepto y clasificación de herida.	9
3.1.6	Cicatrización.....	11
3.1.7	Técnica de electrohilado (electrospinning).	17
3.1.8	<i>Calendula officinalis</i> L.....	19
3.1.9	Clasificación taxonómica.	20
3.1.10	Descripción botánica y requerimientos.....	20
3.1.11	Compuestos fitoquímicos y propiedades de <i>Calendula officinalis</i> L.	21
3.2	Antecedentes específicos.	23
3.2.1	Estudios con <i>Calendula officinalis</i> L. en la regeneración cutánea. .	23
3.2.2	Nanofibras y <i>Calendula officinalis</i> L. en la regeneración cutánea. .	25
4	Planteamiento del Problema.	28
5	Objetivos.	30
5.1	Objetivo General.	30
5.2	Objetivos Particulares.	30
6	Materiales y Métodos.	31

6.1	Recolección, identificación taxonómica y preparación del material vegetal.	31
6.2	Elaboración de extractos de <i>Calendula officinalis</i> L.	32
6.2.1	Extracción Asistida por Microondas (MAE).	32
6.2.2	Extracción con equipo Soxhlet.	34
6.2.3	Extracción por método convencional.	35
6.3	Cuantificación de compuestos fenólicos totales (CFT).	37
6.4	Cuantificación de capacidad antioxidante (CA).	38
6.5	Elaboración y caracterización de las membranas electrohiladas de PVA/PLA.	39
6.5.1	Prueba de adherencia plaquetaria.	42
6.6	Experimento <i>in vivo</i> .	43
6.6.1	Análisis histomorfológico.	45
6.7	Experimentos <i>in vitro</i> .	46
6.7.1	Proliferación de celular de fibroblastos.	46
6.7.2	Curva de crecimiento fibroblástica.	48
6.8	Análisis de datos.	50
7	Resultados.	50
7.1	Obtención de extractos de <i>Calendula officinalis</i> L.	50
7.2	Espectroscopia UV- VIS de los extractos.	51
7.3	Cuantificación de Compuestos Fenólicos Totales (CFT).	54
7.4	Cuantificación de la capacidad antioxidante.	56
7.5	Caracterización de las membranas de PVA/PLA por microscopia electrónica de barrido (SEM).	57
7.6	Prueba de adherencia plaquetaria	59
7.7	Resultados morfológicos de las heridas.	62

7.8	Resultados del análisis histológico.....	64
7.8.1	Resultados de la cuantificación de fibras de colágeno.....	77
7.9	Resultados del análisis estadístico.	77
8	Discusión.....	80
9	Conclusiones.....	91
10	Bibliografía.....	92
11	Anexos.....	106

Índice de Figuras

Figura 1. Anatomía de la piel.....	3
Figura 2. Fases del proceso de cicatrización.	11
Figura 3. Cronología de la cicatrización en humanos.....	16
Figura 4. Componentes del equipo de electrohilado.	18
Figura 5. Acciones de las nanofibras en sinergia con compuestos fitoquímicos de plantas.....	26
Figura 6. Ejemplares de la planta <i>Calendula officinalis</i> L.	31
Figura 7. Procesamiento de los pétalos de <i>Calendula officinalis</i> L.....	32
Figura 8. Extracción asistida por microondas de flor de <i>Celendula officinalis</i> L.	33
Figura 9. Equipo para la Extracción Asistida por Microondas (MAE).	33
Figura 10. Evaporación de solvente etanólico.....	34
Figura 11. Extracción con equipo Soxhlet.	35
Figura 12. Proceso de extracción por método convencional.....	36
Figura 13. Filtración de extractos.	36
Figura 14. Esquematización del experimento CFT.....	37
Figura 15. Lectura de absorbancias en fotómetro para microplacas a 760 nm.....	37
Figura 16. Distribución de muestras y reactivos para CA.....	38
Figura 17. Distribución final de muestras y reactivos de CA.	39
Figura 18. Lectura de absorbancias en fotómetro para microplacas a 515nm.....	39
Figura 19. Fórmulas concentración peso/volumen de soluciones poliméricas.....	40
Figura 20. Soluciones poliméricas de PVA y PLA.	40
Figura 21. Equipo de electrohilado.....	41
Figura 22. Equipo de Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	41
Figura 23. Prueba de adherencia plaquetaria.	42
Figura 24. Equipo de Sputtering y SEM.	43
Figura 25. Esquema de ubicación de la herida. Fuente propia	44
Figura 26. Equipo de observación y fotografiado de heridas.	45
Figura 27. Progresión del cultivo celular inicial de fibroblastos.	47
Figura 28. Progresión del crecimiento celular pase 1.....	47
Figura 29. Equipo de conteo de fibroblastos en cámara de Neubauer.....	48

Figura 30. Planeación de la curva de crecimiento.....	49
Figura 31. Extractos acuosos y etanólicos de <i>C. officinalis</i> L. filtrados.	51
Figura 32 Espectros de absorción UV-visible.....	53
Figura 33. Espectro UV-visible de extractos asistidos por microondas.....	54
Figura 36. Membrana elaborada de PVA/PLA por método de electrohilado.	57
Figura 37. Caracterización con SEM de membranas de PVA/PLA.	58
Figura 38. Imágenes de SEM de membrana de PLA.....	59
Figura 39. Imágenes de SEM de membrana de PVA.....	59
Figura 40. Micrografía de adherencia plaquetaria en membrana de PLA.	60
Figura 41. Micrografía de adherencia plaquetaria en fragmento de PLA.	61
Figura 42. Micrografía de adherencia plaquetaria en fragmento de PLA.	61
Figura 43. Fotografías de heridas.	63
Figura 44. Corte histológico del tejido control negativo.	64
Figura 45. Corte histológico del tejido control positivo.	65
Figura 46. Corte histológico del tejido tratado con membrana de PVA/PLA.	66
Figura 47. Corte histológico del tejido tratado con extracto acuoso por método convencional (EAMC).....	67
Figura 48. Corte histológico del tejido tratado con extracto etanólico con equipo Soxhlet (EEMS).....	68
Figura 49. Corte histológico del tejido tratado con extracto acuoso con equipo Soxhlet (EAMS).....	69
Figura 50. Corte histológico del tejido tratado con extracto etanólico asistido por microondas (EEAM).	70
Figura 51. Corte histológico del tejido tratado con extracto acuoso asistido por microondas (EAAM).	71
Figura 52. Corte histológico del tejido tratado con membrana de PVA/PLA más extracto acuoso por método convencional (EAMC).	72
Figura 53. Corte histológico del tejido tratado con membrana de PVA/PLA más extracto etanólico con equipo Soxhlet (EEMS).	73
Figura 54. Corte histológico del tejido tratado con membrana de PVA/PLA más extracto acuoso con equipo Soxhlet.....	74

Figura 55. Corte histológico del tejido tratado con membrana de PVA/PLA más extracto etanólico asistido con microondas (EEAM).	75
Figura 56. Corte histológico del tejido tratado con membrana de PVA/PLA más extracto acuoso asistido por microondas (EAAM).	76

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de heridas agudas.	10
Tabla 2. Extractos acuosos y etanólicos de <i>Calendula officinalis</i> L.	36
Tabla 3. Distribución de los tratamientos.	43
Tabla 4. Método de extracción, concentración y solvente de los extractos obtenidos.	51
Tabla 5. Contenido de fenoles totales.	55
Tabla 6. Capacidad antioxidante de extractos acuosos y etanólicos.	56
Tabla 7. Cuantificación de fibras de colágeno.	77
Tabla 8. Conjunto de datos homogéneos.	78
Tabla 9. Estadística descriptiva.	107
Tabla 10. Análisis de varianza de una vía.	111

1 Resumen.

El proceso de cicatrización es un proceso complejo e implica una comunicación extensa entre los diferentes componentes celulares de los compartimentos de la piel y su matriz extracelular (MEC). Las evidencias obtenidas de la investigación básica, sobre la identificación de los compuestos fitoquímicos de la *Calendula officinalis* L. han formado la base para el desarrollo de terapias innovadoras y eficaces utilizando las propiedades farmacológicas de las plantas. La *Calendula officinalis* L. es una planta adoptada por México y ampliamente utilizada en la medicina tradicional para la curación de heridas. Otro aliado en la regeneración cutánea es la ingeniería de tejidos, ésta proporciona técnicas que se aplican en diversas áreas biomédicas; este proyecto se enfocó en la creación de nanofibras de PVA/PLA por electrohilado en sinergia con extractos de flor de *C. officinalis* L. como posibles andamios tisulares que mimeticen a la matriz extracelular y propicien un ambiente óptimo para la migración, adhesión y proliferación de células implicadas en la regeneración cutánea.

Los análisis estadísticos, histológicos y morfológicos indicaron que los extractos EAMC, EEAM y EAAM usados individualmente proporcionaron un resultado final óptimo del proceso de cicatrización en comparación con los controles. De igual manera y respondiendo la pregunta central de esta investigación, los análisis ejecutados determinaron que la combinación de M+EAMC, M+EEAM y M+EAAM produjeron una proliferación celular apropiada y una correcta remodelación de las capa dérmicas y epidérmicas, así también, un aumento en la actividad angiogénica, de este modo, estos tratamientos optimizaron la velocidad del proceso de cicatrización y el resultado final del mismo en comparación con los controles.

2 Introducción.

La planta *Calendula officinalis* L. pertenece a la familia *Asteraceae* que incluye alrededor de 25 especies de herbáceas anuales, es de origen mediterráneo (Arora et al., 2013; Parente et al., 2012) y conocida popularmente como caléndula o marigold (Acosta De La Luz et al., 2001), sus orígenes como alimento y planta

medicinal datan desde la edad media, culturas como la hindú, árabe, griega y romana utilizaban esta especie como colorante textil (Efstratiou et al., 2012), medicinal (Carvalho et al., 2018; Lastra Valdés & Piquet García, 1999) y en cosméticos (Parente et al., 2012). Especialmente las flores se han utilizado y estudiando por poseer propiedades antiinflamatorias (Loggia et al., 1994; Parente et al., 2012; Ukiya et al., 2006), antioxidantes (Fonseca et al., 2010; Preethi et al., 2006), angiogénicas (Parente et al., 2011; Patrick et al., 1996), antifúngicos (Burgos Guerrer & Riascos Cabrera, 2013), antimicrobianas (Efstratiou et al., 2012; Pedram Rad et al., 2019) y cicatrizantes (Aro et al., 2015; Dinda et al., 2015, 2016; Fronza et al., 2009; Givol et al., 2019; Nicolaus et al., 2017; Parente et al., 2012) debido a la presencia de múltiples componentes fitoquímicos.

La ingeniería tisular brinda nuevas alternativas haciendo uso de la tecnología y siendo pionera en la investigación y elaboración de nano fibras a partir de la técnica de electrohilado (electrospinning en inglés) (Xue et al., 2017). La técnica ha tenido un auge en la aplicación biomédica, creando andamios que imiten el ambiente biológico de la matriz extracelular (MEC), y con ello perfeccionar las interacciones con las células (adhesión, proliferación y migración) claves para la progresión de la cicatrización (Anún et al., 2018; Kai et al., 2015; Valencia-Gómez et al., 2016).

Existe una amplia gama de materiales que se emplea en la fabricación de nanofibras: polímeros biodegradables, biocompatibles, resistentes, tensoactivos; tomando en cuenta lo anterior se propusieron los siguientes polímeros a utilizar. El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero sintético hidrofílico, biocompatible y biodegradables, ampliamente utilizado en diferentes áreas del campo biomédico por poseer la propiedad de ser elástico (Chu & Rutt, 1997; Jiang et al., 2011)(Chu & Rutt, 1997). El ácido poliláctico (PLA) es un poliéster alifático, hidrófobo, utilizado para hilos de sutura, tornillos para fijación ósea, dispositivos para administrar medicamentos y presenta propiedades termo mecánicas (Bayer, 2017; Chaudhari et al., 2016; Singhvi et al., 2019).

El objetivo esencial de este estudio fue evaluar y determinar el efecto del extracto de *Calendula officinalis* L. en sinergia con membranas poliméricas PVA/PLA en el

tratamiento de heridas posquirúrgicas en ratas de la cepa Wistar. Para encontrar una posible combinación eficaz que potencialice el proceso de cicatrización.

3 Antecedentes.

3.1 Antecedentes generales.

3.1.1 Generalidades anatómicas de la piel.

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, representa alrededor del 15% de peso corporal total de un adulto (Cole et al., 2011). Este órgano es una barrera natural que nos protege contra agentes físicos, químicos y biológicos externos, evita la pérdida de líquidos y participa en la termorregulación (Cole et al., 2011; Kolarsick et al., 2011; McLafferty et al., 2012; Saavedra et al., 2005). Histológicamente la piel se compone de tres capas ubicadas en orden descendente: epidermis, dermis e hipodermis (Kolarsick et al., 2011) como se observa en la Figura 1.

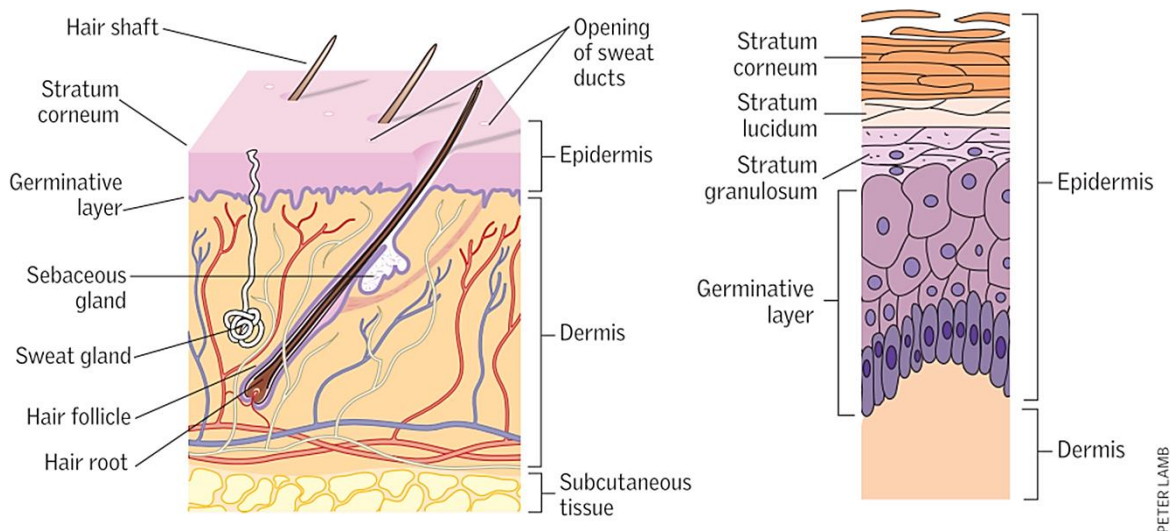


Figura 1. Anatomía de la piel.

Se observa de lado izquierdo un esquema representativo de fragmento de piel, se muestra la capa epidérmica como la más superficial, seguida de la capa dérmica en la cual se encuentran una serie de anexos como: unidades pilosebáceas, vasos sanguíneos, terminaciones nerviosas. Por último y la más profunda, es la capa de tejido subcutáneo o hipodermis conformada principalmente por tejido graso. En el esquema de la derecha se esquematizan 4 de los 5 estratos de la capa epidérmica (estrato córneo, lúcido, granuloso y germinativo o basal ubicados de orden descendente), faltando el estrato espinoso. Cada estrato está estructurado por células es distintos estadios de

diferenciación. Fuente: McLafferty, E., Hendry, C., & Farley, A. (2013). The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nursing Standard*, 27(3), 35–42. <https://doi.org/10.7748/ns2012.09.27.3.35.c9299>.

3.1.2 Epidermis.

La epidermis es la capa más superficial está conformada de epitelio estratificado, entre un 90% o 95% de células denominadas queratinocitos, derivadas del ectodermo (Cole et al., 2011). Otras células importantes que se encuentran son: los melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel que más adelante se mencionaran (Cole et al., 2011; Kolarsick et al., 2011; McLafferty et al., 2012). Dicha capa se divide a su vez en 5 estratos desde la más interna a la externa: estrato germinativo o basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lúcido y estrato córneo (Kolarsick et al., 2011). La epidermis se caracteriza por renovarse constantemente, gracias a los ciclos de proliferación de células basales presentes en el estrato germinativo (Kolarsick et al., 2011).

- Estrato basal o germinativo: conformada por una capa de células basales, organizadas en forma de columna, adheridas a lamina basal perpendicular a la dermis (Cole et al., 2011; Kolarsick et al., 2011; McLafferty et al., 2013). Estas células presentan núcleos ovalados o alargados de tinción oscura y presencia del pigmento melanina producido por los melanocitos; los queratinocitos son células activas y aumentan aún más su actividad en la regeneración cutánea; el proceso de diferenciación de los queratinocitos al momento de migrar desde la capa basal a la superficial da como resultado el proceso de queratinización (Kolarsick et al., 2011; Norris & Tuan, 2019).
- Estrato espinoso: se encuentra sobre la capa de células basales, a medida que las células de este estrato se desplazan hacia la superficie se diferencian (Norris & Tuan, 2019).
- Estrato granuloso: estructurada por células granulosas, que suelen ser las más diferenciadas de la piel, estas células son particulares, por presentar paralelamente dos funciones contrapuestas; unas células pierden su capacidad mitótica y otras sintetizan queratina. Los queratinocitos presentes en este estrato

tienen la función de secretar cuerpos laminares útiles en el siguiente estrato y dan la particularidad y propiedad a la piel de ser impermeable (Cole et al., 2011; Kolarsick et al., 2011; Norris & Tuan, 2019).

- Estrato lúcido: es una capa delgada que se encuentra comúnmente en áreas de piel gruesa como palmas de las manos y plantas de los pies, este estrato se conforma de queratinocitos cristalinos y muertos (Norris & Tuan, 2019).
- Estrato córneo: el nivel más superficial, está formado por queratinocitos aplanados apoptóticos, estas células contienen queratina, proteína que brindan la protección mecánica y térmica a la epidermis y a los tejidos, el estrato está conformado por un gran número de capas (25-30 capas), que dependen de la zona anatómica (Kolarsick et al., 2011; Norris & Tuan, 2019).

Existen múltiples células presentes en los distintos estratos con funciones específicas, entre éstas podemos mencionar: melanocitos, células dendríticas que sintetiza un pigmento llamado melanina que le confiere la tonalidad a la piel e impiden la absorción de radiaciones dañinas (Cole et al., 2011), dicho pigmento se almacena en el melanosoma un organelo especial del melanocito. La melanina se transfiere hacia los queratinocitos, ha mayor producción de melanina mayor será la pigmentación de la piel, cabe destacar que la densidad de los melanocitos es constante en los individuos (Kolarsick et al., 2011).

Otras células importantes son las denominadas células de Merkel que estructuralmente son mecanorreceptores de tipo I con adaptación lenta, ubicados en sitios de alta sensibilidad táctil, por su ubicación colindante a los queratinocitos una deformación de estos es suficiente para que las células de Merkel envíen una señal química y se transmita una señal al cerebro misma que se procesa y se regresa en una respuesta. A más concentración de células de Merkel en una región, le confiere mayor resolución y sensibilidad táctil a la zona (Cole et al., 2011; Kolarsick et al., 2011; Norris & Tuan, 2019).

Es importante mencionar que la piel es una barrera ante la reacción inmunitaria y es aquí donde están involucradas las células de Langerhans, son células dendríticas

que al igual que todas las células del sistema inmunológico se originan en la médula ósea y migran a la epidermis durante el desarrollo embrionario, y a lo largo de la vida. No crean uniones con otras células, pero se distribuyen entre el estrato escamoso y granular. Su función particular es reconocer y procesar los antígenos solubles que pudieran presentar en el tejido epidérmico (Kolarsick et al., 2011).

3.1.3 Dermis.

Esta capa tiene un grosor distinto dependiendo de la ubicación anatómica; conformada por tejido conectivo fibroso, proporciona la flexibilidad, elasticidad y resistencia ya que está constituida principalmente por proteínas estructurales, por ejemplo: colágeno y elastina; así también, es una barrera de protección, regulación térmica e incluye receptores para estímulos sensoriales, sin olvidar que proporciona nutrientes a la epidermis (Cole et al., 2011; McLafferty et al., 2012; Suda et al., 2016).

La dermis está compuesta esencialmente de matriz extracelular (MEC), denominada como un área o zona con proteínas la cual brinda soporte para una red compleja de terminaciones nerviosas, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y anexos cutáneos (folículos pilosos y glándulas: ecrinas y apocrinas) (McLafferty et al., 2012). Además de ser parte estructural brindando sostén mecánico y propiedades viscoelásticas; la MEC también regula a las células cercanas, brindándoles la capacidad a las células para migrar, proliferar y sobrevivir ante una lesión (Cole et al., 2011). El componente primordial de esta capa es el colágeno, es la proteína más abundante del cuerpo humano y cuenta con al menos 28 subtipos distintos, asimismo representa el 70% del peso seco de la piel (Cole et al., 2011; Kolarsick et al., 2011). Entre los más comunes están el tipo I que se encuentra en tejido conectivo y embrionario, el tipo II lo encontramos en cartílago y el humor vítreo, el colágeno tipo III presente en tejido viscerales y cardiovasculares o en tejido con alto contenido de colágeno tipo I; la clasificación se basa en la estructura de sus cadenas α : homotriméricos (ejemplo: tipo II y III) o heterotriméricos (ejemplo: tipo I), también se clasifican en subfamilias según su estructura cuaternaria, una de estas subfamilias son los colágenos fibrilares (ejemplo: tipo II, III, V y XI) y respecto a la

cercanía con células en el espacio extracelular se clasifican en colágenos intersticiales (ejemplo: tipo I, II, III y V) (Amar et al., 2017). En los tejidos, las células y el colágeno interactúan indirectamente, sin embargo, se sabe que las células presentan receptores para dominios de triple hélice de colágenos, por tanto, a los subtipos de colágenos se les cataloga propiedades similares a las proteínas de adhesión celular (Heino, 2007).

Se puede observar histológicamente dos capas en la dermis: la dermis papilar superficial y la dermis reticular más profunda, éstas se forman a partir de distintos linajes de fibroblastos y así dan origen a las diferencias en la arquitectura de las fibrillas (Wong et al., 2016).

- Dermis papilar: es una capa delgada en donde se encuentran fibras de colágeno intercaladas con fibras elásticas y sustancia fundamental, además presenta los nervios y capilares que nutren a la epidermis; sin dejar mencionar que está cubierta por proyecciones llamadas papilas dérmicas (McLafferty et al., 2012; Norris & Tuan, 2019).
- Dermis reticular: es una capa gruesa formada por tejido conectivo, contiene fibras de colágeno de diámetro mayor (80,000 nm aproximadamente) (McLafferty et al., 2012; Wong et al., 2016). Los estudios enfocados sobre esta dermis reticular han revelado la presencia de otras células dendríticas de origen mieloide llamados dendrocitos cutáneos, estas células tienen un papel importante en la presentación de antígenos, fagocitosis y en general en la inmunología de la dermis; por tanto, se consideran relevantes y con una participación importante en los procesos de cicatrización, coagulación e inflamación (Norris & Tuan, 2019).

Además, la dermis presenta receptores sensitivos como los corpúsculos de Meissner, Ruffini y Pacini que detectan presión, vibración y tacto respectivamente; todos estos importantes en la sensibilidad cutánea (Cole et al., 2011). Entre las células inmunitarias presentes en la dermis se encuentran: macrófagos, mastocitos, linfocitos T y fibroblastos (Norris & Tuan, 2019). Por otro lado, la dermis presenta agrupaciones derivadas del ectodermo conocidas comúnmente como anexos, dentro de los principales podemos mencionar:

- Glándulas ecrinas: son glándulas tubulares simples en espiral ubicadas en todo el cuerpo, pero en mayor número en la frente, palmas de las manos y plantas de los pies. Son productoras de sudor y producen un total de 600ml de sudor diarios, estas glándulas tienen como función primordial la termorregulación (Cole et al., 2011; McLafferty et al., 2012).
- Glándulas apocrinas: son glándulas tubulares en espiral simples ubicadas más profundamente en la dermis, se ubican principalmente en las axilas, región anogenital, ingle, areolas de las mamas y en la barbilla de los hombres, en comparación este sudor producido es viscoso y tiene un aspecto lechoso/amarillento (Cole et al., 2011; McLafferty et al., 2012; Norris & Tuan, 2019; Wong et al., 2016).
- Glándulas sebáceas: se clasifican como glándulas acinares simple ramificadas que secretan sebo, una sustancia aceitosa compuesta por: triglicéridos, colesterol, proteínas y sales orgánicas. La mayoría están acopladas a folículos pilosos, éstas se encuentran con mayor frecuencia en la cara, cuello y espalda (McLafferty et al., 2012). Entre las funciones del sebo son: proteger la superficie de los cabellos para evitar su resequedad e inhibir la evaporación descomunal del agua de la piel para mantener la suavidad y flexibilidad (Cole et al., 2011; McLafferty et al., 2012; Norris & Tuan, 2019; Wong et al., 2016).
- Glándulas ceruminosas: son glándulas sudoríparas modificadas que se encuentran especialmente en el oído externo y son las encargadas de la producción de cerumen y con éste brindar la barrea para la impedir la entrada de objetos o agentes extraños en el oído (McLafferty et al., 2012).
- Folículos pilosos en conjunto con las glándulas sebáceas forman la unidad pilosebácea (productora de crecimiento de pelo y sebo); además, el folículo piloso contiene una reserva de células progenitoras implicadas en el restablecimiento de la epidermis ante una lesión y glándulas apócrinas que son productoras de feromonas en mamíferos (Cole et al., 2011).
- Uñas: compuestas por queratina su función es proteger los extremos de dedos y posibilitar hacer movimientos rudos. Su crecimiento se debe a la presencia de células germinales en la denominada raíz de la uña (McLafferty et al., 2012).

3.1.4 Hipodermis.

La hipodermis o también llamado tejido subcutáneo es la capa más profunda de la piel, estructurada por adipocitos y tejido conjuntivo laxo, mismo que le proporciona el soporte a la vasculatura y nervios. Esta capa está involucrada en la función inmunitaria de la piel, ya que el grosor depende de la ubicación; por ejemplo, será más delgada si está sobre una estructura ósea o en su caso más gruesa si cubre a otros órganos (Norris & Tuan, 2019).

3.1.5 Concepto y clasificación de herida.

La herida o también llamada comúnmente lesión se define de manera distinta, la Sociedad de Enfermeras en Heridas, Ostomía y Continencia, conocida por sus siglas en inglés como WOCN (Wound, Ostomy and Continence Nurses), define herida como ... “una interrupción en la estructura y función de la piel y de tejidos subyacentes, relacionada con diversas etiologías, como traumatismos, cirugías, presión sostenida y enfermedades vasculares” ... (Vela et al., 2018). En México en el manual clínico para la estandarización del cuidado y tratamiento a pacientes con heridas agudas y crónicas, publicado por la secretaria de salud en 2016, define herida como ... “toda disrupción de estructuras anatómicas y funcionales normales” ... (Secretaria de Salud, 2016).

Un paso importante e inicial para el manejo oportuno es clasificar a la herida en aguda o crónica, dependiendo si tiene o no un proceso de cicatrización ordenado dentro de un tiempo adecuado (menor a 21 días); y también, si la regeneración anatómica y funcional se ha realizado adecuadamente (Secretaria de Salud, 2016). Las heridas agudas se definen como aquellas que son causadas por un traumatismo o debido a una intervención quirúrgica, además cicatrizan en forma y tiempo predecibles (Barbul & Efron, 2011; Brunicardi et al., 2011; Secretaria de Salud, 2016). Por el contrario, si la herida permanece abierta durante un tiempo que exceda los 21 días, la herida se considera crónica, la permanencia en una etapa en específico de la cicatrización es consecuencia de diversos factores como: estado nutricional, nivel de oxigenación de tejidos, elevada carga bacteriana, exceso de humedad, estrés físico y/o emocional, y patologías adicionales en el paciente (Barbul & Efron, 2011; Vela et al., 2018). Específicamente para las heridas agudas

existen clasificaciones que se basan en diferentes aspectos como: extensión, profundidad, gravedad, localización, pronóstico o agente causal entre otras (Barbul & Efron, 2011; Bosch, 2001; Secretaria de Salud, 2016). Con base en diversas fuentes de información la clasificación de heridas agudas se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de heridas agudas.

A) Aspecto de herida	B) Según la causa	C) Estructuras cutáneas comprometidas
1. Contusa: sin bordes netos. 2. Cortante: con bordes netos. 3. Contuso cortantes. 4. Punzante: arma blanca. 5. Atrición: aplastamiento de un segmento corporal. 6. Avulsión, arrancamiento o amputación. 7. A colgajo: tangencial a piel y unida a ésta sólo por su base. 8. Abrasiva o erosiva: múltiples áreas sin epidermis, pero con conservación del resto de las capas de la piel. 9. Quemadura.	1. Por arma blanca. 2. Por arma de fuego. 3. Por objeto contuso. 4. Por mordedura de animal. 5. Por agente químico. 6. Por agente térmico.	1. Simples (sólo piel). 2. Complicadas (complejas): compromiso de vasos sanguíneos, nervios, cartílagos y/o músculos.
D. Según pérdida de sustancia.		E. Según la profundidad
1. Sin pérdida de sustancia. 2. Con pérdida de sustancia		1. Superficial: el daño se extiende sobre la epidermis y las partes superficiales de la dermis. 2. Parcial: involucran partes mayores de la dermis. 3. Total: abarcan incluso la capa de tejido subcutáneo.

Fuente: Manual Clínico para la estandarización del cuidado y tratamiento a pacientes con heridas agudas y crónicas. http://www.calidad.salud.gob.mx/site/editorial/docs/Manual_Clinico_Heridas.pdf

3.1.6 Cicatrización.

La cicatrización de heridas implica una comunicación extensa entre los diferentes componentes celulares de los compartimentos de la piel y su MEC (Eming et al., 2014). En condiciones fisiológicas y en un individuo sano este proceso transcurre eficientemente; sin embargo, cuando la reparación va mal en algún aspecto; da lugar a dos resultados: evolución a una herida crónica o la presencia final de una cicatriz hipertrófica o queloide.

La cicatrización de una herida está formada por distintas fases sobrepuestas que no tienen un periodo de tiempo definido, pero para su explicación se han dividido en: hemostasia, respuesta inflamatoria, proliferación y remodelación-maduración (Baum & Arpey, 2005; Korting et al., 2011) (Figura 2).

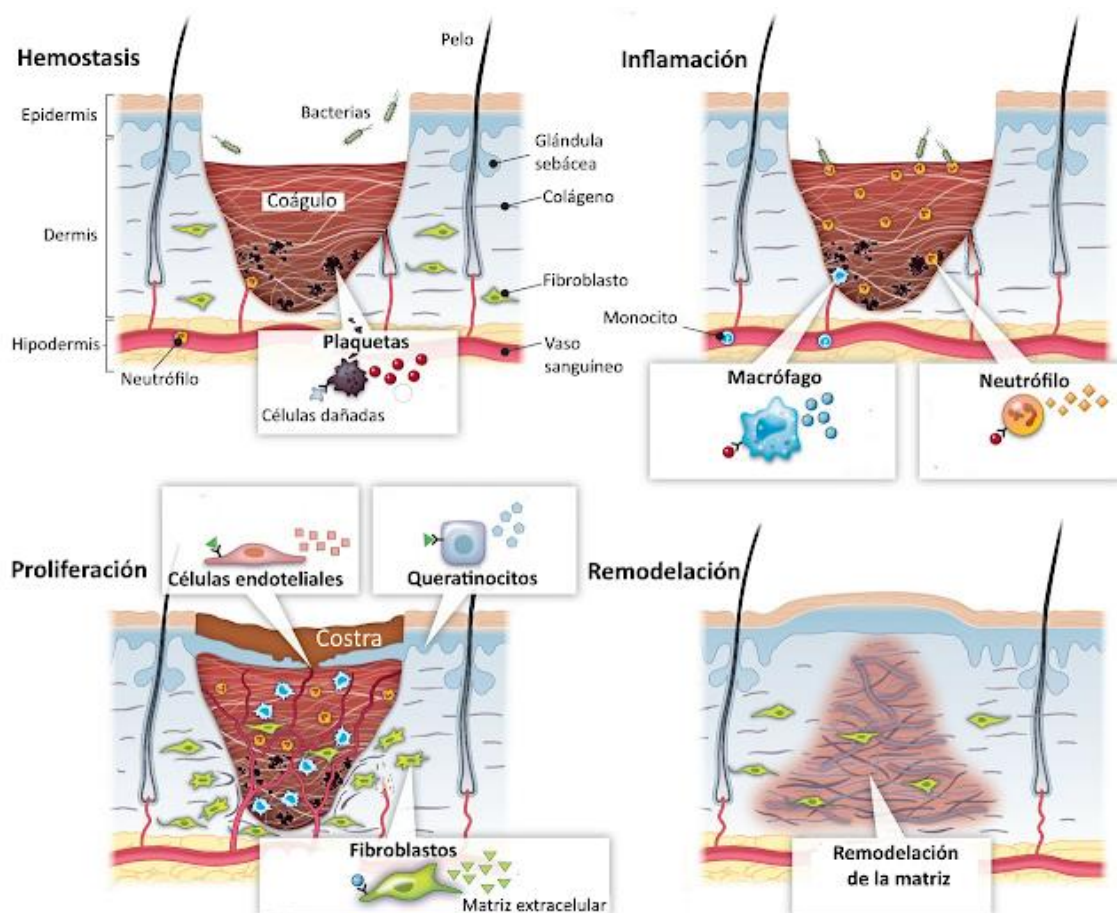


Figura 2. Fases del proceso de cicatrización.

Se esquematiza de manera individual las etapas del proceso de cicatrización: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación-maduración; también, se representan células importantes

y demás estructuras que tienen un papel central en cada una de las fases. Fuente: Pérez, A. (2017). Identificación de las propiedades de antimicrobianos en heridas: revisión narrativa [Universidad de Jaén]. <http://tauja.ujaen.es/jspui/handle/10953.1/6328>

- Hemostasia: es un proceso que tiene como objetivo limitar la pérdida de sangre debido a los vasos sanguíneos lesionados (Brunicardi et al., 2011)). Inicialmente la lesión del tejido se acompaña de una lesión vascular, hipoxia y por tanto, extravasación de sangre, seguida de una rápida vasoconstricción inducida por el tromboxano A₂ (TXA₂), endotelinas y serotonina (5-hidroxitriptamina) liberadas en la agregación plaquetaria (Brunicardi et al., 2011; Korting et al., 2011; Suda et al., 2016). Las plaquetas son células sin núcleo imprescindibles para la formación del coagulo hemostático también llamado tapón plaquetario, éstas liberan factores de crecimiento y quimiocinas en el entorno de la herida necesarios para desencadenar procesos posteriores. El cambio de este coagulo hemostático, se da en la hemostasia secundaria con la formación de un tapón de fibrina, fibronectina, vitronectina y trombospondina, el cual asegura la hemostasia y proporciona un soporte para iniciar la invasión y el reclutamiento de células inflamatorias iniciales: monocitos y neutrófilos (Eming et al., 2014).
- Fase inflamatoria: la inflamación aguda es la respuesta de los tejidos vascularizados a la lesión (Brunicardi et al., 2011; Grossman & Porth, 2019; Korting et al., 2011; V. Kumar et al., 2015), la inflamación aguda sucede en dos etapas: la etapa vascular, la cual se identifica por cambios en los vasos sanguíneos pequeños en el sitio de la lesión, identificado por la presencia de edema tisular e inicialmente se origina una vasoconstricción momentánea seguida inmediatamente de una vasodilatación debido a sustancias como la histamina, ésta vasodilatación produce un incremento del flujo sanguíneo ocasionando calor y enrojecimiento (eritema) característicos de esta etapa; por otro lado se induce un aumento en la permeabilidad de la microvasculatura, con salida de líquido rico en proteínas y células (exudado) hacia los espacios lesionados (Grossman & Porth, 2019). La siguiente es la etapa celular, que conduce a la migración de células (leucocitos) de la circulación al sitio de lesión y su activación, además se ven implicados mediadores inflamatorios

destacando: el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor amiloide A sérico (Brunicardi et al., 2011; Grossman & Porth, 2019; V. Kumar et al., 2015).

Las primeras células en migrar al sitio de lesión durante las 24 a 48 hrs después de la herida son neutrófilos que mediante enzimas proteolíticas (colagenasas) comienzan a degradar la matriz extracelular, fagocitar a las bacterias invasoras, así como eliminar residuos celulares y células muertas. Dentro de las 48 a 72 horas siguientes, migran monocitos circulantes que posteriormente se activan en macrófagos tipo M1 o inflamatorios y tipo M2 asociados a la reparación de tejidos, de igual manera migran al sitio de lesión células de Langerhans (dendríticas), citocinas y factores de crecimiento que permiten la llegada de más células del sistema inmune participes en la eliminación de los gérmenes existentes alrededor de la herida, así como en el reclutamiento de fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales que participan en la reparación de los vasos sanguíneos (Barbul & Efron, 2011; Castellanos et al., 2014; Korting et al., 2011; Suda et al., 2016). Entre las últimas células que migran a la herida (más de 72 hrs después de la herida) se encuentran los linfocitos T (Barbul & Efron, 2011; Korting et al., 2011). En 2019 se identificó que las células T CD4 que expresan FOXP3 (llamadas T reguladores) desempeñan un rol esencial en la transición de la fase inflamatoria a la fase proliferativa y de remodelación, a través de la liberación de Anfirregulina un factor de crecimiento similar al Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF); misma que induce la liberación local del Factor de Crecimiento Transformante β (TGF β), una citocina involucrada tanto en la regulación inmunitaria como en el proceso de reparación de heridas (Zaiss et al., 2019). Otras células particulares en este proceso son los fibrocitos, monocitos diferenciados en la circulación previo a llegar al sitio de lesión, a diferencia de los fibroblastos estos no están presentes en tejido, sin embargo, se ven altamente involucrados en los procesos de inflamación crónica, fibrosis y formación de cicatrices, siendo representados como una variante de macrófagos M2 productores de colágeno (Suda et al., 2016).

En general la inflamación es fisiológicamente importante ante una lesión, sin embargo, ocurren alteraciones por factores internos y/o externos del organismo que modifican su duración y evolución, ocasionando alteraciones en el proceso de cicatrización y/o patológicas (Brunicardi et al., 2011).

- Fase de proliferación: abarca de 4 a 12 días aproximadamente después de la herida y se caracteriza por el restablecimiento de la continuidad del tejido gracias a la proliferación y migración de células epiteliales y de fibroblastos, esta proliferación y migración se engloba en la denominada fase de granulación caracterizada por presencia visible de tejido rojo claro (Brunicardi et al., 2011). Los fibroblastos llegan al sitio de la herida entre el fin de la fase inflamatoria y el inicio de esta fase de proliferación por quimio atrayentes como: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), IL-1 β y TNF- α liberados por plaquetas y macrófagos durante la fase inflamatoria. Los fibroblastos son esenciales en la degradación del tapón hemostático de fibrina mediante metaloproteinasas de matriz (MMPs) con el fin de remplazarlo por componentes de la MEC (colágeno I-IV, glucoproteínas, proteoglicanos, laminina, trombospondina, glicosaminoglicanos, ácido hialurónico y sulfato de heparán) (Bainbridge, 2013; Barbul & Efron, 2011; Brunicardi et al., 2011). La MEC recién sintetizada se convertirá en un medio complejo de apoyo y regulación de la migración y función de los fibroblastos, además de brindar el soporte para las diversas estructuras inmersas (Bainbridge, 2013).

Un proceso sincrónico en esta fase es la angiogénesis que es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, este proceso es estimulado por citocinas, TNF- α , TGF β , VEGF y la participación de células endoteliales, este proceso es vital en una cicatrización exitosa (Barbul & Efron, 2011). Los macrófagos a través de la liberación de TGF β , VEGF, Factor de crecimiento similar a la Insulina (IGF) y Factor de crecimiento epitelial (EGF) regulan la proliferación celular, la síntesis de matriz y la angiogénesis en general (Barbul & Efron, 2011).

- Fase de maduración-remodelación: es la fase más larga donde la maduración del tejido da origen al tejido cicatricial (Suda et al., 2016), se caracteriza por la

reorganización del colágeno previamente sintetizado (conversión de colágeno tipo III a colágeno tipo I) (Castellanos et al., 2014; Suda et al., 2016). El colágeno es una proteína abundante en el organismo y es esencial en la conclusión de la cicatrización, aunque hay alrededor de 28 subtipos de colágeno y a su vez se organizan en subgrupos dependiendo de su estructura y función, el tipo I es componente de la MEC en la piel por presentar mayor resistencia a la tracción, mientras que el tipo III aunque también se encuentra en la piel es más destacado en el proceso de reparación inicial (Bainbridge, 2013; Barbul & Efron, 2011; Heino, 2007).

La cantidad y calidad del colágeno recién depositado determina la fuerza y la integridad mecánica de una herida, existe un patrón especial del depósito de matriz: la fibronectina, colágeno tipo III y ácido hialurónico son las estructuras tempranas (Bainbridge, 2013), seguido de los glucosaminoglicanos y proteoglucanos que son los componentes principales de la matriz y el colágeno tipo I complementa la MEC final (Barbul & Efron, 2011).

La remodelación de la cicatriz continúa durante mucho tiempo (meses o incluso años) y como resultado final es la formación gradual de una cicatriz madura, (Brunicardi et al., 2011), sin dejar de mencionar que ocurre una proteólisis de colágeno (colagenólisis) en la MEC, que sucede tanto en el proceso de cicatrización como la progresión de patologías, este proceso es realizado por las MMPs, enzimas de la familia de las endopeptidasas dependientes de Zn^{2+} ; existen colagenasas “clásicas” (MMP-1, MMP-8 y MMP-13) que hidrolizan a colágenos intersticiales (tipo I, II y III). Ahora bien, se conoce que existen otros subtipos como: MMP-2, MMP-9, MMP-12 que de igual manera actúan en los colágenos tipo I, II, III y V, este último hidrolizado únicamente por la MMP-9, pero especialmente la MMP que contribuye a la cicatrización de heridas es la MMP-1 (Amar et al., 2017).

Fisiológicamente todas las heridas presentan contracción esto se traduce en la unión de los bordes de la herida, este proceso es realizado por células denominadas miofibroblastos; son fibroblastos diferenciados ante la presencia

de TGF- β 1 y 2 en el sitio de la herida (Bainbridge, 2013), esta diferenciación se lleva a cabo por una serie de fases las cuales se pueden resumir en : migración de fibroblastos indiferenciados a los tejidos adyacentes, activados en la circulación y es cuando pasan a denominarse proto miofibroblastos; seguido del desarrollo de fibras de estrés para poder migrar y finalmente maduran para convertirse finalmente en miofibroblastos (Hinz, 2016). Estas células contienen a diferencia de los fibroblastos normales actina de musculo liso α en haces llamados fibras de estrés es por ello por lo que poseen capacidad contráctil. La actina se detecta hasta el sexto día y luego alcanza su pico durante los primeros 15 días de la cicatrización, a las 4 semanas disminuye y se sabe que el número de los miofibroblastos disminuye al experimentar apoptosis (Bainbridge, 2013; Barbul & Efron, 2011).

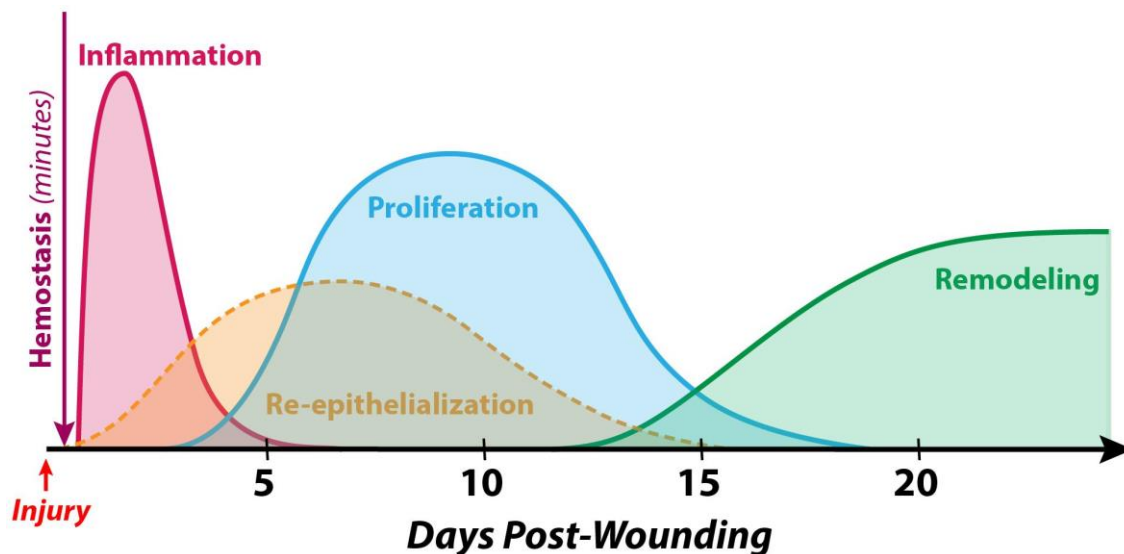


Figura 3. Cronología de la cicatrización en humanos.

Inmediatamente después de la lesión del tejido, inicia el proceso de cicatrización de la herida con la hemostasia, seguida de la fase inflamatoria (que alcanza su punto máximo a las 24 -48 hrs posterior a la lesión y dura varios días) característica por la migración de células inmunitarias (neutrófilos y macrófagos) para la debridación de la herida y eliminación de los agentes microbianos, además de la extensa secreción de citocinas y factores de crecimiento para reclutar otras células. La fase de reepitelización inicia al poco tiempo de la lesión y logra el cierre de ésta al restablecer funcionalmente una barrera de células epiteliales, sucede en el transcurso de días a semanas dependiendo de la extensión inicial de la herida. La fase proliferativa comienza de 4-5 días después de la herida

duración que puede ser hasta semanas e implica la formación de tejido de granulación como algo temporal. Finalmente, se presenta la fase de maduración/remodelación (una de las más largas) iniciando a partir de la tercera semana después de la lesión y dura meses o años, presentando una remodelación gradual de la MEC. Fuente: DesJardins-Park, H. E., Mascharak, S., Chinta, M. S., Wan, D. C., & Longaker, M. T. (2019). The spectrum of scarring in craniofacial wound repair. *Frontiers in Physiology*, 10(MAR), 322. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00322>.

La disponibilidad de apósitos adecuados para el tratamiento de heridas, en particular las crónicas, es una tarea que aún espera mejores soluciones en comparación a las que ofrecen los materiales actualmente aplicados. El método de electrohilado permite la fabricación de materiales novedosos como apósitos para heridas debido a la gran superficie y porosidad de las mallas electrohiladas y la posibilidad de incluir ingredientes bioactivos. Durante el desarrollo de este trabajo se emplearán membranas obtenidas por la técnica de electrohilado que a continuación se describe.

3.1.7 Técnica de electrohilado (electrospinning).

En la actualidad una de las áreas con mayor auge es la ingeniería de tejidos, específicamente, la fabricación de andamios o entramados tisulares, con el objetivo de favorecer el crecimiento celular y la regeneración tisular (Anún et al., 2018). La técnica de electrohilado en inglés “electrospinning”, brinda la facilidad de crear fibras por medio de estiramiento en escala micro y nanométrica, con diámetros ultrafinos para diversas aplicaciones biomédicas, como el tratamiento de heridas, la liberación de fármacos o entramados celulares.

El fundamento de la técnica está basado en someter a un cierto voltaje (kilovoltios Kv) una solución de polímeros, lo que origina la formación de una gota colgante en la punta de inyector (aguja), una vez que el valor crítico del campo eléctrico llega, éste vence la tensión superficial de la solución dando pauta a la deformación de la gota en un cono denominado cono de Taylor (Carolina et al., 2016); en honor a Sir Geoffrey Ingram Taylor que en 1964 publicó la investigación sobre el comportamiento observado de gotas de agua en campos eléctricos, su análisis lo llevaron a obtener el modelo matemático de la forma cónica formada en la gotas de un fluido bajo el efecto de un campo eléctrico (Taylor & A, 1964). Posterior a la

formación del cono, se produce un filamento cargado (jet) (Carolina et al., 2016). El jet se extiende en línea recta y luego se somete a movimientos de latigazo debido a la inestabilidad de la flexión; a medida que el filamento se estira en diámetros más finos, se solidifica rápidamente lo que lleva a la deposición de fibras sólidas en el colector conectado a tierra firme (Xue et al., 2019). El equipo de electrohilado está conformado por el inyector a través del cual será expulsada la solución polimérica, un colector donde se juntarán las fibras una vez hiladas y una fuente de alto voltaje con dos electrodos colocados al inyector y otra al colector (Figura 4) (Duque et al., 2014).

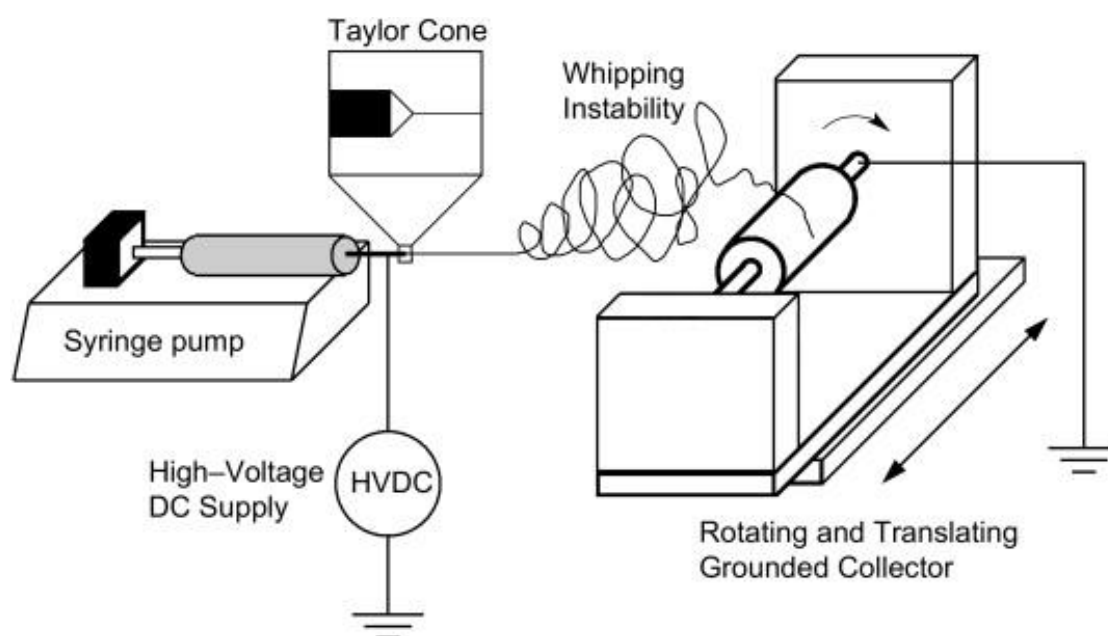


Figura 4. Componentes del equipo de electrohilado.

Se muestra un esquema de un sistema de electrohilado típico. El mecanismo general es la inyección de una o varias sustancias poliméricas a través de una aguja utilizando una bomba de jeringa. La aguja está conectada a una fuente de alto voltaje, que inyecta una carga de cierta polaridad en la solución de polímero. Si la fuerza electrostática creada por la repulsión de cargas similares es suficiente para superar la tensión superficial de la solución de polímero, se forma el cono de Taylor y se emite un jet de fibra desde su vértice. Mientras el jet viaja hacia el colector conectado a tierra, sufre movimientos de inestabilidad o latigazo, para finalmente ser depositadas en el colector giratorio. Fuente: Sill, T. J., & von Recum, H. A. (2008). Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29(13), 1989–2006. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.011>.

Las nanofibras electrohiladas se han propuesto y estudiado como posibles andamios para la ingeniería de tejidos debido a que presentan la posibilidad de mimetizar la estructura y funciones de la MEC; asimismo, se les puede adicionar compuestos que potencialicen su función (Xue et al., 2017). De igual modo, la topografía (cruzadas, lineales aleatorias o lineales uniaxiales) de las nanofibras tienen un impacto en la migración y proliferación de células implicadas en la regeneración tisular (Xue et al., 2019).

Existe una amplia gama de materiales que se emplean en la fabricación de nanofibras, como lo son polímeros biodegradables y biocompatibles; es decir, los productos de degradación no provocan respuestas inmunológicas y son eliminados fácilmente. El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero sintético hidrofílico, biocompatible y biodegradable, ampliamente utilizado en diferentes áreas del campo biomédico (Jiang et al., 2011), actualmente se utiliza en la ingeniería de tejidos especialmente, como materia prima de andamios implicados en la regeneración de tejidos y órganos. Así también, existe el ácido poliláctico (PLA) es un poliéster alifático, hidrófobo, utilizado ampliamente en el área biomédica, ejemplos: hilos de sutura, tornillos para fijación ósea, dispositivos para administrar medicamentos ya que presenta propiedades termo mecánicas (Bayer, 2017). Además, se pueden mezclar con otros polímeros sin afectar sus propiedades (Casalini et al., 2019). Estos polímeros en particular, poseen una gran flexibilidad de diseño porque su constitución y distribución se pueden adecuar para satisfacer necesidades específicas (Singhvi et al., 2019).

3.1.8 *Calendula officinalis* L.

La *Calendula officinalis* L., conocida en México comúnmente como caléndula, copetuda o maravilla, y en países de habla inglesa es conocida como marigold (Acosta De La Luz et al., 2001); es originaria de Egipto (Lastra Valdés & Piquet García, 1999) y ha sido ampliamente adoptada y cultivada en Europa desde el siglo XII, y actualmente en más de 10 países incluido México, se utiliza para la

elaboración de productos para el cuidado personal, así como planta ornamental (Acosta De La Luz et al., 2001; Carvalho et al., 2018; Russo et al., 2015).

Su nombre científico proviene del latín “calendae” que significa mañana o principio, referente a la presencia de inflorescencias los primeros días de cada mes (Acosta De La Luz et al., 2001); *officinalis* o con oficio es un epíteto latino medieval que indica especies principalmente plantas con usos en la medicina tradicional y la herbolaria. Los romanos; sin embargo, la llamaban Solsequium, que quiere decir “que sigue al sol” acción que realizan las flores de la *Calendula officinalis* L. al igual que los girasoles (Burgos Guerrer & Riascos Cabrera, 2013).

3.1.9 Clasificación taxonómica.

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Asteridae
Orden: Asterales
Familia: Asteraceae
Subfamilia: Asteroideae
Tribu: Calenduleae
Género: *Calendula*
Especie: *C. officinalis* L. 1753

(Acosta De La Luz et al., 2001).

3.1.10 Descripción botánica y requerimientos.

Es una planta herbácea, melífera, aromática, anual, llega a medir entre 30 y 60 cm de altura (Acosta De La Luz et al., 2001; Lastra Valdés & Piquet García, 1999). En las primeras etapas de crecimiento, presenta una roseta basal de hojas, posteriormente se forman tallos y la mayoría están ramificados desde la base. Las hojas son espatuladas, llegando a medir hasta 13 cm de largo; en los extremos superiores de los tallos se encuentran los capítulos florales con diámetro entre 3 y 6 cm compuestos de pétalos ligulados. El involucre formado por las brácteas, es de una tonalidad gris-verdoso en forma de platillo de 1,5 a 3 cm de diámetro, el

receptáculo que es la porción donde se insertan las estructuras de la flor puede ser desnudo, plano o ligeramente prominente (Acosta De La Luz et al., 2001; Lastra Valdés & Piquet García, 1999).

Las inflorescencias son radiadas es decir que en el centro del capítulo floral se disponen pétalos tubulosos (masculinas) y en la periferia se encuentran pétalos ligulados (femeninas) ambas son de una tonalidad amarillo-anaranjado, el fruto es un aquenio con una sola semilla curvado y espinoso. Entre las características organolépticas presenta olor débil, sabor amargo y aromático (Lastra Valdés & Piquet García, 1999; Muñoz-Centeno, 2004). La caléndula prefiere clima templado, resiste a heladas y sequias, y tiene altos requerimientos de luz (Acosta De La Luz et al., 2001).

3.1.11 Compuestos fitoquímicos y propiedades de *Calendula officinalis* L.

Los análisis espectroscópicos por cromatografía líquida de alta eficacia (en inglés high performance liquid chromatography o HPLC) y por cromatografía en capa fina (en inglés thin layer chromatography o TLC) han permitido la identificación de gran cantidad de compuestos dentro de los cuales destacan: flavonoides, triterpenos, ácidos fenólicos y carotenoides (Ercetin et al., 2012; Kishimoto et al., 2005; B. Muley et al., 2009).

Las flores de *C. officinalis* L. presentan una gran variedad de compuestos químicos que le confieren propiedades farmacológicas como: cicatrizante, antioxidante, antiinflamatorio, antibacteriano, emenagoga, espasmolítico, sedativa, bactericida, antifúngica y colagoga (Lastra Valdés & Piquet García, 1999). La composición química de las flores demuestra que contiene aceites esenciales, glucósidos triterpénicos como la calendulina, ácido salicílico, fitoesteros, alcaloides, glucósidos, quinonas, saponinas, cumarinas, esteroides, terpenos, lípidos, carbohidratos, taninos, lactonas, carotenoides dentro de estos la xantofila, flavonoides como la quercetina y ácidos fenólicos, éstos tres últimos son los más investigados por sus propiedades farmacológicas que presentan (Ercetin et al., 2012; Lastra Valdés & Piquet García, 1999; B. Muley et al., 2009; Patrick et al., 1996).

Como otros miembros de la familia Asteraceae, esta especie contiene abundantes flavonoides presentes en las flores, con propiedades antioxidantes (Butnariu & Coradini, 2012; Russo et al., 2015). Lastras Valdés y Piquet (1999) indican que el rendimiento del contenido de éstos oscila en valores de 0.3% al 0.8%; y con un contenido de 0.4% totales. Preethi y colaboradores en 2006 encontraron un efecto significativo como antioxidante en estudios *in vivo* e *in vitro* con extractos de flor de esta misma planta (Preethi et al., 2006).

En lo que respecta a los carotenoides se presenta un contenido de 0.078% y 0.017% de carotenoides totales en las flores liguladas y en los receptáculos respectivamente (Lastra Valdés & Piquet García, 1999), la actividad antiinflamatoria se relaciona al efecto de los carotenoides y triterpenos (Agudelo Londoño, 2011; Patrick et al., 1996). Un estudio en 2006 permitió aislar glucósidos de triterpenos y glucósidos de flavonol y evaluar su capacidad antiinflamatoria encontrando efectos significativos con la mayoría de los compuestos (Ukiya et al., 2006).

Otros componentes identificados son el faradiol y el monoéster de faradiol, ejerciendo un efecto dosis dependiente, comparable al de la indometacina un antiinflamatorio no esteroideo (Loggia et al., 1994).

También se ha atribuido una acción antibacteriana a los glucósidos triterpénicos de la caléndula (Patrick et al., 1996). Extractos empleando etanol al 80% mostraron actividad antibacteriana especialmente contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus fecalis* (Lastra Valdés & Piquet García, 1999). Efstratiou y colaboradores evaluaron dos extractos de *C. officinalis* L. (metanólico y etanólico), mostrando que el extracto metanólico presenta una mejor actividad antibacteriana contra la mayoría de las cepas en comparación con la ciprofloxacina; por otro lado ambos extractos presentaron una excelente acción antifúngica contra diversas cepas de hongos analizados, en comparación con el fluconazol (Efstratiou et al., 2012).

La presencia de todos estos compuestos fitoquímicos se relaciona con las propiedades farmacológicas que se le atribuyen: cicatrizante, antiinflamatorio, antibacteriana, antioxidante, emenagoga, espasmolítico, sedativa, bactericida,

antifúngica y colagoga (Acosta De La Luz et al., 2001; Lastra Valdés & Piquet García, 1999; B. Muley et al., 2009). La medicina tradicional utiliza diferentes presentaciones (infusiones, tinturas, ungüento) de las flores para diversas afecciones entre las que podemos mencionar: heridas, gastritis, úlceras gástricas, amenorrea, migrañas, enfermedades gastrointestinales, afecciones del sistema urinario, cólicos menstruales, leucorrea y acné (Acosta De La Luz et al., 2001; Basch et al., 2006; Lastra Valdés & Piquet García, 1999; Muñoz-Centeno, 2004). Hasta el día de hoy la utilización de las flores de *C. officinalis* L. en el tratamiento de afecciones de la piel y sus diversas propiedades farmacológicas están avaladas en monografías publicadas por la EMA (Europe Medicines Agency), la ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy) y la WHO (World Health Organization) (ESCOP, 2019; European Medicines Agency, 2018; World Health Organization, 2010). La ESCOP (European Scientific Cooperative On Phytotherapy) no se opone para su uso tópico durante el embarazo y en el periodo de lactancia (Muñoz-Centeno, 2004). Todo lo anterior hace a esta planta una materia prima natural de interés para la industria farmacéutica.

3.2 Antecedentes específicos.

3.2.1 Estudios con *Calendula officinalis* L. en la regeneración cutánea.

El uso de la *Calendula officinalis* L. para optimizar el proceso de cicatrización está respaldado por diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* a lo largo de los años. En 1996 Patrick y colaboradores demostraron que la aplicación de una infusión acuosa fría liofilizada al 10% (p/v) de flor de *C. officinalis* L. en membranas corioalantoideas (CAM) de huevos de gallina arrojó una cuantificación de microvasos en secciones de tejido de CAM estadísticamente mayor en comparación con los controles ($p < 0,001$), además las CAM tratadas con la infusión liofilizada fueron positivas para ácido hialurónico (HA) un glucosaminoglicano altamente asociado en el proceso de angiogénesis y estructura de la MEC (Patrick et al., 1996). En años posteriores se evaluó la actividad angiogénica de un extracto etanólico al 1%, además de las fracciones extraídas con diclorometano al 1% y hexano al 1%, en heridas de ratas y en modelos de CAM, dicha actividad se vio reflejada en un aumento del área

vascular en las CAM e incremento en el número de vasos sanguíneos en la dermis del biomodelo. Conjuntamente, se concluyó que las propiedades antiinflamatorias y antibacterianas de los extractos actúan de forma positiva sobre las fases inflamatoria y proliferativa del proceso de cicatrización de las heridas cutáneas (Parente et al., 2011, 2012).

A nivel celular la evaluación de otros extractos a base de etanol y hexano de flores de *C. officinalis* L. arrojaron diferencias significativas en el aumento de la migración y proliferación de fibroblastos de ratón albino suizo 3T3 en comparación con los controles (Fronza et al., 2009). La evaluación de una tintura comercial con alcohol etílico al 41% de flores de dicha planta fue capaz de aumentar la proliferación y la migración de fibroblastos en una ruta dependiente de PI3K, con activación de la proteína tirosina quinasa PTK2 2, siendo los glucósidos de flavonol los principales compuestos detectados en este extracto (Dinda et al., 2015).

En otra investigación de Dinda y col., emplearon un extracto hidro-etanólico al 12% (p/v) de flor de *C. officinalis* L. y fracciones en hexano, acetato de etilo y agua en ratones BalbC y en cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos (HDF), los resultados arrojaron que el extracto hidro-etanólico y la fracción acuosa estimularon significativamente la proliferación así como la migración de células HDF, también identificaron que los principales componentes en el extracto hidro-etanólico y la fracción acuosa fueron rutina y quercetina-3-O-glucósido (Dinda et al., 2016).

Nicolaus y colaboradores en 2017 también proporcionaron información sobre estudios *in vitro* y los mecanismos implicados en la acción curativa de tres extractos liofilizados denominados extracto n-hexánico (55.7 g), extracto etanólico (42.1 g), y extracto acuoso (50,5 g) obtenidos de un extracto inicial al 8.65% (p/v) de flor de *C. officinalis* L.; los autores encontraron que los extractos n-hexánico y etanólico influyeron significativamente en la fase inflamatoria mediante la activación del factor de transcripción NF- κ B e incrementando los niveles de IL-8, tanto a nivel transcripcional como proteico, en queratinocitos humanos inmortalizados (Nicolaus et al., 2017).

Por otro parte, el análisis de un extracto etanólico 1:1 de las flores de *C. officinalis* L. mejoraron significativamente la proliferación de fibroblastos gingivales humanos (Madrid et al., 2010). Referente a ensayos clínicos se encontró que el uso tópico de una pomada comercial francesa (Pommade au Calendula par Digestion) de flores de *Calendula officinalis* L. al 20% (p/p) fue un coadyuvante eficaz en el tratamiento de la dermatitis ocasionada como efecto secundario de la irradiación en pacientes con cáncer de mama (Pommier et al., 2004).

3.2.2 Nanofibras y *Calendula officinalis* L. en la regeneración cutánea.

El método de electrohilado permite la fabricación de materiales novedosos como apósitos para heridas debido a la gran superficie y porosidad de las mallas electrohiladas y la posibilidad de incluir ingredientes bioactivos. La elaboración de nanofibras mediante electrohilado, puede realizarse a partir de materiales compuestos, especialmente aquellos con aplicaciones terapéuticas, los materiales compuestos cuentan con la ventaja de potenciar las propiedades individuales de cada material, y que así trabajen en sinergia. Los andamios por sus características físicas pueden aportar grandes beneficios en la regeneración cutánea ya que mimetizan la MEC, aportando una base que facilita la proliferación celular; y si como complemento se le incorporan compuestos naturales que presenten propiedades terapéuticas, por ejemplo antimicrobiana, antiinflamatorio, antioxidantes entre otras, esta dupla da como resultado una opción alternativa de apósito compuesto, encaminado a la optimización del proceso de cicatrización (Rubio-Elizalde et al., 2019), lo anterior se esquematiza en la Figura 5.

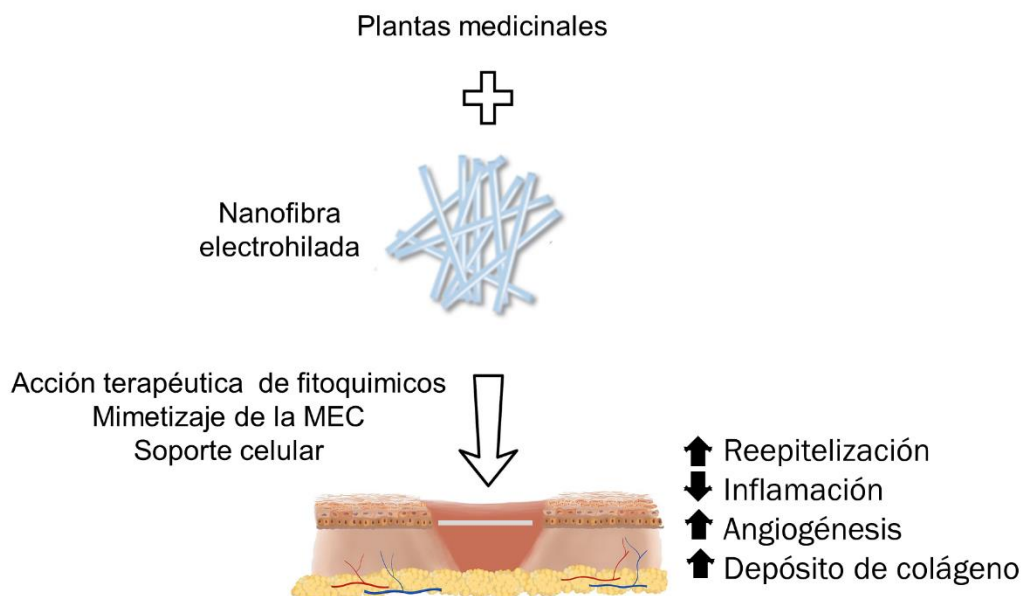


Figura 5. Acciones de las nanofibras en sinergia con compuestos fitoquímicos de plantas.

La fusión de las propiedades de las plantas medicinales y las nanofibras electrohiladas, son una alternativa en el tratamiento de las heridas, aportando una acción terapéutica por parte de los fitoquímicos presentes en las plantas. Por otro lado, las nanofibras son ampliamente propuestas para mimetizar la MEC y ser el soporte para una correcta adhesión, migración y proliferación celular. Siendo esta dupla una alternativa que aporte una optimización del proceso de cicatrización a diferentes niveles. Modificado de: Yang, H. ya, Fierro, F., So, M., Yoon, D. J., Nguyen, A. V., Gallegos, A., Bagood, M. D., Rojo-Castro, T., Alex, A., Stewart, H., Chigbrow, M., Dasu, M. R., Peavy, T. R., Soulika, A. M., Nolte, J. A., & Isseroff, R. R. (2020). Combination product of dermal matrix, human mesenchymal stem cells, and timolol promotes diabetic wound healing in mice. *Stem Cells Translational Medicine*, 9(11), 1353–1364. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0380>.

Hasta el día de hoy, los estudios que combinan los andamios con extractos de la *Calendula officinalis* L. han reportado que mejora el proceso de cicatrización. Un estudio enfocado en la elaboración y evaluación de un andamio de policaprolactona (PCL) y extracto etanólico al 16% p/v de flor de *C. officinalis* L. en la línea celular de fibroblasto de ratón (L929) mostró una elevada viabilidad, mejorando la adhesión, proliferación y crecimiento celular (Hosseinkazemi et al., 2015). En otro estudio incorporaron el extracto comercial (Golghatrehtos Co, Iran) de flor de *C. officinalis* L. al 2% (v/v) en andamios compuestos por PCL al 20% (p/v), Zein (proteína de prolamina que se encuentra en el maíz) al 15% (p/v) y goma arábiga al 6% (p/v)

(polisacárido de origen natural); evaluaron sus propiedades antibacterianas mostrando que el andamio PCL / Zein / GA adicionado con *C. officinalis* L. presenta una actividad antimicrobiana contra bacterias como *E. coli* y *S. aureus*; así también, respecto a las pruebas de cultivo celular (células L929) indicaron que los andamios con el extracto de *C. officinalis* L. favorecieron significativamente la adhesión, proliferación y crecimiento de los fibroblastos (Pedram Rad et al., 2019) ambos estudios plantean materiales compuestos óptimos para la regeneración tisular, y abren el área de investigación para nuevas propuestas.

4 Planteamiento del Problema.

Las heridas sin importar su origen repercuten negativamente en el bienestar físico, social, emocional y también económico de las personas que las presentan.

Uno de los aspectos importantes es la morbilidad por lesiones, ésta se refleja indirectamente por días de incapacidad debido a la lesión presentada; en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de la edición del 2018 se menciona que los accidentes son la causa primordial de discapacidad, alrededor de 6.9 millones de personas sufrieron una lesión accidental no fatal lo que repercute en la generación de altos gastos para el sistema de salud y para las familias. Asimismo, se describe que el costo económico mensual que produce discapacidad debido a los accidentes de tránsito en México equivale entre 1.8 y 3.5% de PIB (Producto Interno Bruto), un estimado de 13,639,000.00 MXN (INEGI, 2018). Complementando, Vela y colaboradores, mencionan que un 66.2% de las lesiones afectan a las extremidades inferiores lo que inhabilita la capacidad motriz de las personas y su desarrollo laboral y personal (Vela et al., 2018).

Por otro lado, las heridas agudas y crónicas son un importante problema de salud pública a nivel mundial para cualquier persona sin distinción, sin olvidar que los costos de gastos generados por el sector salud son elevados, en cuanto a costos las heridas traumáticas en México representan un gasto mensual alrededor de \$17,520,599.65 MXN y \$389,975,080.76 MXN, seguido de úlceras de pie diabético con gastos de \$11,029,189.80 y \$398,388,469.99 MXN y en tercer lugar se encuentran las lesiones ocasionadas por presión con \$2,647,210.96 MXN y \$715,416,914.19 MXN en atención ambulatoria e hospitalaria respectivamente (Vela et al., 2018).

El tiempo de curación está influenciado por factores propios del organismo y externos como: prevención de infecciones, higiene, alimentación y tratamiento adecuado y oportuno. Tomando en consideración estos aspectos, la búsqueda de nuevas alternativas con respaldo científico en el manejo y tratamiento óptimo de heridas se ha inclinado por la búsqueda de un apósito ideal para heridas; es decir, que esté disponible, sea práctico, de bajo costo, producir una mínima incomodidad para el usuario y favorecer la cicatrización de heridas. Pocos apósitos satisfacen

todos estos criterios y/o suelen presentar costos elevados siendo inaccesibles para ciertos estatus socioeconómicos, a pesar de esto, el uso de los conocimientos aportados por la ingeniería tisular como son los biopolímeros y la fabricación de andamios dirigidos a la regeneración tisular ha permitido la creación de un área de investigación basada en el uso de las propiedades cicatrizantes de las plantas en sinergia con biomateriales existentes en el ámbito de la ingeniería tisular.

Con base en la problemática anterior se plantea en este trabajo la siguiente pregunta de investigación: ¿Qué efecto tendrá el extracto de *C. officinalis* L. en sinergia con membranas poliméricas (PVA/PLA) en la progresión del proceso de cicatrización de heridas posquirúrgicas en ratas de la cepa Wistar?

5 Objetivos.

5.1 Objetivo General.

Evaluar y determinar el efecto del extracto de *Calendula officinalis* L. en sinergia con membranas poliméricas PVA/PLA en el tratamiento de heridas posquirúrgicas en ratas de la cepa Wistar.

5.2 Objetivos Particulares.

1. Obtener y analizar el extracto de *Calendula officinalis* L.
2. Elaborar y caracterizar la membrana de PVA/PLA obtenida por técnica de electrohilado.
3. Analizar el progreso de cicatrización *in vivo* en presencia de la membrana polimérica PVA/PLA con y sin extracto de *Calendula officinalis* L. en ratas sanas de la cepa Wistar.
4. Analizar histomorfologicamente el progreso de la cicatrización utilizando membrana polimérica PVA/PLA con y sin extracto de *Calendula officinalis* L. de ratas sanas de la cepa Wistar.
5. Evaluar mediante el ensayo de cicatrización de heridas *in vitro* el efecto de la membrana polimérica PVA/PLA con y sin extracto de *Calendula officinalis* L. sobre fibroblastos de piel humana.

6 Materiales y Métodos.

6.1 Recolección, identificación taxonómica y preparación del material vegetal.

La recolección de la planta *Calendula officinalis* L. fue realizada en el mes de enero y febrero del 2019, en el poblado de Tetela del Monte en el estado de Morelos, México; el cual se localiza en las coordenadas de 8°57'49"N 99°15'34"O, se obtuvieron ejemplares de la planta en maceta (Figura 6).

Posteriormente tres ejemplares completos (raíz, tallo, hojas, flores) se prepararon en una prensa botánica y se transportaron al departamento de identificación taxonómica del Jardín Botánico Universitario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, en donde el curador M. Phill Allen J. Coombes identificó taxonómicamente el material vegetal como *Calendula officinalis* L. perteneciente a la familia Asteraceae con ID 79017 (Anexo 1).

Una vez realizada la identificación taxonómica, se prosiguió a separar los pétalos cuidadosamente y lavarlos con agua corriente, una vez lavados se dejaron secar a temperatura ambiente por 3 semanas, evitando humedad y el contacto directo con rayos solares para no modificar los compuestos presentes. Una vez secos los pétalos, se pulverizaron con ayuda de mortero, además del tamizado y finalmente se preservó en un lugar fresco y cubierto de la luz (Figura 7).



Figura 6. Ejemplares de la planta *Calendula officinalis* L.



Figura 7. Procesamiento de los pétalos de *Calendula officinalis* L.

A) Posterior al lavado de los pétalos de *C. officinalis* L. se secó a sombra y protegido de la luz. B) Pulverización con ayuda de mortero. C) Tamizaje con manta. D) Preservación del pulverizado de flores de *Calendula officinalis* L.

6.2 Elaboración de extractos de *Calendula officinalis* L.

6.2.1 Extracción Asistida por Microondas (MAE).

Se prepararon dos tubos de ensaye G30 (especiales para este tipo de extracción) con 0.2 g de polvo flor de *C. officinalis* L. y se les adicionaron 5 mL de agua desionizada estéril o etanol al 96% respectivamente (Figura 8); posteriormente se tapó cada tubo; se verificó que el medidor de aire estuviera conectado al equipo, y permaneciera en un rango de 5.6 y 6. Los tubos preparados se colocaron individualmente en la cámara de extracción (Figura 9) y se programó el equipo con las siguientes especificaciones:

Temperatura: 190° C (agua desionizada estéril) y 170°C (etanol)

Agitación: 600 rpm

Tiempo: 3 minutos

Poder: 850 w

Bares: 11- 13 bar (importante no sobrepasar los 20 bares).



Figura 8. Extracción asistida por microondas de flor de *C. officinalis* L.

Tubo de ensaye con solvente y pulverizado de flores de *Calendula officinalis* L. previo a la extracción mediante MAE.

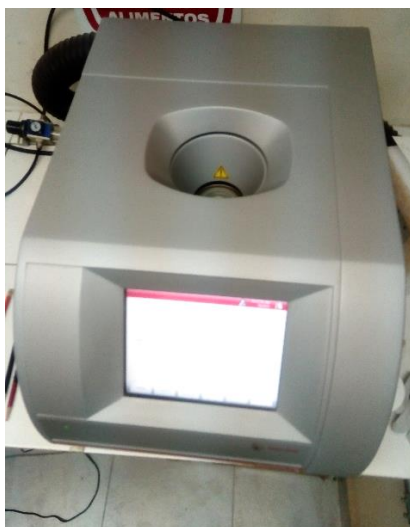


Figura 9. Equipo para la Extracción Asistida por Microondas (MAE).

Una vez programado el equipo se inició y esperó a que finalizaran cada una de las extracciones; posteriormente se retiraron los viales G30 para filtrar cada uno de los extractos obtenidos. Para el caso del extracto con el solvente etanólico, una vez realizado la extracción y filtrado; se evaporó mediante rotación el solvente (Figura 10), enseguida el extracto se reconstituyó con agua desionizada estéril.

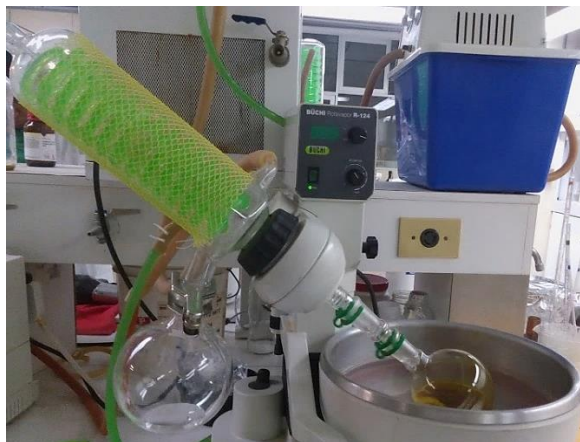


Figura 10. Evaporación de solvente etanólico.

6.2.2 Extracción con equipo Soxhlet.

EL equipo Soxhlet está compuesto por: refrigerante, sifón y matraz bola; el disolvente contenido en el matraz alcanza su punto de ebullición por efecto de la fuente de calor, sube en forma de vapor por el cuello de éste, recorre el sifón y llega al refrigerante. En éste, se condensa y regresa al sifón en forma líquida. La condensación es gradual, podemos observarla en la formación de gotas que caen del refrigerante al sifón. Así, gota a gota, el disolvente se acumula justo donde está el cartucho de papel filtro, éste es el momento en que entra en contacto con la muestra. El sifón acumula el disolvente con los compuestos extraídos hasta que alcanza el nivel suficiente para regresar al matraz. El disolvente se recircula por el equipo repetidamente, extrayendo en cada recorrido una fracción de principios activos. Conforme se repite este ciclo, podemos ver que el disolvente cambia de color, lo que manifiesta la extracción de compuestos (A. Guntero et al., 2017).

Previamente se elaboraron dos cartuchos de papel filtro con 4 g de polvo flor de *C. officinalis* dentro, mismos que se colocaron dentro del sifón. Por otro lado, se prepararon dos matraces bola de 150 ml con cuello esmerilado y se vertieron 100 ml del solvente (agua desionizada o etanol al 96%) a utilizar, cada uno de los matraces se colocaron en calentador con agitación constante a una temperatura de 100°C para el agua y 78° C para el etanol. Por último, se embonó en la parte superior de cada matraz el sifón junto con el refrigerante. Una vez que ambas estructuras

estaban perfectamente montadas (Figura 11) y con la temperatura seleccionada se mantuvieron encendidos durante 3 o 4 horas (hasta obtener 3 ciclos de extracción). Una vez finalizado el tiempo se apagaron y se esperó a que los extractos obtenidos se enfriaran para ser manipulados y desmontados del equipo. Para el caso del extracto etanólico se procedió a destilar el solvente con ayuda de un rotavapor a 78°C, y enseguida se resuspendió el extracto en agua desionizada estéril con el mismo volumen inicial (100ml) (Figura 10).



Figura 11. Extracción con equipo Soxhlet.

6.2.3 Extracción por método convencional.

Inicialmente se pesó .8g de flor de *C. officinalis* L. para una concentración final de 4% (p/v). paralelamente en un frasco de vidrio con tapa se colocó 20 ml de agua desionizada estéril a 95°C con agitación constante, una vez a punto de ebullición, se disminuyó la temperatura y se agregó los .8 g de flor de *C. officinalis* L., se mantuvo por 5 minutos con agitación constante (Figura 12). Una vez pasado el tiempo, recuperamos la mezcla en tubos para centrifuga. A continuación, se colocaron los tubos en la centrifugadora por 15 minutos a 2500 rpm (se repitió este paso tantas veces fuera posible eliminar residuos del material vegetal). Finalmente, en campana de flujo laminar estéril y una vez centrifugados los tubos se recuperó el sobrenadante en otro recipiente.

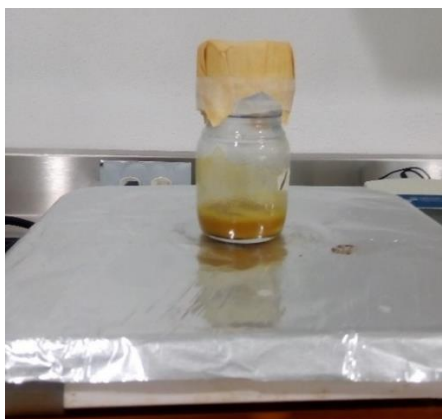


Figura 12. Proceso de extracción por método convencional.

Una vez obtenidos todos los extractos tanto etanólicos como acuosos a través de las tres técnicas como se enlista en la Tabla 2, se filtraron con ayuda de filtros estériles para jeringa de 0.22 μm (Figura 13) y se almacenaron protegidos de la luz en tubos para centrifugadora estériles a 4°C hasta su uso en análisis posteriores.



Figura 13. Filtración de extractos.

Tabla 2. Extractos acuosos y etanólicos de *Calendula officinalis* L.

Extractos obtenidos	Siglas
1. Extracto acuoso por método convencional.	EAMC
2. Extracto etanólico con equipo Soxhlet.	EEMS
3. Extracto acuoso con equipo Soxhlet.	EAMS
4. Extracto etanólico asistido por microondas.	EEAM
5. Extracto acuoso asistido por microondas.	EAAM

6.3 Cuantificación de compuestos fenólicos totales (CFT).

Inicialmente se preparó una solución estándar de ácido gálico (0.05 g/mL) de la cual se agregó en cada pocillo (A2-A12 y B2-B12) volúmenes de 0,1,2,3,4,5,10,15,20,25 a 30 μ L de la solución estándar y se completó con agua desionizada a un volumen final de 100 μ L (Figura 14).

De los extractos de *Calendula officinalis* L. se hicieron diluciones 1:10 en agua desionizada estéril y a partir de estas diluciones se colocaron (C2-C6 y D2-D6) 50 μ L de cada extracto en los pozos siguientes de distintas columnas para después completar un volumen final de 200 μ L con reactivo Folin-Ciocalteu 1N. Enseguida se adicionó en los pocillos (A1 y A2) 100 μ L de Na₂CO₃ al 20%, finalmente se agregó 100 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu 1N a todos los pocillos y se dejó reposar por 2 horas en oscuridad a una temperatura de 37°C. La absorbancia fue medida a 760 nm con ayuda de fotómetro para microplacas (Figura 16) (Singleton et al., 1999).

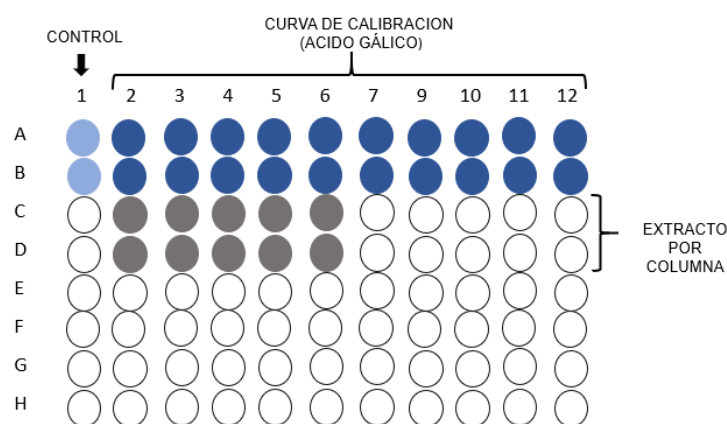


Figura 14. Esquemmatización del experimento CFT.



Figura 15. Lectura de absorbancias en fotómetro para microplacas a 760 nm.

6.4 Cuantificación de capacidad antioxidante (CA).

Previamente se realizó una planeación de la organización en la placa de 96 pozos de las muestras y reactivos a utilizar. Inicialmente se agregaron a la microplaca los siguientes reactivos: 100 µl de MeOH en casi todos los pocillos excepto la primera fila de pocillos en donde se agregaron 200 µl de cada extracto como lo indica la Figura 16.

	1 Control	2 Sample 1 Blank	3 Sample 1 + DPPH	4 Sample 2 Blank	5 Sample 2 + DPPH	6 Sample 3 Blank	7 Sample 3 + DPPH	8 Sample 4 Blank	9 Sample 4 + DPPH	10 Sample 5 Blank	11 Sample 5 + DPPH	12 Cal line
A	MeOH 100µL	Sample 1 200µL	Sample 1 200µL	Sample 1 200µL	Sample 1 200µL	Sample 1 200µL	Sample 1 200µL	Sample 1 200µL	Sample 1 200µL	Sample 1 200µL	Sample 1 200µL	MeOH 100µL
B	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL
C	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL
D	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL
E	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL
F	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL
G	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL
H	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL	MeOH 100µL

Figura 16. Distribución de muestras y reactivos para CA.

Fuente: Prieto, J. M. (2012). Procedure: Preparation of DPPH Radical, and antioxidant scavenging assay.

Usando una pipeta multicanal, se tomarán 100 µL de la primera fila de las columnas 2 a 12 y se transfirieron a los pocillos correspondientes de la segunda fila, mezclando el contenido con la micropipeta y después de esto se trasladaron 100 µL a la tercera fila, este proceso se repitió hasta el último pozo, descartando los últimos 100 µL. Por último, se agregó 100 µL de la solución DPPH 0.1 mM a cada pocillo de la placa (Figura 17).

	1 Control	2 Sample 1 Blank	3 Sample 1 + DPPH	4 Sample 2 Blank	5 Sample 2 + DPPH	6 Sample 3 Blank	7 Sample 3 + DPPH	8 Sample 4 Blank	9 Sample 4 + DPPH	10 Sample 5 Blank	11 Sample 5 + DPPH	12 Cal line
A	DPPH 0.1 mM	Sample 1 200 µg/mL	Sample 1 200 µg/mL	Sample 2 200 µg/mL	Sample 2 200 µg/mL	Sample 3 200 µg/mL	Sample 3 200 µg/mL	Sample 4 200 µg/mL	Sample 4 200 µg/mL	Sample 5 200 µg/mL	Sample 5 200 µg/mL	DPPH 100 µM
B	DPPH 0.1 mM	Sample 1 100 µg/mL	Sample 1 100 µg/mL	Sample 2 100 µg/mL	Sample 2 100 µg/mL	Sample 3 100 µg/mL	Sample 3 100 µg/mL	Sample 4 100 µg/mL	Sample 4 100 µg/mL	Sample 5 100 µg/mL	Sample 5 100 µg/mL	DPPH 50 µM
C	DPPH 0.1 mM	Sample 1 50 µg/mL	Sample 1 50 µg/mL	Sample 2 50 µg/mL	Sample 2 50 µg/mL	Sample 3 50 µg/mL	Sample 3 50 µg/mL	Sample 4 50 µg/mL	Sample 4 50 µg/mL	Sample 5 50 µg/mL	Sample 5 50 µg/mL	DPPH 25 µM
D	DPPH 0.1 mM	Sample 1 25µg/mL	Sample 1 25µg/mL	Sample 2 25µg/mL	Sample 2 25µg/mL	Sample 3 25µg/mL	Sample 3 25µg/mL	Sample 4 25µg/mL	Sample 4 25µg/mL	Sample 5 25µg/mL	Sample 5 25µg/mL	DPPH 12.5 µM
E	DPPH 0.1 mM	Sample 1 12.5 µg/mL	Sample 1 12.5 µg/mL	Sample 2 12.5 µg/mL	Sample 2 12.5 µg/mL	Sample 3 12.5 µg/mL	Sample 3 12.5 µg/mL	Sample 4 12.5 µg/mL	Sample 4 12.5 µg/mL	Sample 5 12.5 µg/mL	Sample 5 12.5 µg/mL	DPPH 6.25 µM
F	DPPH 0.1 mM	Sample 1 6.25 µg/mL	Sample 1 6.25 µg/mL	Sample 2 6.25 µg/mL	Sample 2 6.25 µg/mL	Sample 3 6.25 µg/mL	Sample 3 6.25 µg/mL	Sample 4 6.25 µg/mL	Sample 4 6.25 µg/mL	Sample 5 6.25 µg/mL	Sample 5 6.25 µg/mL	DPPH 3.125 µM
G	DPPH 0.1 mM	Sample 1 3.125 µg/mL	Sample 1 3.125 µg/mL	Sample 2 3.125 µg/mL	Sample 2 3.125 µg/mL	Sample 3 3.125 µg/mL	Sample 3 3.125 µg/mL	Sample 4 3.125 µg/mL	Sample 4 3.125 µg/mL	Sample 5 3.125 µg/mL	Sample 5 3.125 µg/mL	DPPH 1.075 µM
H	DPPH 0.1 mM	Sample 1 1.075 µg/mL	Sample 1 1.075 µg/mL	Sample 2 1.075 µg/mL	Sample 2 1.075 µg/mL	Sample 3 1.075 µg/mL	Sample 3 1.075 µg/mL	Sample 4 1.075 µg/mL	Sample 4 1.075 µg/mL	Sample 5 1.075 µg/mL	Sample 5 1.075 µg/mL	DPPH 100 µM

Figura 17. Distribución final de muestras y reactivos de CA.

Se protegió la placa de la luz y se guardó en una zona a temperatura ambiente durante 30 minutos. Pasado el tiempo, se cuantificó la absorbancia a 515 nm en un lector de microplacas (Figura 18). Para cada muestra, los ensayos se realizan por triplicado.

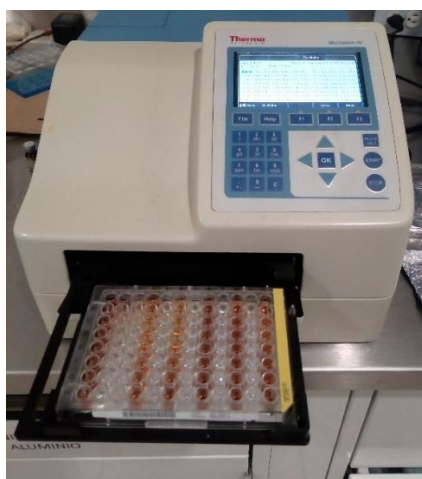


Figura 18. Lectura de absorbancias en fotómetro para microplacas a 515nm.

6.5 Elaboración y caracterización de las membranas electrohiladas de PVA/PLA.

Se pesó cada uno de los polímeros a utilizar con base en la formula despejada indicada en la Figura 19, con un porcentaje (p/v) para PVA de 24% y para PLA de 8%.

Ecuación 1

$$\% \frac{p}{v} = \frac{\text{g de soluto}}{\text{ml de la solución}} \times 100$$

Despejamos gramos de soluto.

$$\text{g de PLA} = \frac{\% \text{ p/v} \times 100 \text{ ml}}{100}$$

Sustituimos valores

$$\text{g de PLA} = \frac{8 \text{ g/mL} \times 100 \text{ ml}}{100} = 8 \text{ g}$$

$$\text{g de PLA} = \frac{24 \text{ g/mL} \times 100 \text{ ml}}{100} = 24 \text{ g}$$

Figura 19. Fórmulas concentración peso/volumen de soluciones poliméricas.

Los polímeros PLA y PVA previamente pesados (8g y 24g) se disolvieron en 100 ml de cloroformo al 99.8% y 100 ml de etanol al 96% respectivamente a una temperatura de 60°-70°C con agitación magnética hasta que se mezclaron homogéneamente (Figura 20).



Figura 20. Soluciones poliméricas de PVA y PLA.

Una vez obtenida cada una de las soluciones, éstas se colocaron en el inyector del equipo de electrohilado (Figura 21), al fluido se aplicó una corriente entre 23 y 25 Kv durante un tiempo de 30 a 40 minutos por membrana.



Figura 21. Equipo de electrohilado.

Los filamentos formados se recolectaron directamente en el papel encerado ubicado en el colector giratorio del equipo, una vez terminado el tiempo estimado, la membrana se retiró del colector y se guardó para su respectivo análisis y caracterización.

La caracterización de las membranas realizadas se llevó acabo con Microscopia Electrónica de Barrido (por sus siglas en ingles SEM) (Figura 22) por los especialistas del Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología (CUVyTT) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.



Figura 22. Equipo de Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).

6.5.1 Prueba de adherencia plaquetaria.

Se obtuvo sangre venosa de un paciente sano libre de medicamentos, misma que se procesó para obtener plasma rico en plaquetas (PRP). Inicialmente se pretendía evaluar la membrana de PVA/PLA, pero al momento de ponerla en contacto con el PRP por la propiedad hidrofílica del PVA fue imposible, ya que, ésta se disolvió; por lo que se optó en evaluar fragmentos de ambos polímeros y una membrana de solo PLA, estas muestras se colocaron junto con .5 mL de PRP dentro de microtubos claros (Figura 23) y se incubó a 37°C con 5% de CO₂ durante 48 h; posteriormente, se procedió a lavar las muestras con una solución de NaCl al 0,9% v/v para eliminar las plaquetas débilmente adheridas (Gomez et al., 2015); se trasladaron las muestras al laboratorio del Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología (CUVyTT) en ciudad universitaria BUAP, donde se analizó las muestras por SEM con un previo baño de oro a través del sistema de Sputtering (Figura 24) con el fin de examinar la adherencia de las plaquetas en la superficie de los materiales evaluados, este análisis se realizó por el técnico encargado del manejo del equipo.

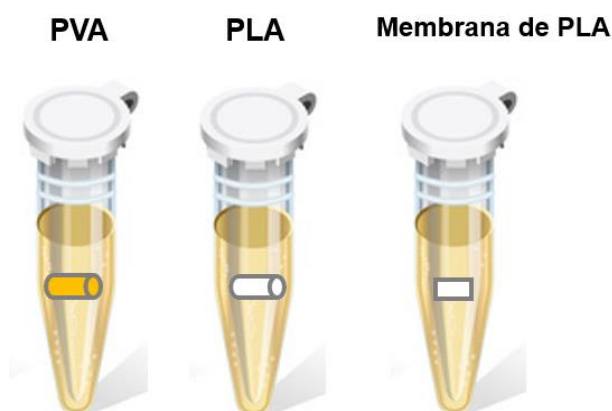


Figura 23. Prueba de adherencia plaquetaria.

Se esquematiza los fragmentos de polímeros PVA, PLA y membrana de PLA inmersos en .5 ml de plasma rico en plaquetas.

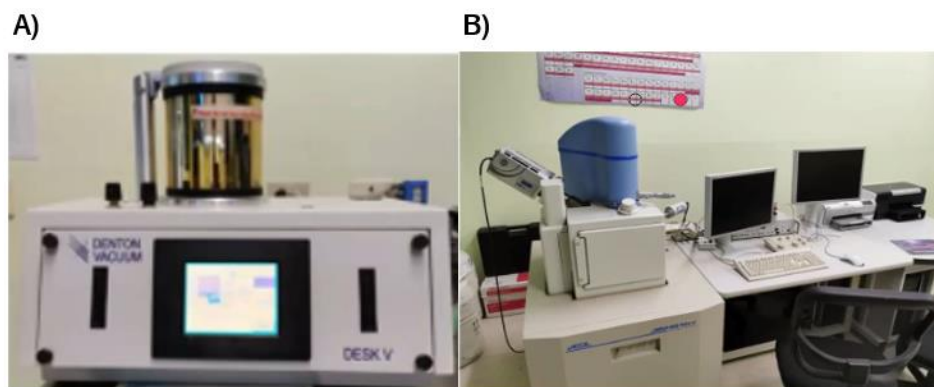


Figura 24. Equipo de Sputtering y SEM.

A) Equipo de Sputtering. B) Microscopio electrónico de barrido.

6.6 Experimento *in vivo*.

Con tiempo de anticipación se esterilizó en autoclave el material quirúrgico y de apoyo a emplear durante la cirugía, con ayuda de tijeras finas se cortaron en cuadrados de 1 cm² las membranas de PVA/PLA anteriormente elaboradas, enseguida, estos cortes se esterilizaron mediante exposición con luz ultravioleta por 20 minutos de cada lado. Una vez seleccionados los biomodelos, éstos se clasificaron aleatoriamente de acuerdo con la Tabla 3.

Tabla 3. Distribución de los tratamientos.

Biomodelo	Controles y Tratamientos
Rata 1	Placebo: agua desionizada estéril (Control –).
Rata 2	Membrana comercial Italdermol ® (Control +).
Rata 3	Membrana PVA/PLA.
Rata 4	Extracto acuoso por método convencional (EAMC).
Rata 5	Extracto etanólico con equipo Soxhlet (EEMS).
Rata 6	Extracto acuoso con equipo Soxhlet (EAMS).
Rata 7	Extracto etanólico asistido por microondas (EEAM).
Rata 8	Extracto acuoso asistido por microondas (EAAM).
Rata 9	Membrana PVA/PLA + EAMC.
Rata 10	Membrana PVA/PLA + EEMS.
Rata 11	Membrana PVA/PLA + EAMS.

Rata 12	Membrana PVA/PLA + EEAM.
Rata 13	Membrana PVA/PLA + EAAM.

Para la fase de la realización de la herida se dividió en 3 partes, que a continuación se explican.

1. Preoperatorio: Se realizó una evaluación a cada biomodelo para corroborar su condición física, posteriormente se pesó a cada una de las ratas con el objetivo de realizar los calcular la dosis de anestésicos: Ketamina marca ANESKET® 1000 mg/10 ml dosis de 60mg/kg y Xilacina 20 mg/1 mL PROCIN® 25ml dosis 10mg/kg ambas por vía intraperitoneal (IP).
2. Operatorio o cirugía: Se inició con la aplicación de la anestesia correspondiente; una vez confirmada la sedación se colocaron en decúbito ventral y se procedió a realizar la tricotomía de la región dorsal a cada una de las ratas, enseguida de la asepsia y antisepsia se realizó el marcaje del contorno de la herida en forma de huso de 13 mm x 0.6mm aproximadamente, como se muestra en la Figura 25. Finalmente se incidió con un corte en el tejido guiándose del marcaje previamente realizado con ayuda de bisturí mango número 3 y navaja de bisturí #10, auxiliándose también con tijera tipo roma. Al término de cada herida se colocó el tratamiento a evaluar (35 µl de agua desionizada estéril, 1cm² de gasa Italdermol®, 1 cm² de membrana de PVA/PLA, 35 µl del extracto al 4% o 1 cm² de membrana de PVA/PLA + 35 µl del extracto indicado al 4%) de acuerdo a la planeación del experimento (Tabla 3) y se fotografiaron las heridas con ayuda del microscopio y software marca Celestron (Celestron, n.d.).



Figura 25. Esquema de ubicación de la herida. Fuente propia

3. Postoperatorio: una vez realizadas las heridas y aplicado los tratamientos, los biomodelos se ubicaron individualmente en cubo de recuperación, durante el

cual se vigilaron datos de alarma (depresión del sistema nervioso central, hipotermia, comportamiento, somnolencia, hemorragia, hipoxia y posible defunción) minutos después de su reincorporación total se les aplicó analgésico Tramadol 5mg/kg por vía IM y antibiótico Enroxil 1ml/20kg por vía IM durante 3 días.

Las heridas se observaron macroscópicamente, durante 14 días (tomando como día 0 la realización de la cirugía), se fotografiaron como se observa en la Figura 26 y con base en la planeación (Tabla 3) se aplicó el tratamiento correspondiente cada 24 hrs (35 µL de cada extracto al 4% p/v y para el control negativo 35 µL de agua desionizada estéril), para el caso del control positivo (gasas Italdermol ®) y la membrana de PVA/PLA la aplicación fue únicamente el día 0.



Figura 26. Equipo de observación y fotografiado de heridas.

6.6.1 Análisis histomorfológico.

Al término del experimento se realizó la eutanasia con Pentobarbital Sódico 4mg/kg vía intracardiaca. En seguida se realizó la toma de biopsia del tejido epitelial de la parte dorsal de las ratas comprendiendo desde la epidermis hasta la fascia muscular abarcado tejido cicatrizado y original para su análisis histomorfológico. Las biopsias se conservaron en formaldehído al 10 % hasta su procesamiento por el histotecnólogo. Posteriormente, se enviaron al departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina BUAP, en donde realizaron cortes y tinciones con Hematoxilina-Eosina (H&E) y Tricrómica de Masson (TM) en todas las muestras.

6.7 Experimentos *in vitro*.

6.7.1 Proliferación de celular de fibroblastos.

Esta fase fue necesaria, previo a la realización del ensayo de cicatrización de heridas y el ensayo de viabilidad celular por XTT. Se inició con el descongelamiento a temperatura ambiente de un crio vial de la línea celular de fibroblastos de piel humana (ATCC ® CRL-PCS-201-012) y se procedió a centrifugar por 10 minutos a 1,500 rpm. Enseguida se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 2 ml de medio de crecimiento de fibroblastos sin suero (ATCC ® PCS-201-040 TM) previamente preparado con base en el protocolo establecido por el proveedor (America Type Culture Collection (ATCC), n.d.). Esta suspensión se transfirió a una caja T-25 y se agregaron 3 ml más de medio de cultivo, inmediatamente se observaron al microscopio para observar la presencia y morfología de las células, finalmente se colocaron cuidadosamente en incubación a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5%. Los cultivos celulares se observaron al microscopio cada 24h y el medio de cultivo se cambió cada 48 o 72 horas dependiendo de la observación del medio de cultivo y/o de la confluencia observada (Figura 27A-C).

A las 72 horas se observó el cultivo celular y debido a una confluencia mayor a 80% y adherencia celular óptima (Figura 27D) se procedió a realizar un primer pase utilizando Tripsina-EDTA al 2x (Sigma Aldrich© No. 59418C) dividiendo la solución celular en dos cajas T25 con medio de crecimiento de fibroblastos sin suero para un volumen final de 5 ml , mismas que se incubaron a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5% y se observaron cada 24 horas hasta llegar a la confluencia deseada, los cambios de medio de cultivo se realizaron cada 2 días. Después de 6 días se obtuvo una confluencia optima (Figura 28E) y se procedió a realizar la curva de crecimiento y conteo celular explicados más adelante.

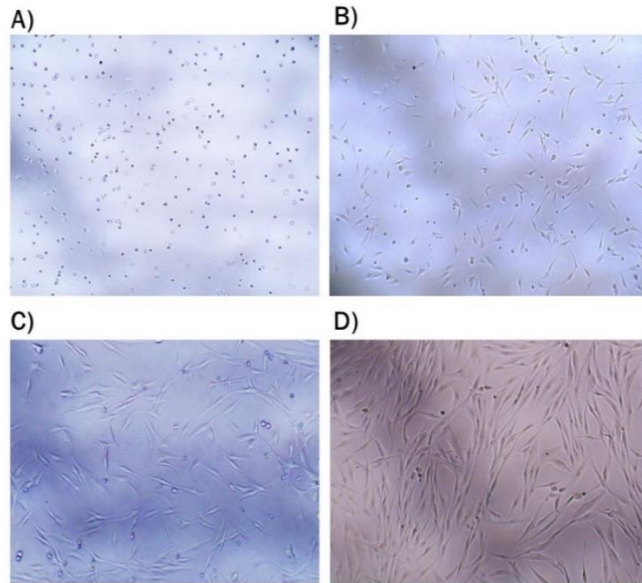


Figura 27. Progresión del cultivo celular inicial de fibroblastos.

A) Cultivo celular de fibroblastos posterior al descongelamiento del vial (0 horas). B) Cultivo celular de fibroblastos después de 24 horas. C) Cultivo celular de fibroblastos después de 48 horas. D) Cultivo celular de fibroblastos después de 72 horas. Línea celular de fibroblastos de piel humana (ATCC ® CRL-PCS-201-012).

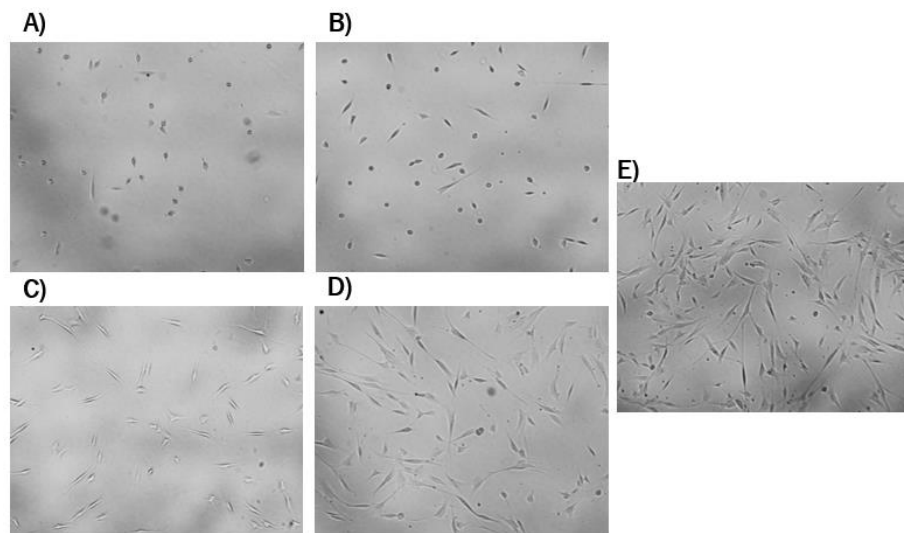


Figura 28. Progresión del crecimiento celular pase 1.

A) Cultivo celular del pase 1 de fibroblastos (0 horas). B) Cultivo celular de fibroblastos después de 72 horas. C) Cultivo celular del pase 1 de fibroblastos después de 96 horas. D) Cultivo celular del pase 1 de fibroblastos después de 120 horas. E) Cultivo celular del pase 1 de fibroblastos después de 144 horas. Línea celular de fibroblastos de piel humana (ATCC ® CRL-PCS-201-012).

6.7.2 Curva de crecimiento fibroblástica.

Para poder realizar la curva de crecimiento de células fibroblásticas fue necesario realizar lo que a continuación se describe.

1. Preparación de suspensión celular inicial: se tripsinizaron dos cajas T25 de células fibroblásticas (ATCC ® CRL-PCS-201-012) con tripsina al 2x por 2-3 minutos e inactivada con volumen al doble de medio libre de suero. En seguida se recolectó la solución celular en un frasco de 15 ml estéril y se centrifugó a 1500 rpm por 10 min, posterior a la eliminación del sobrenadante se resuspendió en 1 ml de medio de crecimiento de fibroblastos libre de suero (ATCC ® PCS-201-040 TM) formando la suspensión celular inicial.
2. Conteo celular: se elaboró la solución de conteo formada con 10 µL de la suspensión celular inicial anterior, 45 µL de PBS 1x y 45µL de azul de tripano. Inmediatamente se colocó 10 µL de la solución de conteo elaborada en una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad (Figura 29). El conteo se determinó mediante la visualización y conteo de células vivas (no teñidas) de los 4 cuadrantes y el cuadrante central en el microscopio y bajo la siguiente fórmula se determinó el número de células.

$$\text{Células en 1ml} = \frac{\# \text{ de células vivas contadas}}{\# \text{ de cuadrado contados}} \times 10,000$$



Figura 29. Equipo de conteo de fibroblastos en cámara de Neubauer.

3. Curva de calibración: se sembraron en una caja de 12 pozos una concentración de 20,000 células en cada pozo (9 pozos) con un volumen final de 2 ml cada uno, en seguida se incubó la placa a 37° C en atmosfera de CO₂ al 5%. Los pasos de tripsinizacion, conteo y congelamiento se repitieron cada día con base en la columna de cultivos planeados como se observa en la Figura 30.

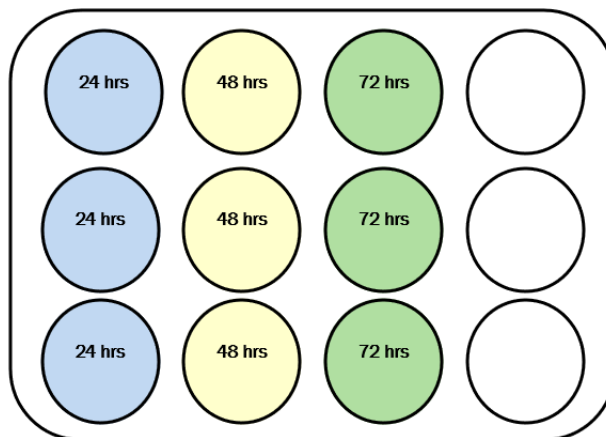


Figura 30. Planeación de la curva de crecimiento.

Se esquematiza las columnas correspondientes a los pozos con células y el tiempo en el cual se observaron, de igual manera se realizó el conteo celular de cada pozo y se calculó el promedio por columna para graficar.

6.7.2.1 Viabilidad celular y ensayo de cicatrización de heridas *in vitro*.

El ensayo de cicatrización de heridas *in vitro*, es una técnica para observar la migración de células *in vitro*, este ensayo se basa en la observación sobre la creación de una herida de manera artificial en una monocapa de células confluentes, las células en el borde de la hendidura creada migrarán hasta que se restablezca el contacto célula-célula y la brecha (herida) desaparezca (Ibidi cells in focus, 2018). Este ensayo es útil para validar el efecto de fármacos o en nuestro caso extractos de flor de *Calendula officinalis* L. en la migración celular. El ensayo se pretendía realizar con base en el protocolo establecido por el fabricante Ibidi GMB H (2018), asimismo se pretendía la evaluación de viabilidad mediante el reactivo de XTT de cada extracto en la línea celular de fibroblastos de piel humana (ATCC® CRL-PCS-201-012) (America Type Culture Collection (ATCC), 2011); sin embargo, debido a

la contingencia el cierre del acceso a los laboratorios de investigación ocasionó el cese de actividades y la imposibilidad de realizar dichos experimentos.

6.8 Análisis de datos.

Las heridas se observaron diariamente durante el periodo de tiempo indicado (día 0 al día 14) y se fotografiarán con una resolución de 1280* 729 (1M) con ayuda del microscopio Celestron y a través del software Celestron Portable Capture HD. Las fotografías obtenidas se analizaron con el programa Image J, en el cual se obtuvo: área (mm²) de todas las heridas cada día.

Las laminillas procesadas y teñidas con H&E y Tricromico de Masson, se analizaron por medio de microscopia y se capturaron imágenes a través del software Celestron Portable Capture HD. El porcentaje de fibras de colágeno fue cuantificado de las imágenes de los cortes con tinción de Tricromico de Masson de cada tratamiento y controles, mediante el software gratuito de código abierto llamado Orbit Image Analysis (Stritt et al., 2020).

7 Resultados.

7.1 Obtención de extractos de *Calendula officinalis* L.

Se obtuvieron extractos acuosos y etanólicos de flor de *Calendula officinalis* L. (Figura 32) al 4% p/v mediante tres técnicas distintas como se observa en la Tabla 4, posteriormente se realizó a cada extracto los análisis siguientes: espectroscopia UV visible, cuantificación de compuestos fenólicos totales y cuantificación de la capacidad antioxidante, mismos que se explicaran los resultado más adelante.

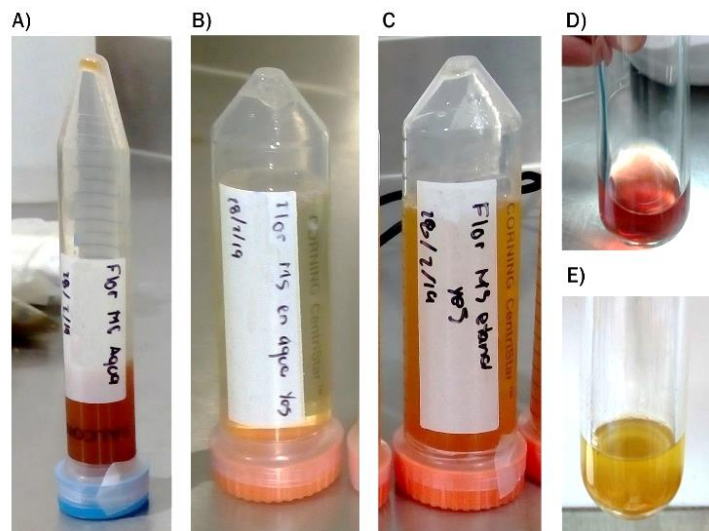


Figura 31. Extractos acuosos y etanólicos de *C. officinalis* L. filtrados.

A) Extracto acuoso por método convencional. B) Extracto acuoso con equipo Soxhlet. C) Extracto etanólico con equipo Soxhlet. D) Extracto acuoso asistido por microondas. E) Extracto etanólico asistido por microondas. Concentración para cada extracto 4% (p/v).

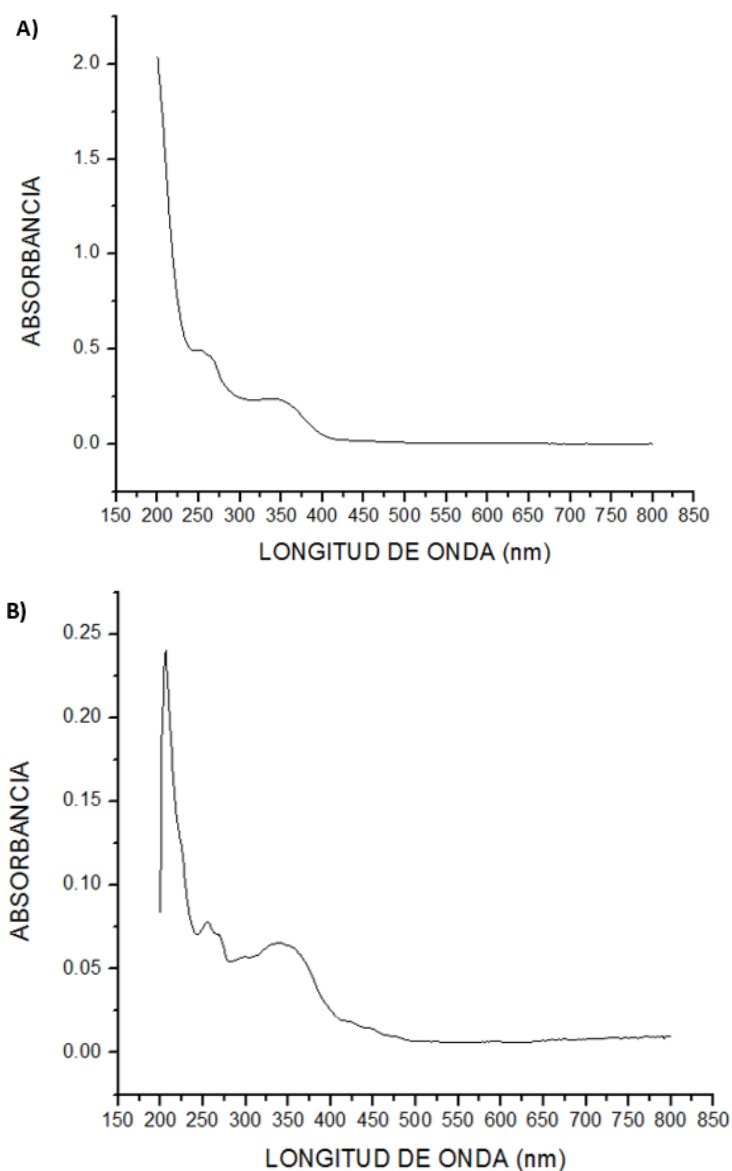
Tabla 4. Método de extracción, concentración y solvente de los extractos obtenidos.

Método	Concentración (p/v)	Extracto obtenido	Solvente
1. Método convencional	4%	EAMC	Agua desionizada estéril
2. Método con equipo Soxhlet	4%	EAMS	Agua desionizada estéril
		EEMS	Etanol al 96%
3. Método asistido por microondas	4%	EAAM	Agua desionizada estéril
		EEAM	Etanol al 96%

7.2 Espectroscopia UV- VIS de los extractos.

Dentro de los análisis que se realizó a cada uno de los extractos fue la espectroscopia UV visible, misma que se efectuó para la identificación de compuestos fenólicos en especial los flavonoides. En la Figura 32A se puede observar el espectro UV-VIS del EAMC de *Calendula officinalis* L. a una dilución 1:100, el cual, muestra dos ondas definidas de absorción en el rango ultravioleta del espectro en una región de 250nm y 350nm respectivamente. El espectro UV/VIS del EEMS de *Calendula officinalis* L. a una dilución 1:100 muestra una onda de

absorción de baja intensidad en el rango ultravioleta del espectro en una región de 250nm, asimismo, se observa una onda de absorción fuerte a los 350nm aproximadamente (Figura 32B). Con respecto al EAMS de *Calendula officinalis* L. a una dilución 1:100 el espectro de UV-VIS de la Figura 32C muestra ligeramente dos ondas de absorción en el rango ultravioleta del espectro en una región de 250nm y 350nm, mostrándose con mayor intensidad la segunda onda.



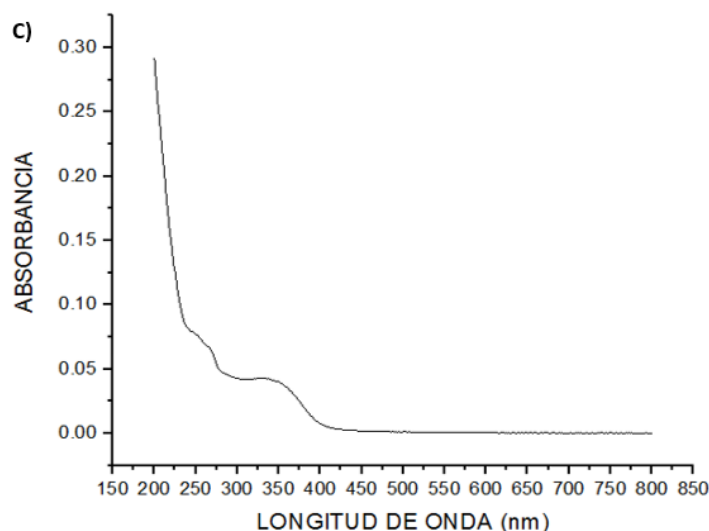


Figura 32 Espectros de absorción UV-visible.

A) Espectro de absorbancia del extracto acuoso de flor de *C. officinalis* L. por método convencional dilución 1:100. B) Espectro de absorbancia del extracto etanólico de flor de *C. officinalis* L. por método con equipo Soxhlet dilución 1:100. C) Espectro de absorbancia del extracto acuoso de flor de *C. officinalis* L. por método con equipo Soxhlet dilución 1:100.

Los espectros UV-VIS pertenecientes a los extractos elaborados con el equipo de microondas se observan en la Figura 33. Respecto al EEAM se puede observar en el espectro del panel A picos definidos de absorción en el rango ultravioleta del espectro especialmente en una región de 275nm a 312 nm, también ondas de absorbancia de baja intensidad observadas en una región de 312 nm a 362 nm. En el panel B se presenta el espectro obtenido del EAAM de *Calendula officinalis* L. a una dilución 1:100, el cual presentan gran cantidad de picos definidos de absorción en el rango ultravioleta del espectro en una región de 270 nm a 350 nm.

Debido a la posición de las ondas de absorción acentuadas dentro del rango ultravioleta entre 250 a 375 nm, se corrobora la presencia de flavonoides en todos los extractos.

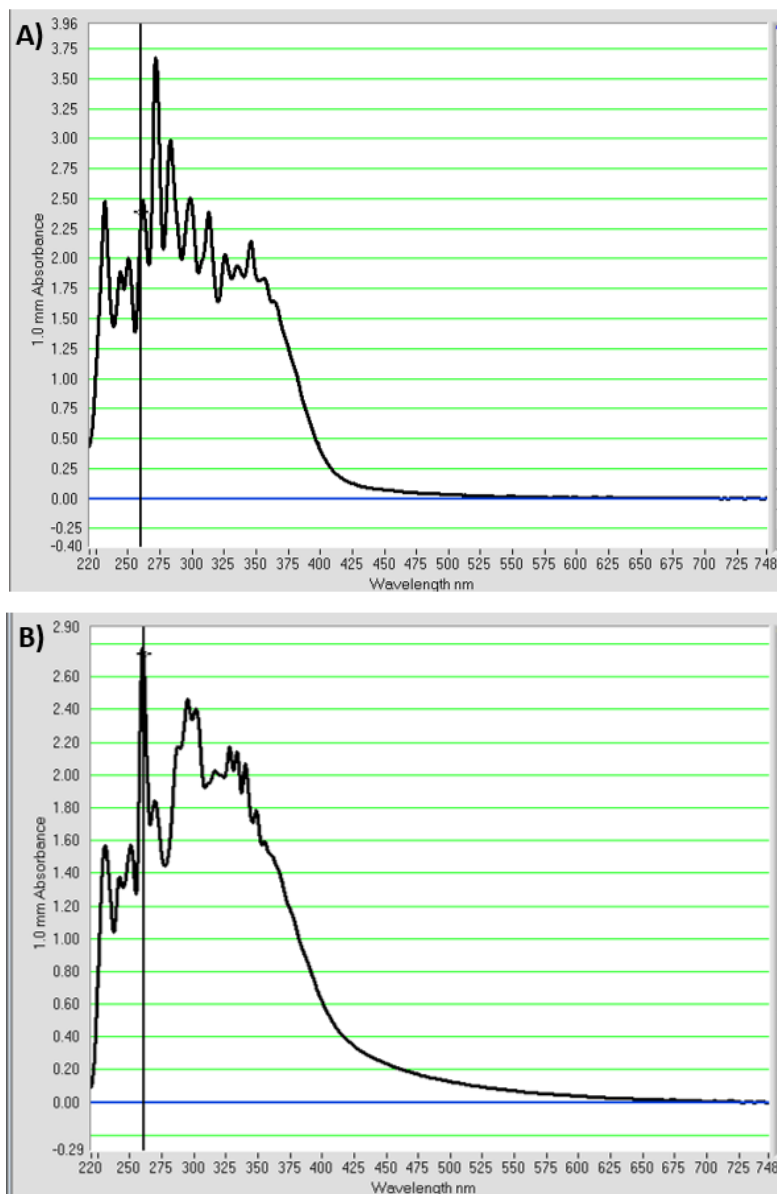


Figura 33. Espectro UV-visible de extractos asistidos por microondas.

A) Espectro de absorbancia del EEAM dilución 1:100. B) Espectro de absorbancia del EAAM dilución 1:100. EAAM: Extracto acuoso de flor de *C. officinalis* L. asistido por microondas. EEAM: Extracto etanólico de flor de *C. officinalis* L. asistido por microondas.

7.3 Cuantificación de Compuestos Fenólicos Totales (CFT).

La cuantificación de compuestos fenólicos totales se realizó a través de la curva de calibración del ácido gálico (GA) como se observa en la Figura 34. A partir del análisis de datos se obtuvo que el extracto etanólico asistido por microondas (EEAM) presentó la mayor concentración de compuestos fenólicos totales ($5.38 \pm$

.89 mg equivalentes de ácido gálico (EAG) /1 ml de extracto) (Tabla 5), mientras que el extracto acuoso con el mismo método de extracción (EAAM) fue solamente de $1.39 \pm .06$ mg EAG / 1ml de extracto.

En la Tabla 5 también se puede observar que el segundo lugar se ubicó el extracto acuoso obtenido por método convencional (EAMC) presentando una concentración de compuestos fenólicos totales de $2.68 \pm .01$ mg EAG / 1 ml de extracto. Este resultado fue mayor que aquellos extractos acuosos (EAMS y EAAM) y el extracto etanólico (EEMS) con concentraciones de $0.96 \pm .12$, $1.39 \pm .06$, $1.07 \pm .00$ mg EAG /1 ml de extracto, respectivamente.

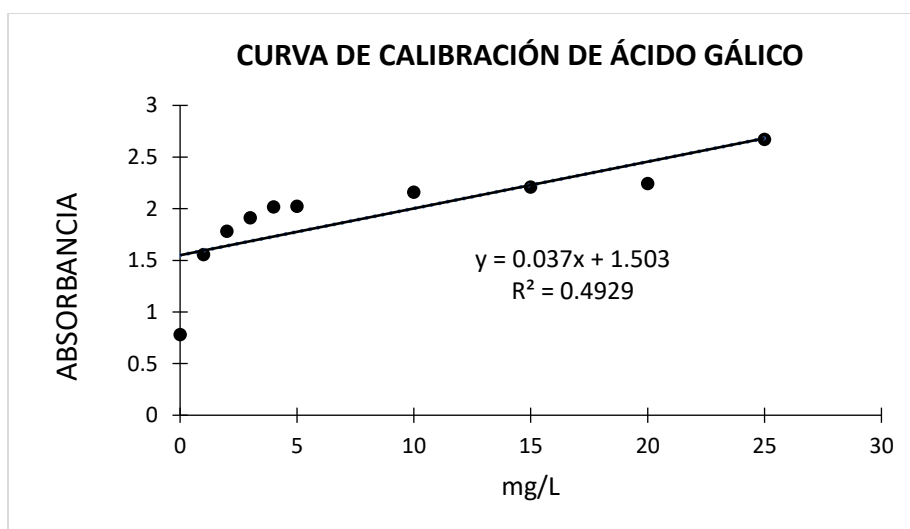


Figura 34. Curva de calibración del Ácido Gálico.

Tabla 5. Contenido de fenoles totales.

Extracto	Contenido de Fenoles Totales ^a ± DE
EAMC	$2.68 \pm .01$
EEMS	$1.07 \pm .00$
EAMS	$0.96 \pm .12$
EAAM	$1.39 \pm .06$
EEAM	$5.38 \pm .89$

Los valores representan la media de tres repeticiones ± la desviación estándar (DE). EAMC: Extracto acuoso por método convencional, EEMS: Extracto etanólico con equipo Soxhlet, EAMS: Extracto

acuoso con equipo Soxhlet, EEAM: Extracto etanólico asistido por microondas y EAAM: Extracto acuoso asistido por microondas. ^a mg EAG en 1 mL de extracto. EAG: equivalente de ácido gálico.

7.4 Cuantificación de la capacidad antioxidante.

Los datos expresados en media $\pm$ desviación estándar obtenidos mediante la cuantificación de la capacidad antioxidante utilizando el reactivo DPPH muestran que el EAMC arrojó el porcentaje mayor de la captación del radical DPPH con 125.2 ± 32.4 , seguido del EAMS con un porcentaje de 124.5 ± 30.7 . (Tabla 6).

Por otro lado, también se observa cómo los extractos acuosos de las tres técnicas (EAMC 125.2 ± 32.7 , EAMS 124.8 ± 30.7 y EAAM 124.8 ± 29.7) poseen ligeramente un mayor porcentaje de capacidad antioxidante que los extraídos en etanol (EEMS 123.6 ± 33.5 . y EEAM 123.1 ± 32.4). Sin embargo, las diferencias entre los porcentajes de cada extracto no presentan una diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 6. Capacidad antioxidante de extractos acuosos y etanólicos.

Extracto	Porcentaje %
EAMC	125.2 ± 32.7
EEMS	123.6 ± 33.5
EAMS	124.8 ± 30.7
EEAM	123.1 ± 32.4
EAAM	124.8 ± 29.7

Los resultados del porcentaje de captación del radical DPPH se muestran en media de tres repeticiones $\pm$ desviación estándar. EAMC: Extracto acuoso por método convencional. EEMS: Extracto etanólico con equipo Soxhlet. EAMS: Extracto acuoso con equipo Soxhlet. EEAM: Extracto etanólico asistido por microondas. EAAM: Extracto acuoso asistido por microondas.

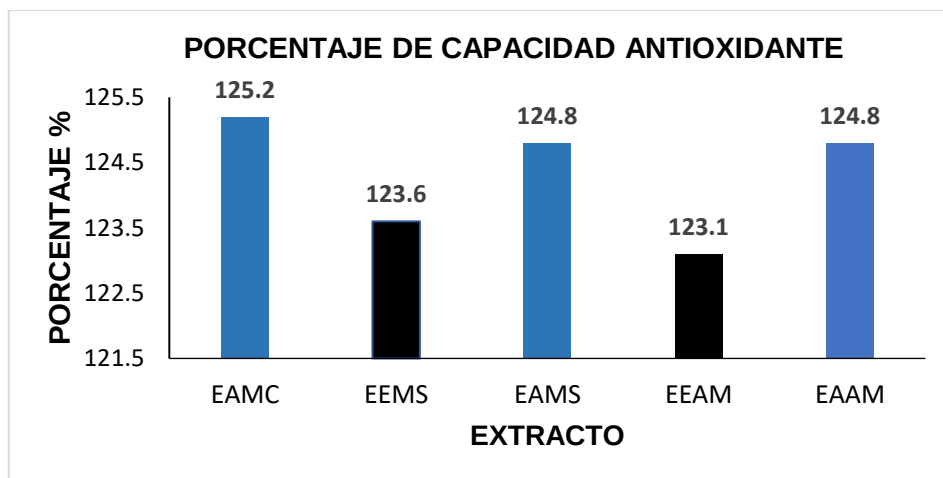


Figura 35. Porcentaje de capacidad antioxidante de los extractos acuosos y etanólicos de *Calendula officinalis* L.

En orden de izquierda a derecha, EAMC: Extracto acuoso por método convencional, EEMS: Extracto etanólico con equipo Soxhlet, EAMS: Extracto acuoso con equipo Soxhlet, EEAM: Extracto etanólico asistido por microondas y EAAM: Extracto acuoso asistido por microondas (EAAM).

7.5 Caracterización de las membranas de PVA/PLA por microscopia electrónica de barrido (SEM).

El análisis de la membrana de PVA/PLA elaborada con el equipo de electrohilado que se muestra en la Figura 36 se llevó a cabo a través de microscopia electrónica de barrido.



Figura 34. Membrana elaborada de PVA/PLA por método de electrohilado.

En la Figura 37, se observan las fibras de distintos diámetros entrecruzadas a un aumento de 1000x y 2000x, con un acomodamiento en distintas direcciones y sin dejar alguna zona descubierta. También se pueden apreciar algunas

aglomeraciones sobre la membrana, estas son de las soluciones poliméricas usadas que no se alcanzaron a estirar durante el proceso, estas gotas forman parte de la estructura de la membrana como si fueran nodos que unen a las fibras.

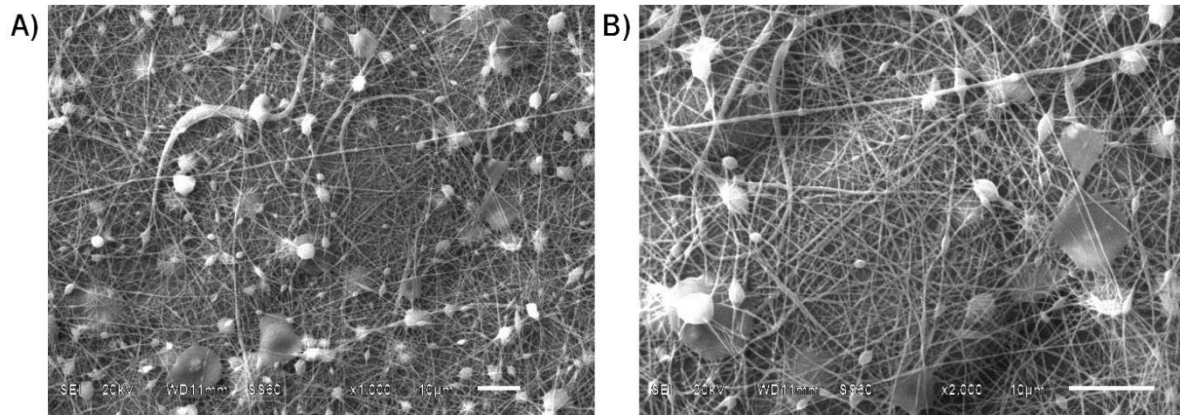


Figura 35. Caracterización con SEM de membranas de PVA/PLA.

A) Aumento a 1000x. B) Aumento a 2000x. PVA: Alcohol Polivinílico. PLA: Ácido Poliláctico.

Cabe mencionar que se realizaron paralelamente análisis de membranas únicamente con PLA y PVA mismas que se analizaron también por SEM. La Figura 38 muestra imágenes obtenida de SEM de membrana electrohilada a partir de solución de PLA, en el panel A se observa el acomodamiento heterogéneo de las fibras, sin dejar áreas descubiertas, por otro lado, en el panel B se observó a un aumento de 500x filamentos de distinto grosor. En la Figura 39 se exponen imágenes obtenida de SEM de la membrana electrohilada a partir de solución de PVA, en el panel A se observa el acomodamiento de las fibras con una visible deformación de los filamentos, en comparación con la membrana de PLA, en esta se pueden observar mayor cantidad de espacios descubiertos, por otro lado, en el panel B perteneciente a un acercamiento a 500x de la membrana de PVA se visualizan filamentos de distinto grosor.

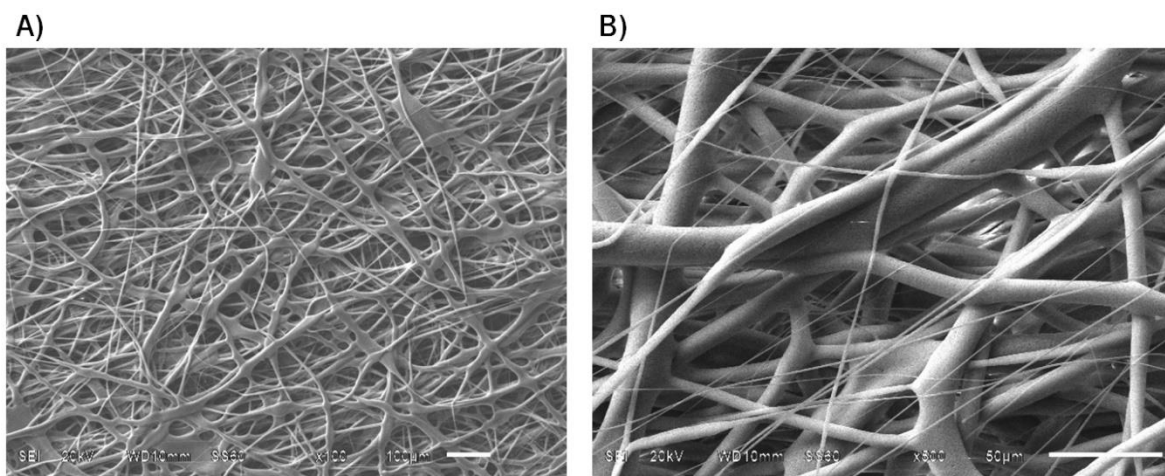


Figura 36. Imágenes de SEM de membrana de PLA.

A) Aumento a 100x. B) Aumento a 500x. PLA: Ácido Poliláctico.

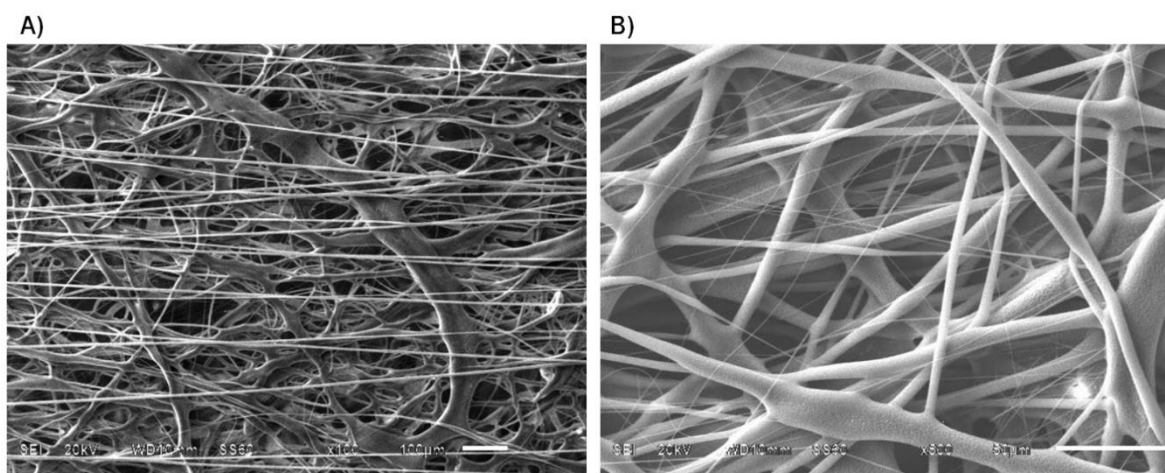


Figura 37. Imágenes de SEM de membrana de PVA.

A) Aumento a 100x. B) Aumento a 500x. PVA: Alcohol polivinílico. SEM: Microscopio electrónico de barrido.

7.6 Prueba de adherencia plaquetaria

Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se pudo analizar las muestras de los polímeros utilizados PVA, PLA y de un fragmento de la membrana electrohilada de PLA posterior a la interacción con el PRP y hacer un análisis visual de la interacción con las plaquetas. En la Figura 40 se muestran las micrografías de ciertas estructuras sobre la superficie de los filamentos de la membrana de PLA, en ellas se puede observar una interacción con la superficie, ya que en todos los casos existió adhesión y agregación de las estructuras visibles, indistintamente de la muestra evaluada.

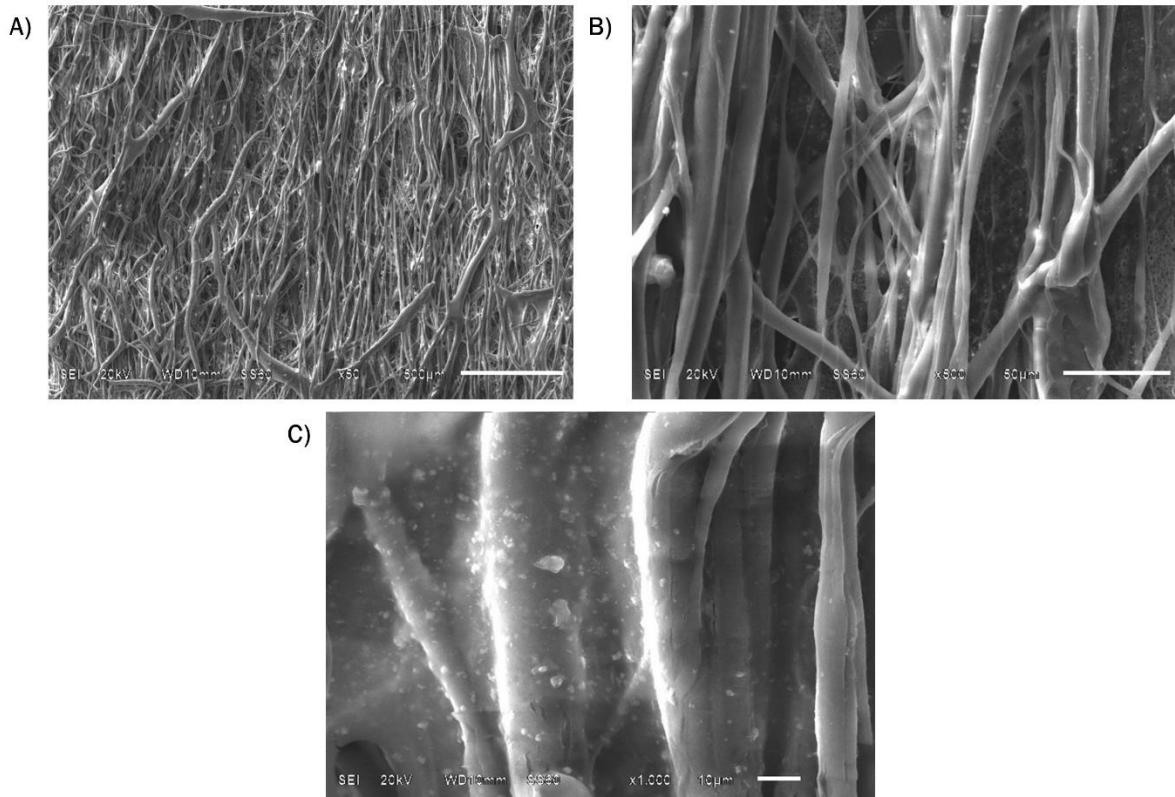


Figura 38. Micrografía de adherencia plaquetaria en membrana de PLA.

A) Membrana de PLA electrohilada a un aumento de 50x. B) Membrana de PLA electrohilada a un aumento de 500x. C) Membrana de PLA electrohilada a un aumento de 1000x.

Para el caso de las muestras de fragmentos de polímeros PVA y PLA sin pasar por un proceso de electrohilado, en las Figuras 41C y 42C se observa las estructuras adheridas y en ciertas zonas aglomeradas sobre la superficie de los fragmentos de los polímeros. Un caso particular es el que se observa con mayor claridad en la Figura 42A, debido a que el PVA por ser soluble en agua presentó una estructura amorfa distinta al fragmento cilíndrico inicial, sin embargo, se presentan las estructuras adheridas en su superficie (Figura 42C).

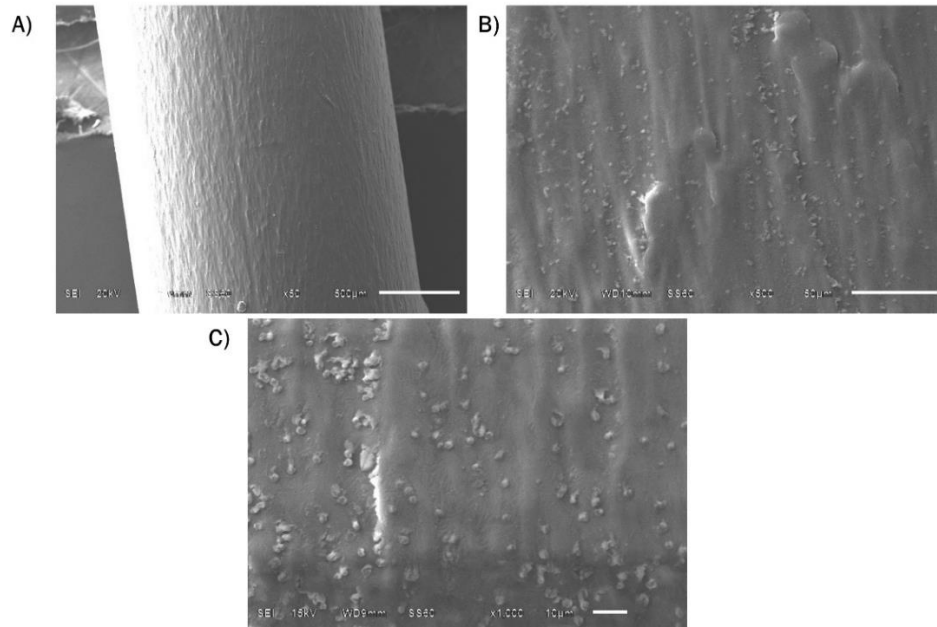


Figura 39. Micrografía de adherencia plaquetaria en fragmento de PLA.

A) Fragmento de PLA a un aumento de 50x. B) Fragmento de PLA a un aumento de 500x. C) Fragmento de PLA a un aumento de 1000x. PLA: Acido Poliláctico.

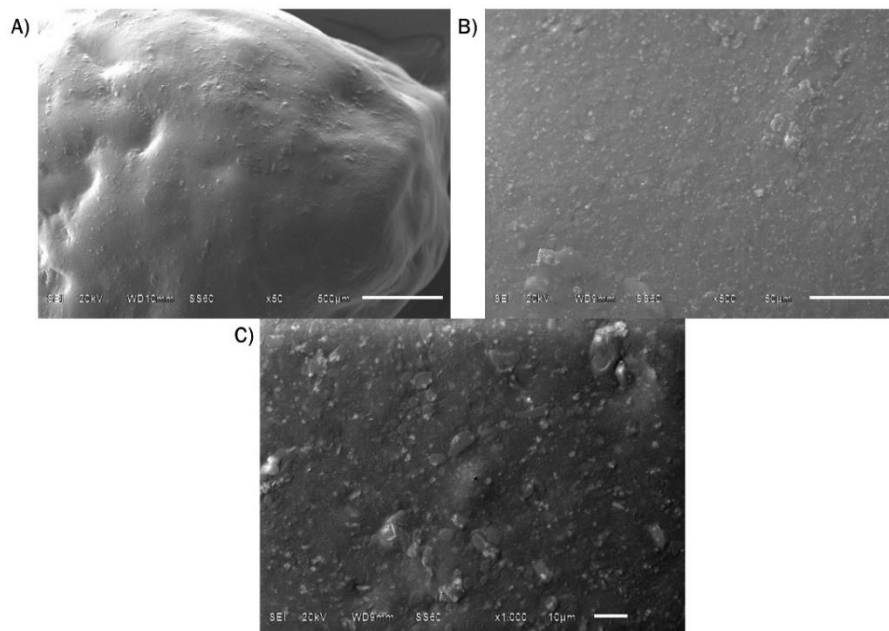


Figura 40. Micrografía de adherencia plaquetaria en fragmento de PLA.

A) Fragmento de PVA a un aumento de 50x. B) Fragmento de PVA a un aumento de 500x. C) Fragmento de PVA a un aumento de 1000x. PVA: Alcohol Polivinílico.

7.7 Resultados morfológicos de las heridas.

Para el análisis morfológico de las heridas se tomaron fotomicrografías con ayuda del microscopio marca Celestron y el software Celestron Portable Capture HD, con un lapso de 24hrs durante 14 días, tomando como día 0 a partir de la cirugía realizada en el lomo de cada biomodelo.

Las fotomicrografías obtenidas se ordenan en la Figura 43A-B, de las cuales se observa que el tratamiento más eficaz visualmente fue el EAMC ya que en la imagen podemos apreciar una cicatrización completa, sin presencia de costra melicérica y una pigmentación similar a la piel original; por lo que visualmente llega a un resultado óptimo de la cicatrización en comparación con los controles que se aprecian en el panel A de la misma Figura 43.

Por otra parte, los extractos EEAM y EAAM (Figura 43B) también mostraron una cicatrización aceptable en comparación con los controles con una línea casi visible por pigmentar, pero sin presencia de costra. En lo que respecta al uso de la membrana de PVA/PLA en conjunto con un extracto, se rescata lo observado en el panel C de la Figura 43, en la cual los tratamientos más efectivos fueron, la MEMBRANA PVA/PLA+EAMS, MEMBRANA PVA/PLA+ EEAM y MEMBRANA de PVA/PLA+ EAAM en comparación con los controles, puesto que presentaron una cicatrización más avanzada en comparación con los controles, pero aun con diferencia en la tonalidad rosácea en la piel recién remodelada; sin embargo no hay presencia de tejido inflamado.

Es importante mencionar que estos resultados se basan en la observación de las imágenes a lo largo de los 14 días, a pesar de esto fue necesario la observación histológica para confirmar lo obtenido macroscópicamente en las heridas.

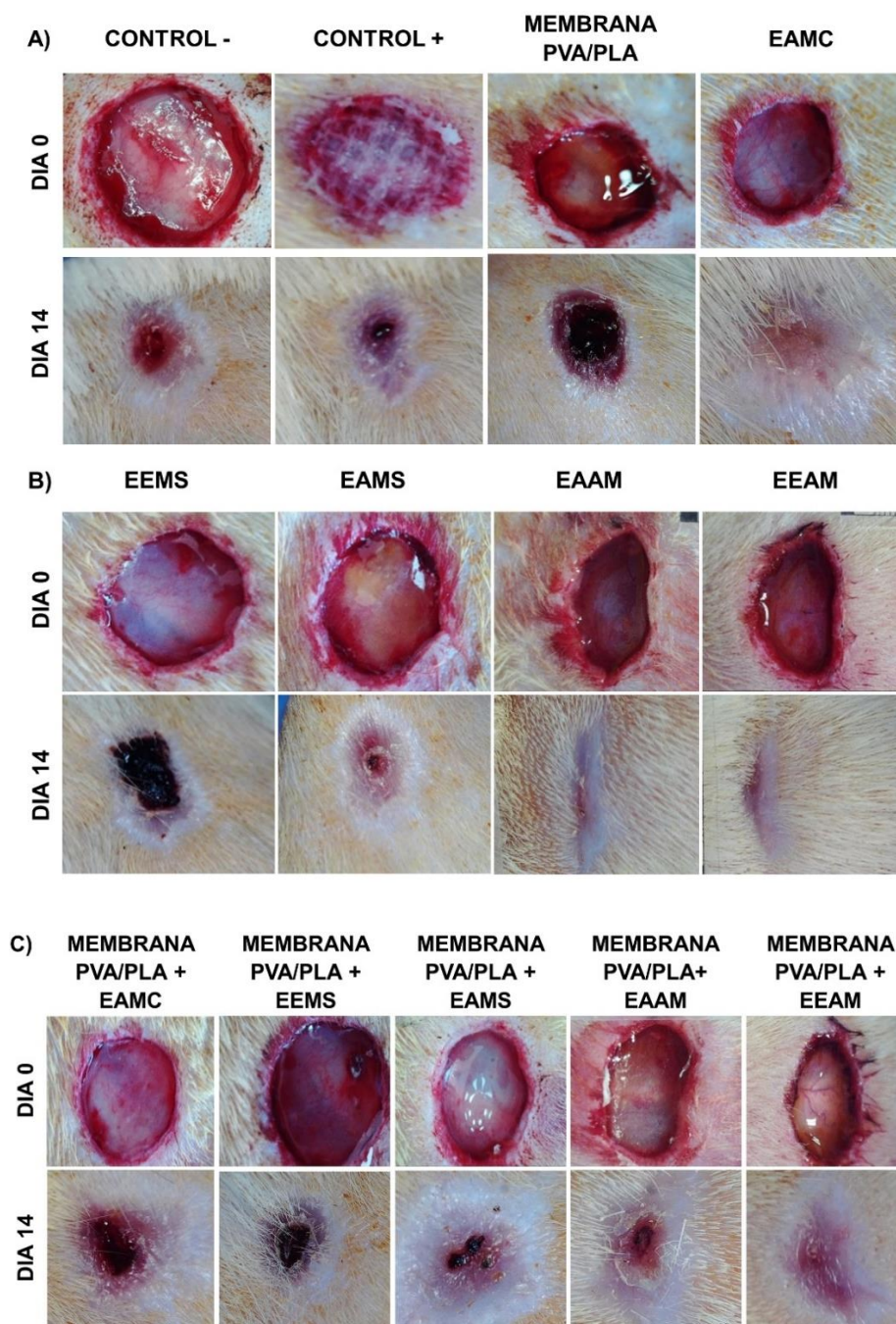


Figura 41. Fotografías de heridas.

A) Se observa las fotografías de las heridas en el día 0 y día 14 del control negativo (35 μ L de agua desionizada con aplicación diaria), control positivo (1 cm² de Gasa Italdermol ® con aplicación única), MEMBRANA PVA/PLA (1 cm² de membrana de PVA/PLA con aplicación única) y EAMC (extracto acuoso por método convencional). B) Se observa las fotografías de las heridas en el día 0 y día 14 del extracto etanólico con equipo Soxhlet (EEMS), extracto acuoso con equipo Soxhlet (EAMS), extracto acuoso asistido por microondas (EAAM) y extracto etanólico asistido por microondas

7.8 Resultados del análisis histológico.

[illegible]

64

A) Reconstrucción del corte de tejido teñido con H&E a 10 x. B) Se muestra un segmento del tejido teñido con H&E y TM respectivamente a 10x. Control negativo (C-): 35μL de agua desionizada estéril con aplicación diaria. Se identifican las siguientes estructuras: ➡ Vaso sanguíneo. ➡ Fibras de colágeno. ★ Folículo piloso. ✱ Queratina. ★ Glándula sebácea.

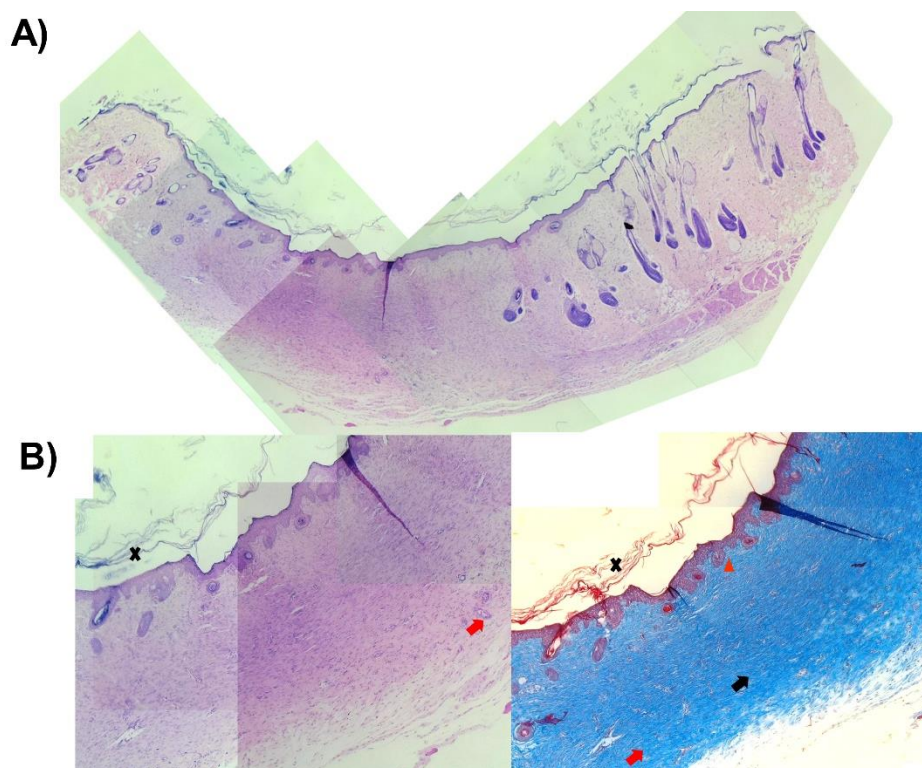


Figura 43. Corte histológico del tejido control positivo.

A) Reconstrucción del corte de tejido teñido con H&E a 10 x. B) Se muestra un segmento del tejido teñido con H&E y TM respectivamente a 10x. Control positivo(C-): 1 cm² de Gasa Italdermol ® con aplicación única. Se identifican las siguientes estructuras: ➡ Vaso sanguíneo. ➡ Fibras de colágeno. ✱ Queratina. ▲ Papilas dérmicas.

La Figura 46A corresponde a una reconstrucción del corte de piel tratada con la membrana de PVA/PLA realizada por electrohilado, en donde se puede observar en los extremos izquierdo y derecho tejido original, al centro la sección de tejido remodelado característico por una discontinuidad de la epidermis y dermis papilar. En el panel B se revela un segmento del corte original con un mayor acercamiento con dos tinciones H&E y TM respectivamente. La observación de este segmento nos reveló la presencia de detritus propios de los polímeros (PVA y PLA) que

componen la membrana, una cantidad mayor de vasos neoformados en comparación con los controles negativo y positivo (Figura 44y 45), además de eritrocitos dentro de éstos; respecto al área de tejido recién remodelado se distinguen folículos pilosos y glándulas sebáceas a nivel de la dermis, sin embargo, se observa la presencia aun de costra.

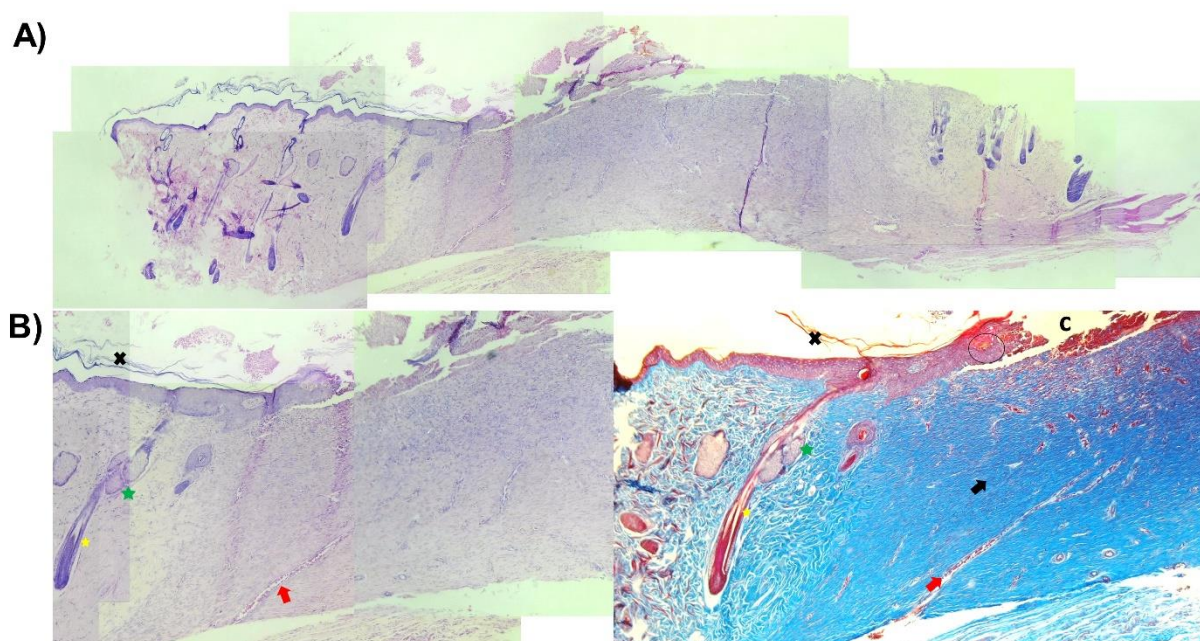


Figura 44. Corte histológico del tejido tratado con membrana de PVA/PLA.

A) Reconstrucción del corte de tejido teñido con H&E a 10 x. B) Se muestra un segmento del tejido teñido con H&E y TM respectivamente a 10x. Tratamiento: 1 cm² de membrana de PAV/PLA con aplicación única. Se identifican las siguientes estructuras: ➔ Vaso sanguíneo. ➔ Fibras de colágeno. *Queratina. ★ Folículo piloso. ★ Glándula sebácea. (C) Costra. ○ Detritus.

En lo que respecta a la herida tratada con extracto acuoso al 4% obtenido por el método convencional (EAMC) (Figura 47) se observa en comparación con el control negativo (Figura 44) una zona de tejido remodelo con abundante queratina relacionada con la presencia de una epidermis continua y de bordes regulares; así también, se observa una dermis papilar definida y folículos pilosos en conjunto con glándulas sebáceas; respecto a la angiogénesis se observa un nivel menor en comparación con el control negativo y positivo.

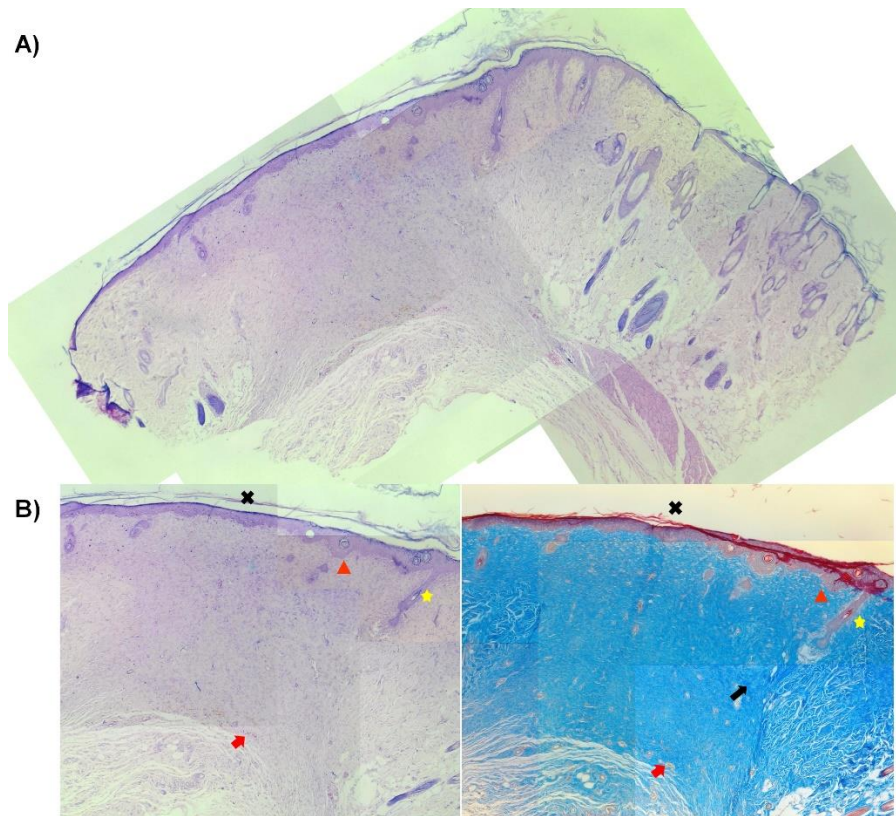


Figura 45. Corte histológico del tejido tratado con extracto acuoso por método convencional (EAMC).

A) Reconstrucción del corte de tejido teñido con H&E a 10 x. B) Se muestra un segmento del tejido teñido con H&E y TM respectivamente a 10x. Tratamiento: 35 μ L de extracto al 4%p/v con aplicación diaria. Se identifican las siguientes estructuras: ➔ Vaso sanguíneo. ➔ Fibras de colágeno. * Queratina. ▲ Papilas dérmicas. ★ Folículo piloso.

La Figura 48A corresponde a una reconstrucción de un corte del tejido tratado con el extracto etanólico obtenido con el equipo Soxhlet (EEMS), en donde se observa el tejido en remodelación en medio de tejido original, las imágenes 48B exhiben un hundimiento del tejido remodelado respecto a la continuidad de la piel no lesionada, sin embargo se puede observar presencia moderada de queratina en la superficie y de igual manera una angiogénesis presente; por otro lado, se observan folículos pilosos, pero no glándulas en la dermis remodelada, ni papilas dérmicas definidas. La fotografía de la herida al día 14 como se muestra en el panel B de la Figura 43 confirma una remodelación incompleta debido a la presencia de la costra.

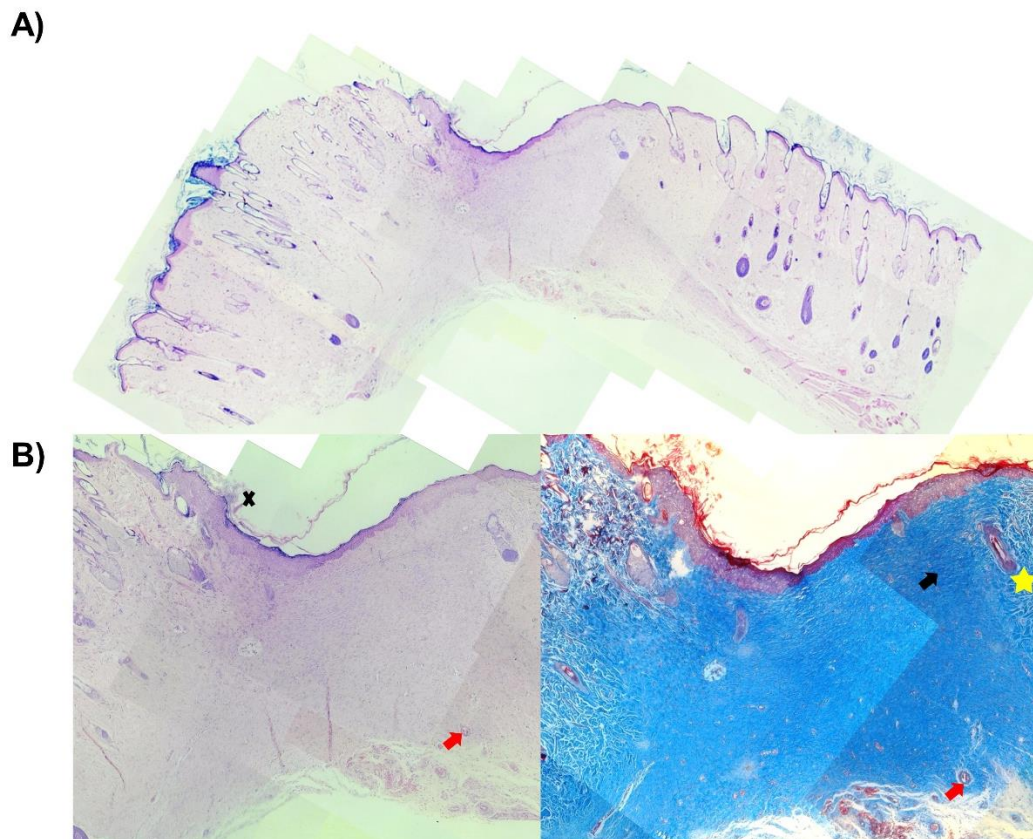


Figura 46. Corte histológico del tejido tratado con extracto etanólico con equipo Soxhlet (EEMS).

A) Reconstrucción del corte de tejido teñido con H&E a 10 x. B) Se muestra un segmento del tejido teñido con H&E y TM respectivamente a 10x. Tratamiento: 35 μ L de extracto al 4%p/v con aplicación diaria. Se identifican las siguientes estructuras: ➡ Vaso sanguíneo. ➡ Fibras de colágeno. * Queratina. ★ Folículo piloso.

Por su parte en el corte histológico de la herida tratada con el extracto acuoso obtenido con el equipo Soxhlet (EAMS) (Figura 49) se visualiza una zona central en remodelación con epidermis continua y de bordes regulares. En las imágenes del panel B se observa notoriamente la formación de vasos sanguíneos de pequeño calibre, un folículo piloso junto con su glándula sebácea cercano al área superficial remodela. Visualmente la herida se ve de un mejor aspecto en su proceso de cicatrización en comparación con el control negativo (Figura 43B EAMS).

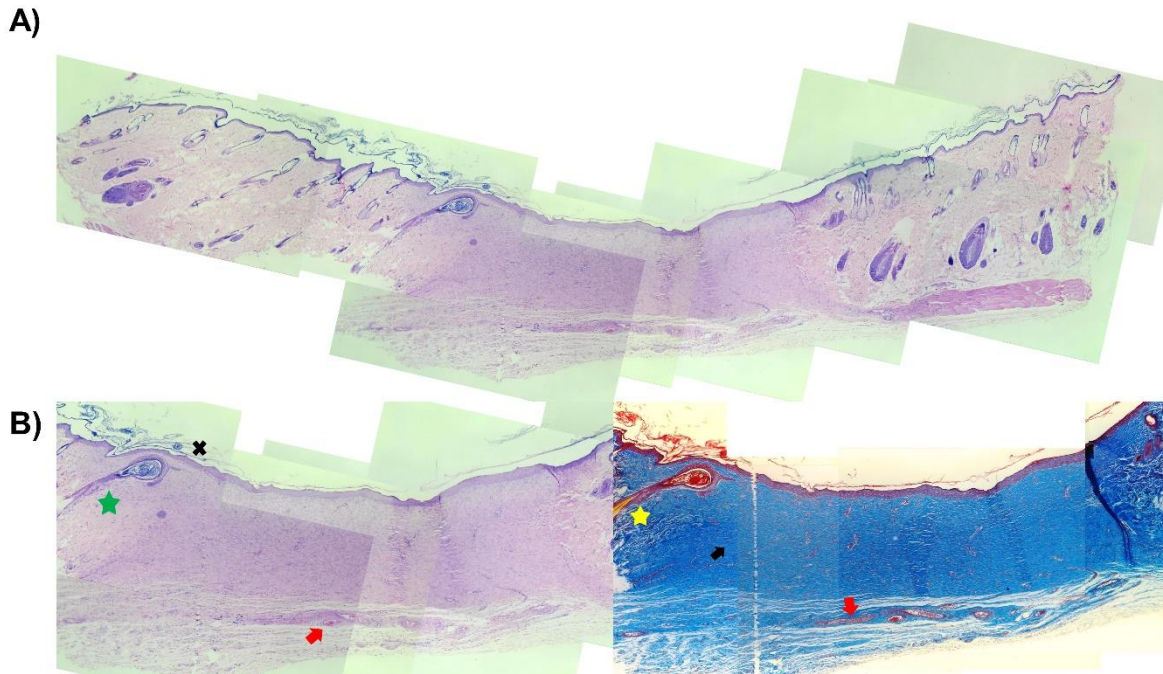
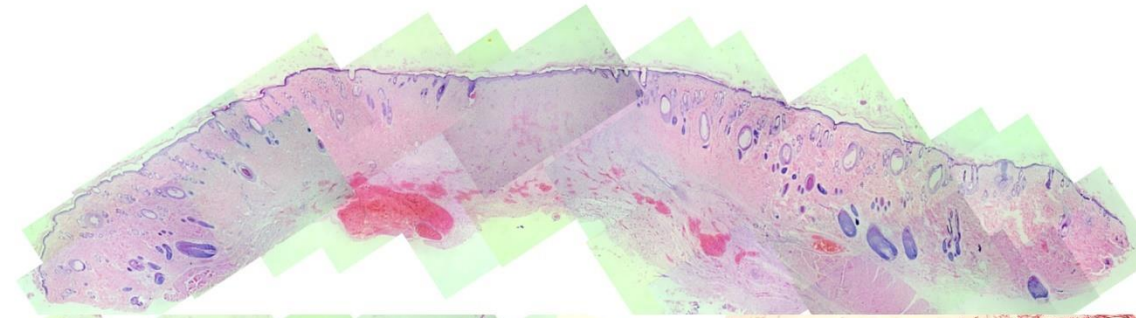


Figura 47. Corte histológico del tejido tratado con extracto acuoso con equipo Soxhlet (EAMS).

A) Reconstrucción del corte de tejido teñido con H&E a 10 x. B) Se muestra un segmento del tejido teñido con H&E y TM respectivamente a 10x. Tratamiento: 35 μ L de extracto al 4%p/v con aplicación diaria. Se identifican las siguientes estructuras: ➔ Vaso sanguíneo. ➔ Fibras de colágeno. * Queratina. ★ Folículo piloso. ★ Glándula sebácea.

En la Figura 50A se presenta el corte del tejido tratado con el extracto etanólico asistido por microondas (EEAM), la observación de las tinciones reflejó una epidermis continua y con bordes regulares, de igual manera se presenta queratina en cantidades moderadas. No hay presencia de infiltrado inflamatorio, por lo que se observa una dermis papilar y reticular remodelada. Se visualiza una presencia de vasos neoformados, folículos pilosos y glándulas sebáceas mayor al control negativo y positivo (Figura 44 y 45). La fotografía que se observa en la Figura 43B EEAM, comprueba la condición histológica final de la remodelación.

A)



B)

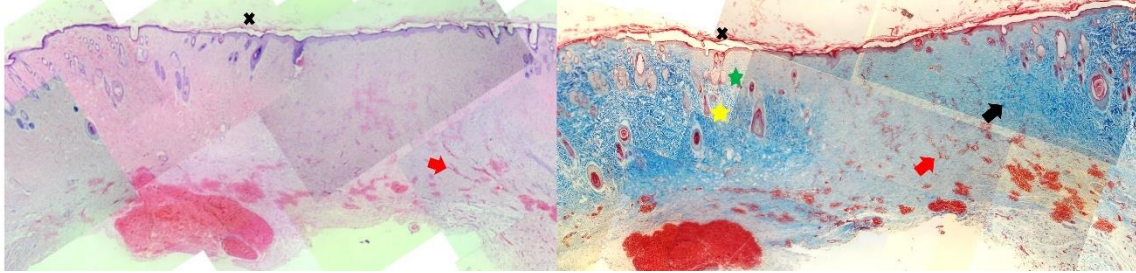


Figura 48. Corte histológico del tejido tratado con extracto etanólico asistido por microondas (EEAM).

A) Reconstrucción del corte de tejido teñido con H&E a 10 x. B) Se muestra un segmento del tejido teñido con H&E y TM respectivamente a 10x. Tratamiento: 35 μ L de extracto al 4%p/v con aplicación diaria. Se identifican las siguientes estructuras: ➔ Vaso sanguíneo. ➔ Fibras de colágeno. ★ Folículo piloso. ★ Glándula sebácea, ✱ Queratina.

Por otro lado, el corte del tejido tratado con el extracto acuoso asistido por microondas (EAAM) que se presenta en la Figura 51A, mostró mejores resultados histológicos que los controles (C- y C+) (Figura 44 y 45). De igual manera el efecto fue positivo en la cicatrización de la herida que el extracto etanólico por la misma técnica de extracción (EEAM), histológicamente se observa en la Figura 51B vasos sanguíneos precisos, fibras de colágeno recién sintetizadas y en proceso de diferenciación, además de folículos pilosos con sus respectivas glándulas sebáceas, también es importante mencionar que se mira una continuidad regular y definida de la epidermis, así como queratina presente. En lo que respecta a la dermis se observan ligeramente papilas dérmicas. Visualmente la fotografía de la herida es de una progresión efectiva versus los controles (Figura 43B EAAM).

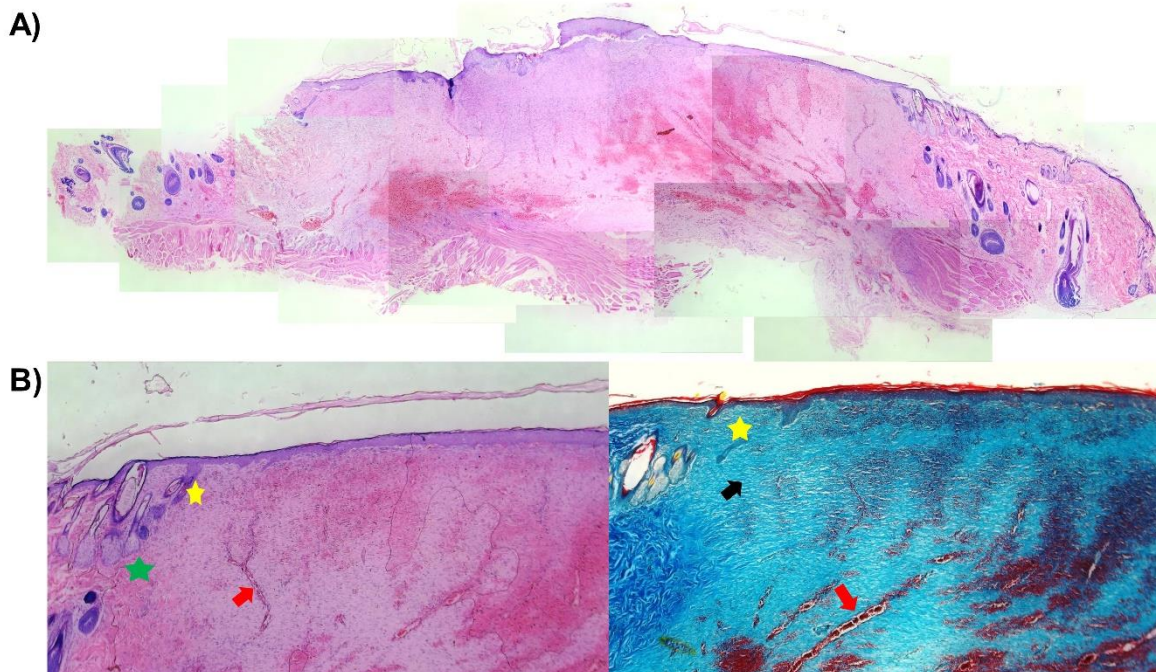


Figura 49. Corte histológico del tejido tratado con extracto acuoso asistido por microondas (EAAM).

A) Reconstrucción del corte de tejido teñido con H&E a 10 x. B) Se muestra un segmento del tejido teñido con H&E y TM respectivamente a 10x. Tratamiento: 35 μ L de extracto al 4%p/v con aplicación diaria. Se identifican las siguientes estructuras: ➔ Vaso sanguíneo. ➡ Fibras de colágeno. ★ Folículo piloso. ★ Glándula sebácea. ✱ Queratina.

La observación histológica de las tinciones de lesiones tratadas con la combinación de la membrana PVA/PLA y cada uno de los extractos evaluados arrojó lo siguiente. Respecto a la aplicación de la membrana PVA/PLA en conjunto con el extracto acuoso obtenido por método convencional (EAMC) en la herida (Figura 52), se observó histológicamente en comparación con los controles (C- y C+) (Figura 44 y 45), especialmente lo que respecta a la epidermis; se tiene una incompleta continuidad por la presencia de la costra. La presencia de queratina es en menor proporción en comparación con los controles, así mismo se observan detritus propios de los polímeros de la membrana de PVA/PLA, se observan vasos sanguíneos de pequeño calibre en fase inicial de formación; por último, no se visualizan folículos pilosos, ni glándulas sebáceas. En relación con la fotografía de la Figura 43C (MEMBRANA DE PVA/PLA + EAMC) el proceso de cicatrización se

ve con un retraso en la caída de la costra y falta de anexos cutáneos en comparación con los controles y el uso de únicamente el extracto (EAMC), sin embargo, la organización del tejido de granulación es adecuada.

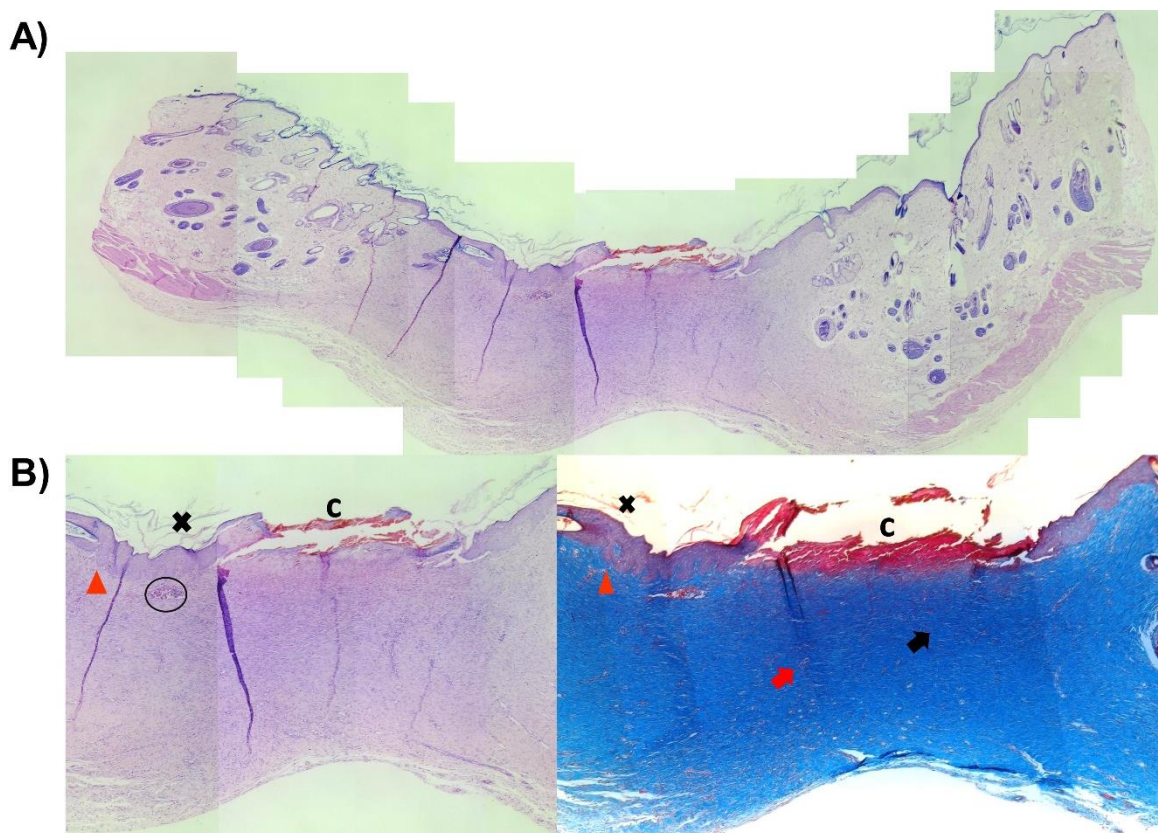


Figura 50. Corte histológico del tejido tratado con membrana de PVA/PLA más extracto acuoso por método convencional (EAMC).

A) Reconstrucción del corte de tejido teñido con H&E a 10 x. B) Se muestra un segmento del tejido teñido con H&E y TM respectivamente a 10x. Tratamiento: membrana de PVA/PLA aplicación única + 35 μ L de extracto al 4%p/v con aplicación diaria. Se identifican las siguientes estructuras: ➡ Vaso sanguíneo. ➡ Fibras de colágeno. * Queratina. O Detritus. (C) Costra. ▲ Papilas dérmicas.

Siguiendo con la combinación de membrana más extracto, se presenta en la Figura 53 las imágenes histológicas de las tinciones de la herida tratada con la combinación de la membrana PVA/PLA más el extracto etanólico obtenido con el equipo Soxhlet (EEMS), las observación determina una abundante presencia de vasos sanguíneos neoformados , presencia notable de queratina y una continuidad aceptable de la epidermis, así también, la dermis papilar se observa definida seguida por la dermis

reticular con gran cantidad de fibras de colágeno recién sintetizadas, finalmente se presentan unidades pilosebáceas. La fotografía de esta herida al día 14 como se muestra en la Figura 43C (Membrana de PVA/PLA + EEMS), presenta una costra deshidratada lo que en comparación con los controles es un progreso visualmente mejor.

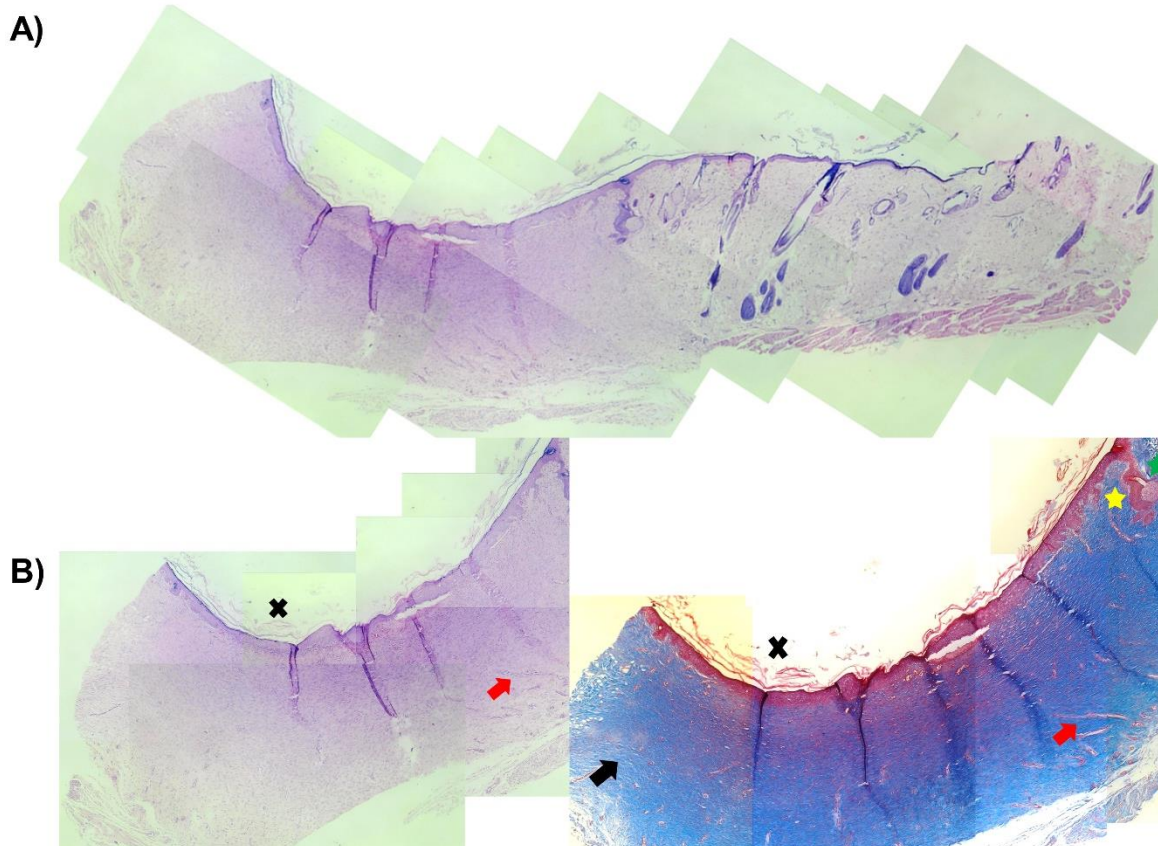


Figura 51. Corte histológico del tejido tratado con membrana de PVA/PLA más extracto etanólico con equipo Soxhlet (EEMS).

A) Reconstrucción del corte de tejido teñido con H&E a 10 x. B) Se muestra un segmento del tejido teñido con H&E y TM respectivamente a 10x. Tratamiento: membrana de PVA/PLA aplicación única + 35 μ L de extracto al 4%p/v con aplicación diaria. Se identifican las siguientes estructuras: ➔ Vaso sanguíneo. ➔ Fibras de colágeno. ✱ Queratina. ★ Folículo piloso. ★ Glándula sebácea.

La observación de la Figura 54 perteneciente al corte histológico del tejido tratado con la membrana PVA/PLA más el extracto acuoso obtenido con el equipo Soxhlet (Membrana de PVA/PLA + EAMS), arrojó la visualización de detritus poliméricos pertenecientes al PVA y PLA de la membrana, mismos que retrasan el proceso de

remodelación de la continuidad de la epidermis, a pesar de esto, se observa la presencia de un gran número de vasos sanguíneos con eritrocitos dentro de estos. Paralelamente se identificaron unidades pilosebáceas y fibras de colágeno.

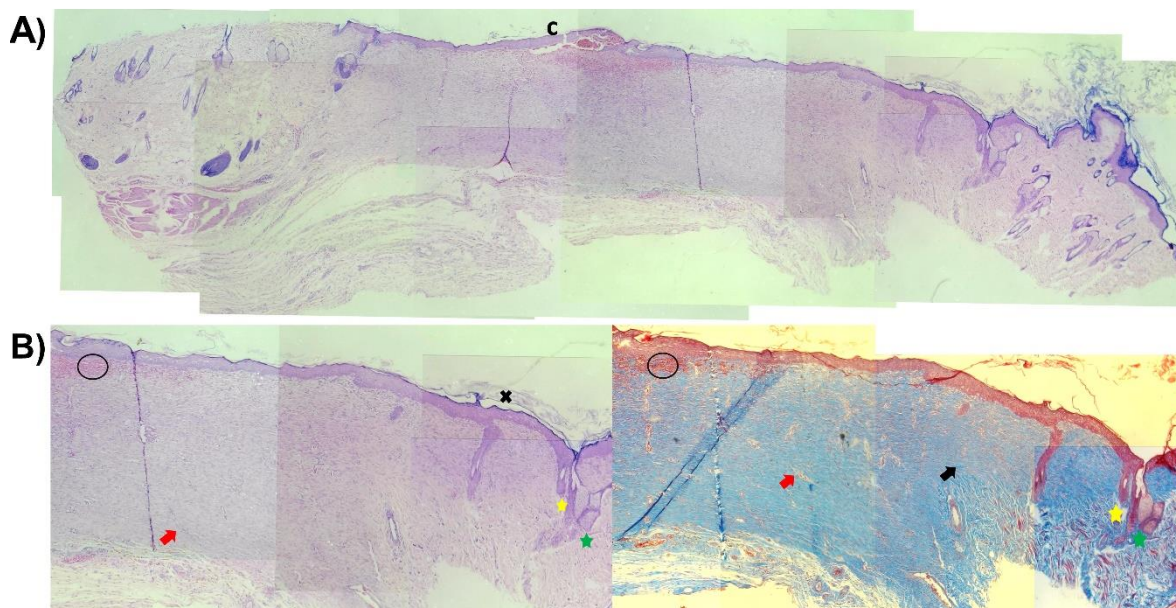


Figura 52. Corte histológico del tejido tratado con membrana de PVA/PLA más extracto acuoso con equipo Soxhlet.

A) Reconstrucción del corte de tejido teñido con H&E a 10 x. B) Se muestra un segmento del tejido teñido con H&E y TM respectivamente a 10x. Tratamiento: membrana de PVA/PLA aplicación única + 35 μ L de extracto al 4%p/v con aplicación diaria. Se identifican las siguientes estructuras: ➡ Vaso sanguíneo. ➡ Fibras de colágeno. * Queratina. ★ Folículo piloso. ★ Glándula sebácea. ▲ Papilas dérmicas. ○ Detritus.

De igual manera podemos describir la Figura 55 que es el corte histológico del tejido tratado con la membrana PVA/PLA más el extracto etanólico asistido por microondas (Membrana de PVA/PLA + EEAM), el panel B podemos apreciar una disposición de fibras de colágeno que suponen una aparición en orientación de extremos al centro, unidades pilosebáceas y una gran presencia de vasos sanguíneos recién formados, de igual forma, una moderada presencia de queratina. Sin olvidar que la remodelación de la epidermis y dermis sucedió de manera normal y completando la continuidad del tejido. La conformación estructural remodelada que se presenta en la imagen histológica se corrobora con la fotografía presente en

el panel C de la Figura 43, en la cual se puede observar una ligera tonalidad rosácea propia del tejido de granulación, sin presencia de costra y proceso inflamatorio.

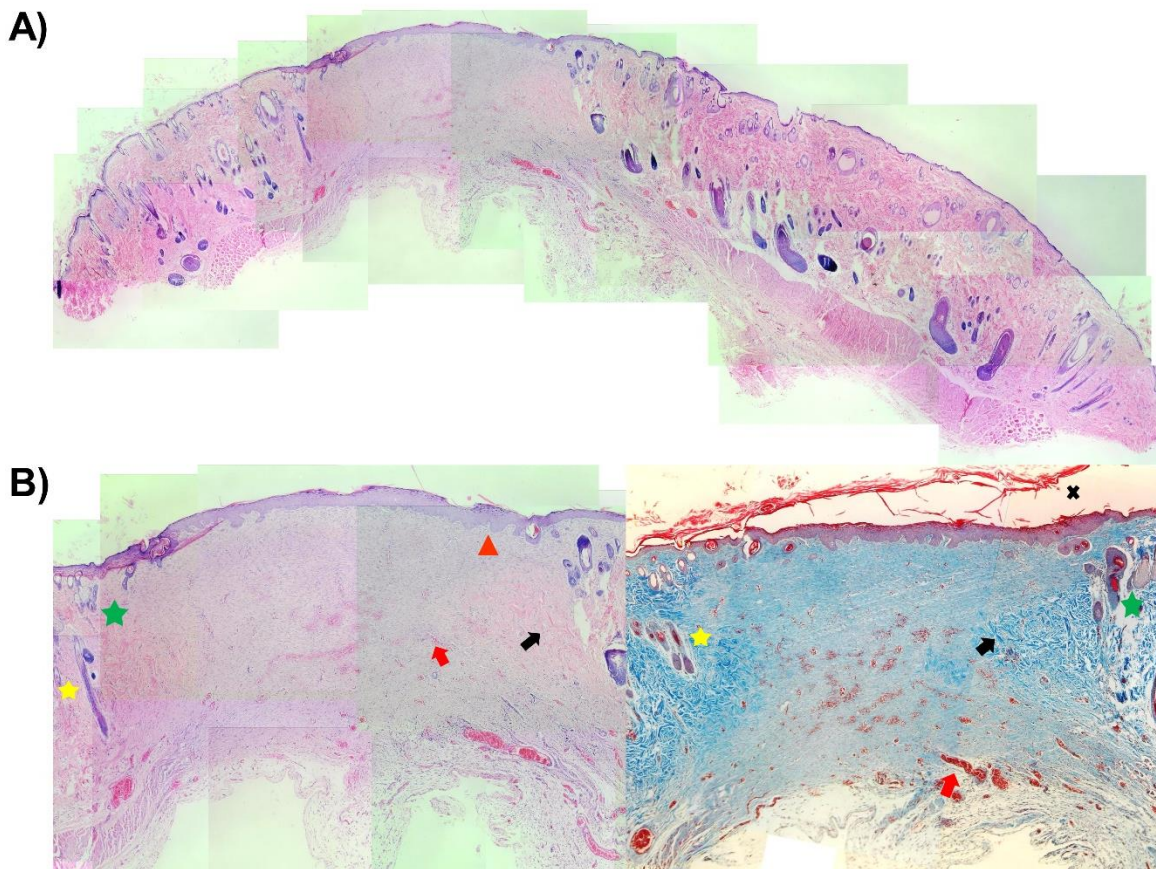


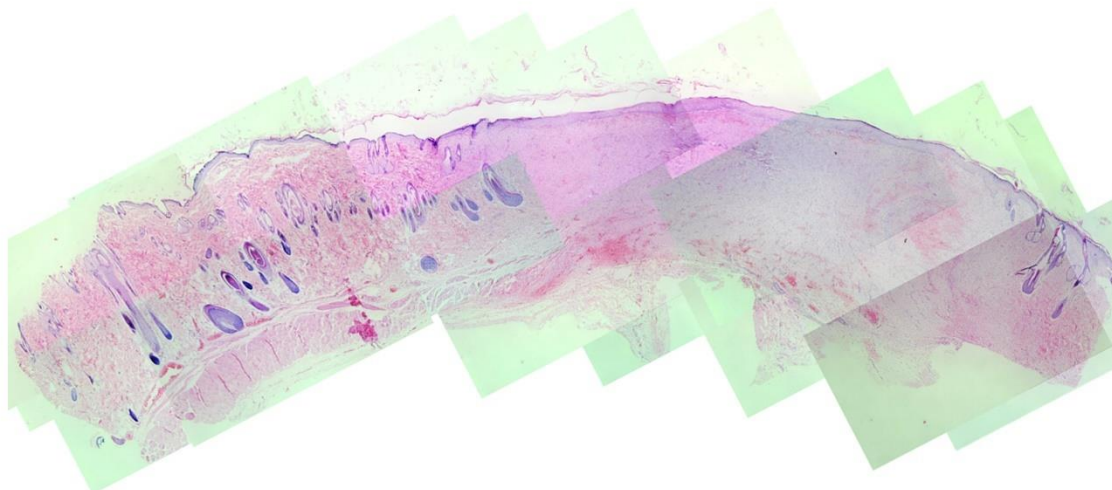
Figura 53. Corte histológico del tejido tratado con membrana de PVA/PLA más extracto etanólico asistido con microondas (EEAM).

A) Reconstrucción del corte de tejido teñido con H&E a 10 x. B) Se muestra un segmento del tejido teñido con H&E y TM respectivamente a 10x. Tratamiento: membrana de PVA/PLA aplicación única + 35 μ L del extracto al 4%p/v con aplicación diaria. Se identifican las siguientes estructuras: ➔ Vaso sanguíneo. ➡ Fibras de colágeno. * Queratina. ★ Folículo piloso. ★ Glándula sebácea.

Por último, como se analiza en la Figura 56 que corresponde al corte histológico del tejido tratado con la membrana PVA/PLA más el extracto acuoso asistido por microondas (Membrana de PVA/PLA + EAAM), las tinciones de H&E y TM resaltaron la presencia de una remodelación continua y regular de la epidermis con presencia de queratina en la superficie, el proceso de angiogénesis se confirmó

debido a la presencia de vasos sanguíneos neoformados, si bien la cantidad de folículos pilosos y glándula sebáceas no son iguales al tejido original se observa la presencia de estos.

A)



B)

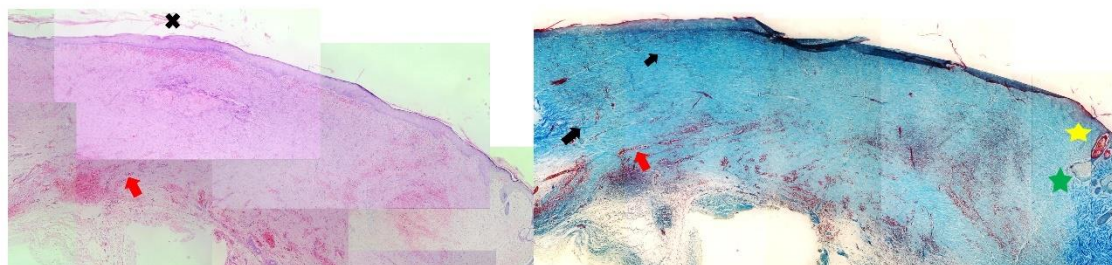


Figura 54. Corte histológico del tejido tratado con membrana de PVA/PLA más extracto acuoso asistido por microondas (EAAM).

A) Reconstrucción del corte de tejido teñido con H&E a 10 x. B) Se muestra un segmento del tejido teñido con H&E y TM respectivamente a 10x. Tratamiento: membrana de PVA/PLA aplicación única + 35 μ L del extracto al 4%p/v con aplicación diaria. Se identifican las siguientes estructuras: ➡ Vaso sanguíneo. ➡ Fibras de colágeno. * Queratina. ★ Folículo piloso. ★ Glándula sebácea.

Es importante mencionar que todos los extractos se realizaron en una concentración de 4% y se efectuó la aplicación de 35 μ L de cada uno diariamente en su respectiva herida, también se menciona que los extractos de solvente etanol fueron reconstituido en agua desionizada para su aplicación en las heridas, con esto, evitar una variable en los resultados debido al etanol.

7.8.1 Resultados de la cuantificación de fibras de colágeno.

La cuantificación de la presencia de fibras de colágeno (azul intenso) se llevó a cabo mediante el software gratuito de código abierto Orbit Image Analysis que mediante su protocolo establecido “cuantificación de tejidos” se analizaron las imágenes pertenecientes a las tinciones de Tricromico de Masson, proporcionando los siguientes resultados plasmados en la Tabla 7. Arrojando el mayor porcentaje de fibras de colágeno el extracto acuoso por método convencional (EAMC) con 72.91% por arriba de los controles.

Tabla 7. Cuantificación de fibras de colágeno.

Tratamiento	Fibras de colágeno %
Control negativo (Agua desionizada estéril).	46.21%
Control positivo (Gasa Italdermol ®).	49.71%
Membrana de PVA/PLA.	43.15%
Extracto acuoso por método convencional (EAMC).	72.91%
Extracto etanólico por método de Soxhlet (EEMS).	63.97%
Extracto acuoso por método de Soxhlet (EAMS).	66.12%
Extracto etanólico asistido por microondas (EEAM).	58.68%
Extracto acuoso asistido por microondas (EAAM).	64.80%
Membrana de PVA/PLA + EAMC	61.87%
Membrana de PVA/PLA + EEMS	50.00%
Membrana de PVA/PLA + EAMS	68.30%
Membrana de PVA/PLA + EEAM	54.09%
Membrana de PVA/PLA + EAAM	55.22%

7.9 Resultados del análisis estadístico.

Inicialmente se realizó el análisis descriptivo de la variable (área en mm²) por día de cada uno de los tratamientos y controles mediante el software estadístico IBM SPSS Statistics (IBM Corp., 2013) como se observa en la Tabla 11 del Anexo 2.

EL análisis de varianza de una vía (ANOVA) tomando como significativo un valor de $p < 0.05$, mostró diferencias significativas para los días 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 como se muestra en la Tabla 12 del Anexo 2. Paralelamente se efectuó la prueba post Hoc de Tukey; la cual mostró diferencias significativas entre las medias de las áreas de ciertos tratamientos comparados con los controles. Lo cual, esto

nos facilitó para identificar a los tratamientos que mostraron una diferencia de medias no significativa, relacionado a un efecto mejor en el proceso de cicatrización en comparación con los controles. En la Tabla 10 se muestra por columnas los subgrupos de medias iguales, formados de los resultados de la prueba Tukey. La cual nos muestra que los tratamientos EAMC, EEAM, EAAM, M+EAMS, M+ EEAM y M+EAAM presentan una media del área para el día 14 menor en comparación con los controles (C- y C+), coincidiendo este resultado con los análisis histológicos y morfológicos de las heridas. Es importante aclarar que la prueba Tukey no arrojó como significativo ($p < 0.05$) la comparación de medias entre tratamientos que presentaron una similitud o menor diferencia de medias, sin embargo, esto reafirma que los tratamientos antes mencionados presentan una mejor eficacia siendo las medias de los tratamientos menor que los controles utilizados (Tabla 10).

Tabla 8. Conjunto de datos homogéneos.

DIA 14			
HSD Tukey ^a			
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
EAMC	2	0.000000	
EEAM	2	0.000000	
EAAM	2	0.000000	
M+EAMS	2	0.248500	
M+EEAM	2	0.278000	
M+EAAM	2	0.555000	
Control Positivo	2	1.409000	
M+EEMS	2	1.536000	
M+EAMC	2	1.683000	
Control Negativo	2	2.286500	
EAMS	2	3.532500	
EEMS	2		9.599000
Membrana	2		11.679500
Sig.		0.137	0.734

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2.000. Las cifras en negritas representan la media de área de la herida según el tratamiento que son menores a los controles o incluso tienen un valor igual a cero.

La comparación de la distribución de las medias de cada grupo (tratamiento) respecto a los controles nos demuestra que; los tratamientos EAMC, EEAM, EAAM, M+EAMS, M+EEAM y M+EAAM se posicionaron con valores de su media por debajo de los valores del control negativo y positivo (Figura 59).

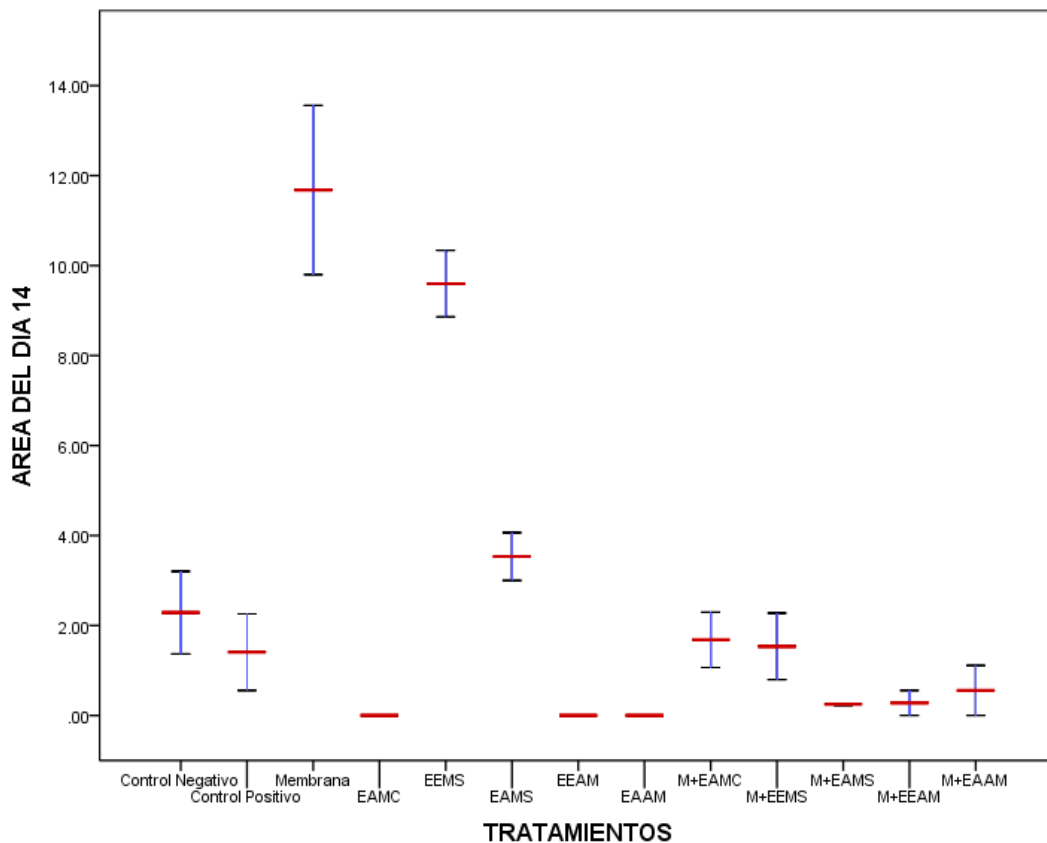


Figura 57. Gráfico de medias en el día 14.

Se observa la distribución de las medias de área en mm² de la herida en el día 14 para cada tratamiento y controles. Membrana: membrana de PVA/PLA, EAMC: Extracto acuoso por método convencional, EEMS: Extracto etanólico con equipo Soxhlet, EAMS: Extracto acuoso con equipo Soxhlet, EEAM: Extracto etanólico asistido por microondas y EAAM: Extracto acuoso asistido por microondas.

8 Discusión.

El proceso de cicatrización de heridas es complejo y están involucrados múltiples eventos celulares, fisiológicos y bioquímicos que trabajan de manera sincrónica para finalizar con éxito la reparación del tejido lesionado. En condiciones fisiológicas y en un individuo sano este proceso transcurre eficientemente; sin embargo, ocurren alteraciones por factores internos y/o externos del organismo que modifican su duración y evolución, ocasionando alteraciones en el proceso de cicatrización (Brunicardi et al., 2011). Cuando la reparación del tejido va erróneamente en alguna fase origina dos posibles resultados, ya sea la presencia final de una cicatriz queloide o la evolución a una herida crónica, misma que puede empeorar y llegar a amputaciones o en condiciones desfavorables la muerte.

Las heridas sin importar la causa repercuten negativamente en el desempeño físico, estado emocional y principalmente se ve afectado el estado económico del paciente y del sistema de salud por los costos que se originen para su adecuado tratamiento. En México, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de la edición del 2018 se menciona que los accidentes son la causa primordial de discapacidad, alrededor de 6.9 millones de personas sufrieron una lesión accidental no fatal lo que repercute en la generación de altos gastos para el sistema de salud y para las familias, lo que equivale en un costo mensual del 1.8 y 3.5 % de producto interno bruto en términos monetarios es aproximadamente 13,690,000.00 MXN (INEGI & Instituto Nacional de Salud Pública, 2018). Asimismo, existen pocos estudios sobre epidemiología de heridas y los costos que se generan en México; sin embargo, Vela y colaboradores en 2018 afirman en su estudio que un 66.2% de las lesiones afectan a las extremidades inferiores lo que inhabilita la capacidad motriz de las personas, repercutiendo en su desarrollo laboral y personal. Por otra parte, en cuanto al gasto mensual que el sector salud generó en 2018 por la intervención de heridas agudas y crónicas es de 17,520,599.65 MXN en el área ambulatoria y de 389,975,080 en el área hospitalaria (Vela et al., 2018).

Tomando en consideración los anteriores aspectos la comunidad de científicos se han inclinado a la indagación e implementación de nuevas alternativas de productos

que ayuden a la cicatrización de las heridas, esto mediante pruebas ya sea *in vitro* y/o *in vivo*. Con base en estudios, se sabe que las plantas son reconocidas ampliamente en la medicina tradicional y en civilizaciones antiguas como una fuente de principios activos, frente a distintos patógenos, células, padecimientos, etc. Se han estudiado y reportado como una fuente de agentes terapéuticos debido a los beneficios que han demostrado tener en múltiples afecciones (Budovsky et al., 2015; Voudouri & Tesseromati, 2013).

Especialmente en la cicatrización de heridas, se ha visto que los compuestos químicos que se han identificado en las plantas, en especial la *Calendula officinalis* L. actúan en una o más etapas de dicho proceso, estos metabolitos pertenecen a las familias de los taninos, flavonoides, saponinas, triterpenos, alcaloides entre otros (Butnariu & Coradini, 2012; Kishimoto et al., 2005; Lastra Valdés & Piquet García, 1999; B. P. Muley et al., 2009). En lo particular Ghosh y Gaba analizaron propiedades en la cicatrización de compuestos vegetales, incluidos los flavonoides, quinonas, ácidos fenólicos, fenilpropanoides, terpenoides, taninos y azúcares, demostrando que los efectos primordiales de estos compuestos activos de las plantas están relacionados con su actividad antimicrobiana, propiedades antioxidantes y su capacidad para mejorar la proliferación celular, la producción de colágeno y la síntesis de ADN (Ghosh & Gaba, 2013).

Actualmente, en la ingeniería tisular se ha empleado el estudio de los biopolímeros y la fabricación de andamios dirigidos a la regeneración tisular, que ha permitido la creación de un área de investigación basada en el uso de las propiedades cicatrizantes de las plantas en sinergia con andamios creados con biomateriales existentes en el ámbito biomédico, se ha descrito en una revisión anterior que los andamios son biocompatibles y de naturaleza biodegradable que actúan como un material de apósito para la cicatrización de heridas; además, desempeñan un papel esencial brindando una base que permite el suministro de diversos factores asociados a la supervivencia, proliferación y diferenciación celular (Chaudhari et al., 2016).

Debido a lo anteriormente descrito, en este estudio se evaluó el efecto cicatrizante de los extractos acuosos y etanólicos de flores de la planta *Calendula officinalis* L.

perteneciente a la familia Asteraceae, obtenidos mediante tres técnicas: extracción con el método convencional, extracción con equipo Soxhlet y extracción asistida por microondas (MAE). Hoy en día, esta planta se cataloga como planta medicinal y reconocida por la Agencia Europea de Medicamentos (por sus siglas en inglés EMA), también por la Cooperativa Científica Europea sobre Fitoterapia (ESCOP) y la Organización Mundial de la Salud (WHO); todas estas instituciones incluyen a la *C. officinalis* L. dentro de sus monografías, indicando su uso en el tratamiento de heridas en piel. (ESCOP, 2019; European Medicines Agency, 2018; World Health Organization, 2010).

Por lo tanto, primero se realizó la obtención de los extractos acuosos y etanólicos de flores de *C. officinalis* L. mediante las tres técnicas mencionadas anteriormente; a pesar de que el objetivo no fue comparar las extracciones es importante mencionar que presentan ventajas y desventajas cada una de las respectivas técnicas.

La técnica de extracción por Soxhlet si bien es una técnica química estandarizada requirió de mínimo 3 a 4 horas, mismo tiempo en el cual la extracción resultante está en constante calentamiento lo cual podría alterar la composición de los compuestos químicos sensibles a altas temperaturas y esto, repercutir en el efecto de los extractos en la progresión de la cicatrización. De igual modo, los requerimientos de cantidad de solvente y material vegetal son de mayor cantidad y el rendimiento es menor. Esta idea coincide con lo encontrado en un estudio actual; en el cual, compararon tres tipos de extractos etanólicos de flor de *C. officinalis* L., extracción con solvente en agitación (1:10), extracción asistida por ultrasonido y extracción con equipo Soxhlet (10% p/v), posterior a una identificación y análisis de carotenoides , concluyeron que la técnica en Soxhlet no es adecuada por la descomposición de compuestos termosensibles, ya que la cantidad de compuestos (carotenoides) en la extracción fue muy baja en comparación con las demás técnicas (Rojas Bedoya et al., 2020).

En lo que respecta a la extracción asistida por microondas (MAE), fue una de las técnicas más rápidas y prácticas de realizar, la cantidad de material vegetal y

solvente utilizado fue mucho menor; así bien, en términos de ahorro de material y productividad por la reducción del tiempo empleado en comparación con la técnica de Soxhlet, se puede decir que esta técnica es mucho mejor. Diversos estudios concuerdan con las ventajas como, reducción de tiempo, calentamiento rápido, menor volumen de disolvente; sin embargo la eficacia de MAE depende en mayor parte de las condiciones de operación y los parámetros que afectan los mecanismos de extracción y el rendimiento (A. Guntero et al., 2017).

Y finalmente el método convencional es similar a una infusión; suele ser la técnica de extracción sólido-líquido más utilizada por la comunidad en general para utilizar las plantas medicinales, no requiere de equipo sofisticado pero si es de importancia la temperatura y el tiempo de contacto entre el material vegetal y el solvente; pero en definitiva, el tiempo empleado es menor en comparación con la técnica con Soxhlet; como se comenta en diversos estudios comparativos de las diferentes técnicas de extracción es muy adecuada en términos de rapidez, economía y practicidad (Ghosh & Gaba, 2013). Es bien sabido que temperaturas más altas a veces aceleran el proceso de extracción por infusión y generalmente cuanto más alta es la temperatura, más rápido y completo es el proceso y más alta es la concentración del extracto. El aumento de velocidad se debe, entre otras cosas, a una menor viscosidad cuando se usa un solvente líquido; aunque, este aumento de temperatura podría producir el deterioro químico del producto; en otras palabras, para cualquier producto dado, existe una temperatura o rango de temperatura óptima (Chang-Diaz, 1989).

Los estudios sobre flavonoides por espectroscopia han revelado que la mayoría de estos compuestos exhiben dos bandas de absorción principales: la banda I (320–385 nm) representa la absorción del anillo B, mientras que la banda II (250–285 nm) corresponde a la absorción del anillo A (S. Kumar & Pandey, 2013; Yao et al., 2004). Los extractos EAMC, EEMS y EAMS analizados, mostraron en sus espectros UV-VIS dos bandas de absorción, una menor a 300 nm de longitud de onda que es característica del anillo aromático A de los flavonoides mejor conocida como banda

II y otra mayor a 300 nm que se presenta para el anillo aromático B igual conocida como banda I para los flavonoides; sin embargo, la amplitud y longitud de las ondas varían entre estos extractos; por lo cual, existen una amplia variedad dentro de la familia de flavonoides que pueden estar en cada uno de los extractos de manera específica. Para el caso de los espectros UV-VIS de los extractos EEAM y EAAM se observaron un mayor número de picos de absorción en comparación con los demás extractos, esto sugiere la presencia de mayor cantidad de compuestos extraídos debido posiblemente a la técnica asistida por microondas ya que los solventes utilizados (agua desionizada estéril y etanol) fueron los mismos en las demás extracciones y como se comenta en un estudio; utilizando la técnica de MAE se logra un mayor rendimiento de extracción en un menor tiempo, sin olvidar que ha sido una técnica revolucionaria e innovadora (A. Guntero et al., 2017; Chaturvedi, 2018; Xiong et al., 2016). La presencia de ácidos fenólicos concuerda con un estudio en el cual analizaron un extracto etanólico de flores de *C. officinalis* L. al 2.5% p/v encontrando ondas de absorción antes de los 350 nm, confirmando la presencia de compuesto fenólicos (Pérez, 2014), por otro lado un análisis más completo mediante HPLC reveló la presencia de compuestos como catequina, ácido gálico a 280 nm, resveratrol a 303 nm, ácido ferúlico, ácido cafeico y ácido clorogénico a 330 nm y quercetina y rutina a 360 nm de un macerado acuoso al 10% de flores de *Calendula officinalis* L. (Blaga, 2017). Rosas y colaboradores demostraron mediante TLC y HPLC la presencia de compuestos fenólicos como: ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido cafeico, ácido gálico, vainillina, catequina, quercetina y rutina, siendo éste último el más abundante (Hernández-Rosas et al., 2018).

Diferentes investigaciones han publicado sobre el potencial antioxidante de *C. officinalis* L., por ejemplo, el extracto hidroalcohólico al 10% p/v de flor de *C. officinalis* demostró reducir *in vitro* el radical DPPH dependiente de la dosis (Fonseca et al., 2010). Los extractos de metanol y acetato de etilo de flores presentaron una actividad de eliminación de radicales DPPH aceptable (Ercetin et al., 2012). Sin embargo, en nuestro estudio, el extracto acuoso de flores de *C. officinalis* L. por método convencional (125.2 ± 32.7 %) mostró el porcentaje

más alto de captación del radical DPPH (Tabla 5), sin embargo, los valores no fueron diferentes estadísticamente en comparación con los demás extractos. La propiedad de eliminar radicales de los extractos usualmente está relacionada con la presencia de los antioxidantes y dependiendo de la solubilidad se presentan o no en los extractos. Como tal, se ha demostrado que la rutina, la nicotiflorina y la isoquercitrina, se presentan en concentraciones más altas en la flor de *C. officinalis* L. eliminan los radicales libres (Preethi et al., 2006). Por otra parte, Petkova et al., anunció la presencia de las propiedades antioxidantes de una infusión y decocción de flores de *C. officinalis* L. analizado mediante distintos métodos químicos (DPPH, ABTS, FRAP y CUPRAC), describiendo que los extractos acuosos exhibieron una eficacia moderada (PETKOVA et al., 2020). Otro estudio encontró una actividad antioxidante significativa de una hidrodestilación al 20% p/v asistida por microondas de flores de *C. officinalis* L. a través de ensayos ABTS y DPPH (Ourabia et al., 2019). Pires y colaboradores determinaron al extracto hidroalcohólico de flores de *C. officinalis* L. al 3.33% p/v con capacidad antioxidante superior a infusiones al 1% p/v (Pires et al., 2018). Asimismo, en 2018 el análisis de un extracto etanólico (70%) al 5% p/v de flores liofilizadas de *Calendula officinalis* L. arrojó un porcentaje de 81.12 ± 2.09 de captación del radical DPPH (Hernández-Rosas et al., 2018), una cifra menor en comparación a lo encontrado en este estudio. Estos hallazgos podrían sugerir que los solventes alcohólicos son útiles para la preparación de nuevos productos de *Calendula officinalis* L. con la intención de aumentar la propiedad antioxidante de los compuestos; además, nuestro estudio aportó que los extractos acuosos y etanólicos al 4% p/v tienden a presentar el porcentaje similar pudiendo competir entre ellos. Cabe mencionar que el rol primordial de los oxidantes en la aparición, progresión y exacerbación de enfermedades humanas ha propiciado que la determinación e identificación de antioxidantes sea crucial para el desarrollo de nuevos fármacos. En cierto modo, la capacidad de una molécula para exhibir un antioxidante, así como para interactuar con otras vías biológicas es una estrategia terapéutica atractiva. La diferencia de nuestros resultados de capacidad antioxidante en comparación con los demás estudios podría deberse al tipo y polaridad de los disolventes extractores utilizados en este trabajo, así como

variabilidad por la utilización de diferentes técnicas de extracción. En efecto, como se informa la polaridad del solvente juega un papel clave en las actividades biológicas atacando en la solubilidad de los compuestos objetivo (Ourabia et al., 2019).

En lo que respecta al contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), el valor más alto lo obtuvo el extracto EEAM, seguido por EAMC, EAAM, EEMS y finalmente EAMS. Un estudio previo informó que el extracto de metanol de la flor de *Calendula officinalis* L. poseía el mayor contenido de fenólicos en comparación con las hojas (Ercetin et al., 2012). Se menciona, con base en los resultados que la extracción de compuestos fenólicos de *Calendula officinalis* L. está influenciada por el solvente utilizado y también influye el mecanismo de extracción. Se ha observado que, a mayor polaridad del disolvente de extracción, mayor cantidad de compuestos fenólicos extraídos (Gamez-Meza et al., 1999). Por último, el análisis de una variedad llamada Plamen de *Calendula officinalis* L. demostró un valor de CFT en el análisis del extracto etanólico de 1.49mg EAG/ml (Butnariu & Coradini, 2012), un valor menor al obtenido en este estudio. Distintos son los autores que mencionan sobre diferentes niveles de compuestos totales en las diferentes partes de *C. officinalis* L. (Bekdeşer, 2019; Escher et al., 2019). Las variaciones de CFT entre artículos podría deberse por la variación de factores climáticos, geográficos y genéticos, pero en términos básicos *Calendula officinalis* L. se considera una materia prima potencial para componentes bioactivos (Ak et al., 2020; Ercetin et al., 2012; Ourabia et al., 2019; Rojas Bedoya et al., 2020).

Los análisis mediante SEM de la membrana de PVA/ PLA demostraron la organización de fibras de distintos diámetros entrecruzadas, las cuales formaron la estructura total de un andamio que podría actuar como soporte estructural para la proliferación, adhesión de los fibroblastos, mimetizando la MEC y el intercambio de nutrientes. Sustentando lo anterior, existe información sobre el enfoque novedoso que es la síntesis de PLA recubierta con PVA como un andamio que ayuda en la proliferación de osteoblastos (Abdal-Hay et al., 2015). Además, un estudio reveló la

utilización del electrohilado para crear fibras coaxiales a partir de los polímeros PLA y PVA, aunque, a diferencia de nuestro estudio estos andamios se probaron en la recuperación de tejido óseo alveolar siendo exitosos, además demostraron que presenta los beneficios hidrofílicos del PVA y las atractivas propiedades biológicas del PLA. (Alharbi et al., 2018; da Silva et al., 2019). Igualmente, las nano fibras electrohiladas se han propuesto y estudiado como posibles andamios para la ingeniería de tejidos debido a que presentan la posibilidad de mimetizar la estructura y funciones de la MEC, teniendo en cuenta la morfología y distribución de las fibras (Xue et al., 2017). La estructura de entramado de la membrana obtenida en este estudio se asemeja a lo elaborado por Narayanan y colaboradores, ellos fabricaron nanofibras electrohiladas con PVA y grafeno (GRGO) mismas que obtuvieron resultados positivas en pruebas de biocompatibilidad, viabilidad y proliferación de fibroblastos (Narayanan et al., 2020). En general, las nanofibras electrohiladas presentan muchas de las propiedades deseables de un apósito para heridas efectivo, como la protección contra estímulos mecánicos y la disposición de un excelente intercambio gaseoso, por lo que en definitiva es esencial investigar y optimizarlas.

Las pruebas de adherencia plaquetaria realizadas a la membrana de PLA y a fragmentos de polímero (PVA y PLA) demostraron la adhesión y aglomeración de estructuras, es apresurado afirmar que estas estructuras son plaquetas, ya que, sería necesario una identificación con base en su tamaño y morfología. Podemos sugerir a partir de estudios que los polímeros utilizados permiten la adherencia de células, por ejemplo: se observaron propiedades de adhesión y proliferación de las células MC3T3-E1 en andamios compuestos de PLA y PVA (Abdal-Hay et al., 2015). Por su parte, Hernández y colaboradores encontraron la biocompatibilidad más alta entre un andamio de PVA con alginato de sodio electrohilado y fibroblastos gingivales humanos; además, observaron un crecimiento celular en la superficie del andamio (Hernández et al., 2020). Con base en esto podemos sustentar que la membrana permitió la adhesión de células fibroblásticas, endoteliales y permitió su correcta proliferación y organización en el tejido por remodelarse, mismo que se ve

reflejado a nivel histológico en una remodelación organizada y una mayor visualización de vasos neoformados.

Con base en el experimento *in vivo* con los biomodelos, mismo que fue clave para determinar el efecto de cada uno de los extractos con la membrana de PVA/PLA. Catorce días después del tratamiento con los extractos, membrana de PVA/PLA y membrana de PVA/PLA más extractos, se realizó el análisis macroscópico de la heridas y su evolución durante este periodo de tiempo, el cual se demostró visualmente un mejor progreso con ayuda del extracto acuoso por método convencional (EAMC), extracto etanólico y acuoso asistido por microondas (EEAM y EAAM) ya que el tejido mostró una optimización en el resultado final de la cicatrización que los propios controles, esto se sustenta en lo que diversos estudios mencionan respecto a los componentes presentes en la *Calendula officinalis* L.; mencionando que las propiedades terapéuticas de *Calendula officinalis* L. se atribuyen a la presencia de una gran variedad de sustancias biológicamente activas como terpenoides, flavonoides, carotenoides, aceites volátiles, quinonas y aminoácidos (B. Muley et al., 2009), mismas que se ven implicadas en potenciar la granulación y epitelización de la piel dañada, además de estimular la síntesis de glucoproteínas y colágeno; y de igual modo, estimulan la angiogénesis en el tejido dañado (López Luengo, 2003). Otros estudios también señalaron que el tratamiento tópico de heridas con *Calendula officinalis* L. lleva a una reepitelización más rápida y un aumento de la proliferación y migración celular (Fronza et al., 2009; Preethi et al., 2006).

Si bien dentro de los objetivos de este trabajo no fue determinar qué técnica es la más optima, es relevante mencionar que la extracción asistida por microondas (MAE) y la extracción por método convencional produjeron extractos tanto etanólicos y acuoso que mostraron histológicamente una cicatrización adecuada en comparación con el control negativo, y son competitivos ante los resultados que proporcionó el tratamiento del control positivo (Gasa Italdermol®).

Por otra parte, el uso de la membrana de PVA/PLA por si sola, no potencio la velocidad de cicatrización ya que aun en el día 14 (Figura 43A) se observa la

presencia de una costra, sin embargo, en la imagen histológica la capa dérmica se remodeló satisfactoriamente, la presencia de una angiogénesis abundante es relevante en comparación con el control positivo (Gasa Italdermol), no existe un proceso inflamatorio agravado que pudiera deberse a los polímeros que conforman la membrana, los detritus observados se puede justificar como parte de los mecanismos de eliminación de residuos ajenos o propios del tejido. La organización de las capas dérmicas y epidérmicas no están alteradas ni obstruidas por la misma membrana, a excepción de la zona donde se ubica la costra, lo que plantea que la membrana ayuda en el proceso de una organización para la proliferación celular y de fibras de colágeno, pero no favorece en la rapidez del proceso. Este resultado coincide con lo reportado por Xue y colaboradores, quienes mencionan que para una adecuada migración, alineación celular y organización de la MEC es necesario las nanofibras alineadas uniaxialmente, lo cual coincide con la manera de organización de la nanofibras obtenidas en este proyecto (Xue et al., 2017). Así mismo, las nanofibras híbridas electrohiladas 50/50 PCL / PLA con timol un compuesto fenólico extraído del aceite de tomillo, tuvieron un notable porcentaje de cierre de heridas de aproximadamente el 92,5% después de un período de 14 días (Karami et al., 2013). Romero y colaboradores evaluaron membranas de PVA y PLA con porcentajes y metodología similar, como única diferencia estos autores añadieron un extracto acuoso de *Ipomoea pauciflora*, obteniendo un efecto significativo en la cicatrización de heridas haciendo uso de la membrana. (Romero, 2018).

La concentración del extracto de *Calendula officinalis* L. utilizada en un estudio en 2018 fue de 2% v/v en conjunto con una nanofibra electrohilada, pero utilizando el polímero PCL al 10% además de otros componentes, el andamio realizado lo evaluaron *in vitro* en pruebas de adhesión e infiltración de células L929, obteniendo, que este andamio con la adición de *Calendula officinalis* L. es funcional y presentó diferencias significativas respecto a sus controles (Pedram Rad et al., 2019), lo que apoya aún más los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Se comprobó mediante la observación histológica que la combinación de la membrana con los diferentes extractos (EAMS, EEAM y EAMC) origina una

cicatrización a nivel histológica aceptable, y puede competir con los controles. Por su parte la membrana de PVA/PLA da una base inicial para la organización correcta de las células y anexos para finalmente eliminarse satisfactoriamente en la mayoría de las heridas. En lo que respecta a los extractos EAMS, EEAM y EAAM el resultado se vio reflejado en tanto su uso individual como en sinergia con la membrana de PVA/PLA.

La recuperación de la organización de las fibras de colágeno es esencial en el área lesionada durante la curación, en el proceso de reparación, la síntesis de moléculas (proteoglicanos, ácido hialurónico, colágeno etc.) y enzimas como las MMP son esenciales para la recuperación de la morfología. Por lo tanto, una forma de evaluar la actividad curativa de los medicamentos o extractos de plantas es estudiar su influencia en la síntesis de componentes de MEC (Houghton et al., 2005) En este estudio se realizó una cuantificación aproximada de la presencia de fibras de colágeno tipo I, el extracto EAMC obtuvo el mayor porcentaje (72.91%) muy por arriba de los controles coincidiendo con los resultados histológicos en donde se aprecia una restauración completa de la epidermis y dermis, además la imagen de la evolución de la herida externamente (Figura 44B) demuestra el efecto procicatrizante. Sin embargo, se necesitarían estudios más específicos y elaborado para la determinación exacta del colágeno.

El aporte tecnológico es de suma importancia para la investigación, y en este trabajo se implementó un equipo de electrohilado diseñado y elaborado en México por alumnos de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, teniendo un motivo importante para el reconocimiento de la tecnología en México. Compartimos la idea sobre la necesidad de revalorar la utilización de las plantas medicinales, ya que, según estimaciones del 80 al 85 % de la población mundial utiliza entre 40.000 a 70.000 especies para la atención primaria de su salud, además las plantas son una fuente de un número elevado de sustancias químicas puras extraídas utilizadas en medicina (Wilson & Peter, 1989); sin embargo, es indispensable validar científicamente sus propiedades y realizar más estudios. Por igual es importante, la

fusión del conocimiento de la medicina tradicional avalada científicamente con la tecnología actualmente al alcance, reconocemos que aún faltan muchos logros en este ámbito de la regeneración tisular, sin embargo, no estamos lejos de lograr grandes avances que mejoren sobre todo la calidad de vida de las personas y aprovechamiento sustentable de la biodiversidad natural de la mano con el avance científico y tecnológico.

9 Conclusiones.

Se obtuvieron cinco extractos al 4% p/v, tres extractos acuosos y dos extractos etanólicos empleando tres técnicas distintas a partir de flores de *Calendula officinalis* L., los cuales se nombraron como: extracto acuoso por método convencional (EAMC), extracto etanólico con equipo Soxhlet (EEMS), extracto etanólico con equipo Soxhlet (EAMS), extracto etanólico asistido por microondas (EEAM) y extracto acuoso asistido por microondas (EAAM).

El análisis mediante espectrofotometría UV/Vis demostró la presencia de compuesto fenólicos en especial la familia de flavonoides en todos los extractos evaluados.

Respecto a la cuantificación de la capacidad antioxidante no se mostraron diferencias significativas entre los extractos, sin embargo, el que mostró la mayor capacidad antioxidante fue el extracto acuoso por método convencional (EAMC) con un porcentaje de 125.2 ± 32.4 .

La cuantificación de compuestos fenólicos totales arrojó que el extracto etanólico asistido por microondas (EEAM) presentó la mayor concentración de compuestos fenólicos totales ($5.38 \pm .89$ mg equivalentes de ácido gálico (EAG) /1 ml de extracto).

Se elaboraron membranas electrohiladas de PVA/PLA las cuales mostraron mediante SEM la morfología de filamentos entramados, además, la prueba de adherencia plaquetaria demostró la capacidad de la superficie de la nanofibra para la adherencia y aglomeración de estructuras plaquetarias.

El análisis estadístico del progreso de la cicatrización *in vivo* en ratas Wistar reveló que los extractos EAMC, EEAM y EAAM incrementaron la velocidad de cicatrización y optimizan el resultado final.

El uso de la membrana de PVA/PLA por sí sola no incrementó la velocidad del proceso de cicatrización, sin embargo, se observó histológicamente un aumento de la angiogénesis.

Los análisis estadísticos demostraron que el EAMC, EEAM y EAAM manifestaron valores de medias menores que los controles, proporcionando una optimización del proceso de cicatrización.

Y finalmente contestando la pregunta central de esta investigación, los análisis estadísticos, histológicos y morfológicos demostraron que los tratamientos M+EAMS, M+EEAM y M+EAAM optimizaron la velocidad del proceso de cicatrización y el resultado final del cierre de la herida.

10 Bibliografía.

- A. Guntero, V., M. Mancini, P., & N. Kneeteman, M. (2017). Introducing Organic Chemistry Students to the Extraction of Natural Products Found in Vegetal Species. *World Journal of Chemical Education*, 5(4), 142–147. <https://doi.org/10.12691/wjce-5-4-5>
- Abdal-Hay, A., Makhoulouf, A. S. H., & Vanegas, P. (2015). A Novel Approach for Facile Synthesis of Biocompatible PVA-Coated PLA Nanofibers as Composite Membrane Scaffolds for Enhanced Osteoblast Proliferation. In *Handbook of Nanoceramic and Nanocomposite Coatings and Materials*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799947-0.00004-3>
- Acosta De La Luz, L., Rodríguez Ferradá, C., & Sánchez Govín, E. (2001). Instructivo técnico de Calendula officinalis. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 6(1), 23–27.
- Agudelo Londoño, C. Y. (2011). *Aprovechamiento agroindustrial de la calendula (Calendula officinalis) mediante la producción de un gel desinflamatorio a partir de celulosa*. [Universidad de San Buenaventura]. <https://doi.org/10.16194/j.cnki.31-1059/g4.2011.07.016>

- Ak, G., Zengin, G., Sinan, K. I., Mahomoodally, M. F., Picot-Allain, M. C. N., Cakir, O., Bensari, S., Yilmaz, M. A., Gallo, M., & Montesano, D. (2020). A comparative bio-evaluation and chemical profiles of *Calendula officinalis* L. extracts prepared via different extraction techniques. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(17). <https://doi.org/10.3390/app10175920>
- Alharbi, H. F., Luqman, M., Fouad, H., Khalil, K. A., & Alharthi, N. H. (2018). Viscoelastic behavior of core-shell structured nanofibers of PLA and PVA produced by coaxial electrospinning. *Polymer Testing*, 67, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2018.02.026>
- Amar, S., Smith, L., & Fields, G. B. (2017). Matrix metalloproteinase collagenolysis in health and disease. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1864, Issue 11, pp. 1940–1951). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.04.015>
- America Type Culture Collection (ATCC). (n.d.). *Fibroblast Growth Kit-Serum-free (ATCC® PCS- 201-040™)*.
- America Type Culture Collection (ATCC). (2011). *XTT Cell Proliferation Assay Kit Instruction Manual*. <https://www.atcc.org/~media/56374CEEC36C47159D2040410828B969.ashx>
- Anún, J., Bagatello, F. J., Cid, M. P., & Comín, R. (2018). *Electrohilado y obtención de nanofibras de gelatina con hidroxipatita*. 5(2), 43–46.
- Aro, A. A., Perez, M. O., Vieira, C. P., Esquisatto, M. A. M., Rodrigues, R. A. F., Gomes, L., & Pimentel, E. R. (2015). Effect of calendula officinalis cream on achilles tendon healing. *Anatomical Record*, 298(2), 428–435. <https://doi.org/10.1002/ar.23057>
- Arora, D., Rani, A., & Sharma, A. (2013). A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. In *Pharmacognosy Reviews* (Vol. 7, Issue 14, pp. 179–187). Wolters Kluwer -- Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.120520>
- Bainbridge, P. (2013). Wound healing and the role of fibroblasts. *Journal of Wound Care*, 22(8), 407–412. <https://doi.org/10.12968/jowc.2013.22.8.407>
- Barbul, A., & Efron, D. (2011). Cicatrizacion de heridas. In *Principios de cirugía*

- (Novena, pp. 209–234).
- Basch, E., Bent, S., Foppa, I., Haskmi, S., Kroll, D., Mele, M., Szapary, P., Ulbricht, C., Vora, M., & Yong, S. (2006). Marigold (*Calendula officinalis* L.): An evidence-based systematic review by the natural standard research collaboration. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 6(3–4), 135–159. https://doi.org/10.1300/J157v06n03_08
- Baum, C. L., & Arpey, C. J. (2005). Normal cutaneous wound healing: Clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatologic Surgery*, 31(6), 674–686. <https://doi.org/10.1097/00042728-200506000-00011>
- Bayer, I. S. (2017). Thermomechanical properties of polylactic acid-graphene composites: A state-of-the-art review for biomedical applications. *Materials*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/ma10070748>
- Bekdeşer, B. (2019). Modeling and optimizing microwave-assisted extraction of antioxidant compounds from marigold (*Calendula officinalis* L.) using response surface methodology. *Turkish Journal of Chemistry*, 43(5), 1457–1471. <https://doi.org/10.3906/kim-1905-48>
- Blaga, L. (2017). HPLC DETERMINATION OF POLYPHENOLS FROM CALENDULA OFFICINALIS. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, XXI(2), 97–101.
- Bosch, Á. (2001). Las heridas y su tratamiento. *Offarm*, 20(7), 89–92. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-las-heridas-su-tratamiento-13018317>
- Brunicardi, F. C., Andersen, K. D., Billiar, R. T., Dunn, L. D., Hunter, G. J., Matthews, B. J., & Pollock, E. R. (2011). *Schwartz. Principios de cirugía* (McGraw Hill (ed.); 9°).
- Budovsky, A., Yarmolinsky, L., & Ben-Shabat, S. (2015). Effect of medicinal plants on wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 23(2), 171–183. <https://doi.org/10.1111/wrr.12274>
- Burgos Guerrer, E. C., & Riascos Cabrera, A. (2013). *Evaluación de la actividad antifúngica de la caléndula (Calendula officinalis, L.) como tratamiento in vitro en la dermatofitosis causada por Trichophyton sp.* [UNIVERSIDAD DE

- NARIÑO]. <http://biblioteca.udenar.edu.co:8085/atenea/biblioteca/89513.pdf>
- Butnariu, M., & Coradini, C. Z. (2012). Evaluation of biologically active compounds from *Calendula officinalis* flowers using spectrophotometry. *Chemistry Central Journal*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1752-153X-6-35>
- Carolina, D., Alvarez, M., María Del Pilar, D., & Lira, C. (2016). *Efectos de la corriente sobre el cono de Taylor durante el electrohilado*. UNAM.
- Carvalho, A. R., Diniz, R. M., Suarez, M. A. M., Figueiredo, C. S. S. e S., Zagmignan, A., Grisotto, M. A. G., Fernandes, E. S., & da Silva, L. C. N. (2018). Use of Some Asteraceae Plants for the Treatment of Wounds: From Ethnopharmacological Studies to Scientific Evidences. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 784. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00784>
- Casalini, T., Rossi, F., Castrovinci, A., & Perale, G. (2019). *A Perspective on Polylactic Acid-Based Polymers Use for Nanoparticles Synthesis and Applications*. 7(October), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00259>
- Castellanos, D., Gonzalez, D., & García, L. (2014). Manejo de heridas. *Elsevier*, 3(2), 112–120.
- Celestron. (n.d.). *Microscopio Digital MicroDirect*. Retrieved November 17, 2020, from <https://www.celestronmexico.com/producto/microscopio-microdirect-1080-hd/>
- Chang-Diaz, F. R. (1989). *METHOD OF INFUSION EXTRACTION*.
- Chaturvedi, A. K. (2018). Extraction of nutraceuticals from plants by microwave assisted extraction. In *Systematic Reviews in Pharmacy* (Vol. 9, Issue 1, pp. 31–35). <https://doi.org/10.5530/srp.2018.1.6>
- Chaudhari, A. A., Vig, K., Baganizi, D. R., Sahu, R., Dixit, S., Dennis, V., Singh, S. R., & Pillai, S. R. (2016). Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: A review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms17121974>
- Chu, K. C., & Rutt, B. K. (1997). Polyvinyl alcohol cryogel: An ideal phantom material for MR studies of arterial flow and elasticity. *Magnetic Resonance in Medicine*, 37(2), 314–319. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910370230>

- Cole, P., Heller, L., Jamal, B., Hollier, L., & Stal, S. (2011). Piel y tejido subcutáneo. In F. C. Brunickardi, D. K. Andersen, T. R. Billiar, D. L. Dunn, J. G. Hunter, J. B. Matthews, & R. E. Pollock (Eds.), *Principios de cirugía* (Mc Graw Hi, pp. 405–422).
- da Silva, T. N., Gonçalves, R. P., Rocha, C. L., Archanjo, B. S., Barboza, C. A. G., Pierre, M. B. R., Reynaud, F., & de Souza Picciani, P. H. (2019). Controlling burst effect with PLA/PVA coaxial electrospun scaffolds loaded with BMP-2 for bone guided regeneration. *Materials Science and Engineering C*, 97, 602–612. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.020>
- Dinda, M., Dasgupta, U., Singh, N., Bhattacharyya, D., & Karmakar, P. (2015). PI3K-Mediated proliferation of fibroblasts by calendula officinalis tincture: Implication in wound healing. *Phytotherapy Research*, 29(4), 607–616. <https://doi.org/10.1002/ptr.5293>
- Dinda, M., Mazumdar, S., Das, S., Ganguly, D., Dasgupta, U. B., Dutta, A., Jana, K., & Karmakar, P. (2016). The Water Fraction of *Calendula officinalis* Hydroethanol Extract Stimulates *In Vitro* and *In Vivo* Proliferation of Dermal Fibroblasts in Wound Healing. *Phytotherapy Research*, 30(10), 1696–1707. <https://doi.org/10.1002/ptr.5678>
- Duque, L., Rodriguez, L., & López, M. (2014). Electrospinning: La era de las nanofibras. *Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen*, 14(1), 10–27. <http://www.ehu.eus/reviberpol/pdf/ENE13/duque.pdf>
- Efstratiou, E., Hussain, A. I., Nigam, P. S., Moore, J. E., Ayub, M. A., & Rao, J. R. (2012). Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 18(3), 173–176. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2012.02.003>
- Eming, S. A., Martin, P., & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. In *Science Translational Medicine* (Vol. 6, Issue 265). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337>
- Ercetin, T., Senol, F. S., Erdogan Orhan, I., & Toker, G. (2012). Comparative

- assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from *Calendula arvensis* L. and *Calendula officinalis* L. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.09.007>
- Escher, G. B., Borges, L. D. C. C., Santos, J. S., Cruz, T. M., Marques, M. B., Do Carmo, M. A. V., Azevedo, L., Furtado, M. M., Sant'ana, A. S., Wen, M., Zhang, L., & Granato, D. (2019). From the field to the pot: Phytochemical and functional analyses of *calendula officinalis* L. flower for incorporation in an organic yogurt. *Antioxidants*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/antiox8110559>
- ESCOP. (2019). *Calendulae flos (flor de caléndula)* - ESCOP. <https://escop.com/downloads/calendulae-flos-calendula-flower-escop-hernal-monograph/>
- European Medicines Agency. (2018). *Caledula flower*. www.ema.europa.eu/contact
- Fonseca, Y. M., Catini, C. D., Vicentini, F. T. M. C., Nomizo, A., Gerlach, R. F., & Fonseca, M. J. V. (2010). Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(3), 596–601. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.019>
- Fronza, M., Heinzmann, B., Hamburger, M., Laufer, S., & Merfort, I. (2009). Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 126(3), 463–467. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.09.014>
- Gamez-Meza, N., Noriega-Rodriguez, J. A., Medina-Juarez, L. A., Ortega-Garcia, J., Cazarez-Casanova, R., & Angulo-Guerrero, O. (1999). Antioxidant activity in soybean oil of extracts from Thompson grape bagasse. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(12), 1445–1447. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0182-4>
- Ghosh, P. K., & Gaba, A. (2013). Phyto-extracts in wound healing. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 16(5), 760–820. <https://doi.org/10.18433/j3831v>
- Givol, O., Kornhaber, R., Visentin, D., Cleary, M., Haik, J., & Harats, M. (2019). A

- systematic review of *Calendula officinalis* extract for wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 27(5), 548–561. <https://doi.org/10.1111/wrr.12737>
- Gomez, D. A., Ruden Muñoz, A., Gonzalez, J. M., & Sequeda, F. (2015). Estudio de la energía superficial y hemocompatibilidad del Ti y TiN sintetizados por Magnetron Sputtering para aplicaciones médicas. *Scientia et Technica*, 20(2), 97. <https://doi.org/10.22517/23447214.9301>
- Grossman, S., & Porth, C. M. (2019). Inflamación, reparación tisular y cicatrización de heridas. In LWW (Ed.), *Fisiopatología: Alteraciones de la salud. Conceptos básicos*. (10th ed.). <https://cienciasbasicas.lwwhealthlibrary.com/content.aspx?sectionid=243771693&bookid=2908#243771804>
- Heino, J. (2007). The collagen family members as cell adhesion proteins. *BioEssays*, 29(10), 1001–1010. <https://doi.org/10.1002/bies.20636>
- Hernández-Rosas, N. A., García-Zebadúa, J. C., Hernández-Delgado, N., Torres-Castillo, S., Figueroa-Arredondo, P., & Mora-Escobedo, R. (2018). Perfil de polifenoles, capacidad antioxidante y efecto citotóxico in vitro en líneas celulares humanas de un extracto hidroalcohólico de pétalos de *Calendula officinalis* L. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 21, 54–64. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.150>
- Hernández, M., Álvarez-Pérez, M. A., Genesca, J., Gómez, K. K., & Covelo, A. (2020). Evaluation of the biocompatibility of a PVA/SA scaffold with a human gingival fibroblast (HGF) by using electrochemical impedance spectroscopy. *Bioelectrochemistry*, 131, 107386. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.107386>
- Hinz, B. (2016). The role of myofibroblasts in wound healing. *Current Research in Translational Medicine*, 64(4), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.09.003>
- Hosseinkazemi, H., Biazar, E., Bonakdar, S., Ebadi, M. T., Shokrgozar, M. A., & Rabiee, M. (2015). Modification of PCL Electrospun Nanofibrous Mat With *Calendula officinalis* Extract for Improved Interaction With Cells. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 64(9), 459–464.

<https://doi.org/10.1080/00914037.2014.958835>

- Houghton, P. J., Hylands, P. J., Mensah, A. Y., Hensel, A., & Deters, A. M. (2005). In vitro tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 100, Issues 1–2, pp. 100–107). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.07.001>
- Ibidi cells in focus. (2018). *Wound Healing Assay*. https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN21_Wound_Healing_Assay.pdf
- IBM Corp. (2013). *NIBM SPSS Statistics para Windows* (22.0).
- INEGI. (2018). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018 ENSANUT*.
- Jiang, S., Liu, S., & Feng, W. (2011). PVA hydrogel properties for biomedical application. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(7), 1228–1233. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.04.005>
- Kai, D., Liow, S. S., & Loh, X. J. (2015). Biodegradable polymers for electrospinning: Towards biomedical applications. *Materials Science and Engineering C*, 45, 659–670. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.051>
- Karami, Z., Rezaeian, I., Zahedi, P., & Abdollahi, M. (2013). Preparation and performance evaluations of electrospun poly(ϵ - caprolactone), poly(lactic acid), and their hybrid (50/50) nanofibrous mats containing thymol as an herbal drug for effective wound healing. *Journal of Applied Polymer Science*, 129(2), 756–766. <https://doi.org/10.1002/app.38683>
- Kishimoto, S., Maoka, T., Sumitomo, K., & Ohmiya, A. (2005). Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69(11), 2122–2128. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.2122>
- Kolarsick, P., BS, Kolarsick, M. A., MSN, ARHP-C, Goodwin, C., APRN-BC, & FNP. (2011). Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(6), 366. <https://doi.org/10.1097/JDN.0b013e31823cccbe>
- Korting, H. C., Schöllmann, C., & White, R. J. (2011). Management of minor acute cutaneous wounds: Importance of wound healing in a moist environment. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25(2), 130–137. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2010.03775.x>

- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. In *The Scientific World Journal* (Vol. 2013, p. 16). ScientificWorld Ltd. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2015). Robbins y Cotran Patología Estructural y Funcional. In *Robbins y Cotran Patología Estructural y Funcional* (9th ed.).
- Lastra Valdés, H., & Piquet García, R. (1999). CALENDULA OFFICINALIS. *Rev Cubana Farm*, 33(3), 188–194. <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v33n3/far07399.pdf>
- Loggia, R., Tubaro, A., Sosa, S., Becker, H., Saar, S., & Isaac, O. (1994). The Role of Triterpenoids in the Topical Anti-Inflammatory Activity of *Calendula officinalis* Flowers. *Planta Medica*, 60(06), 516–520. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959562>
- López Luengo, M. T. (2003). Plantas medicinales de aplicación en dermofarmacia. *Offarm*, 22(11), 122–125. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-plantas-medicinales-aplicacion-dermofarmacia-13055930>
- Madrid, M., Machecha, L., Oviedo, P., Chaves, M., Roa, N., García, D., & Moreno, G. (2010). Efecto de la *Calendula officinalis* en la proliferación del fibroblasto gingival humano. *Universitas Odontológica*, 29(63), 107–112. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231216366013>
- McLafferty, E., Hendry, C., & Farley, A. (2012). The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nursing Standard*, 27(3), 35–42. <https://doi.org/10.7748/ns2012.09.27.3.35.c9299>
- Muley, B., Khadabadi, S., & Banarase, N. (2009). Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A review. *International Journal of PharmTech Research*, 8(5), 455.465.
- Muley, B. P., Khadabadi, S. S., Banarase, N. B., College, G., Naka, K., & State, M. (2009). *Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review. 8(September), 455–465.
- Muñoz-Centeno, L. M. (2004). Plantas medicinales españolas *Calendula officinalis* L . (Asteraceae). *Medicina Naturista*, 5(1995), 257–261.
- Narayanan, K. B., Park, G. T., & Han, S. S. (2020). Electrospun poly(vinyl

- alcohol)/reduced graphene oxide nanofibrous scaffolds for skin tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 191(October 2019), 110994. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110994>
- Nicolaus, C., Junghanns, S., Hartmann, A., Murillo, R., Ganzera, M., & Merfort, I. (2017). In vitro studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula officinalis* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 196, 94–103. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2016.12.006>
- Norris, T. L., & Tuan, R. L. (2019). Estructura y función de la piel. In *Porth. Fisiopatología: Alteraciones de la salud. Conceptos básicos* (10th ed.). <https://cienciasbasicas.lwwhealthlibrary.com/content.aspx?sectionid=243786368&bookid=2908>
- Ourabia, I., Djebbar, R., Tata, S., Sabaou, N., & Fouial-Djebbar, D. (2019). Determination of essential oil composition, phenolic content, and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of marigold (*Calendula Officinalis* L.) cultivated in Algeria. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, 11(2), 93–110. <https://doi.org/10.34302/crpjfst/2019.11.2.8>
- Parente, L. M. L., Andrade, M. A., Brito, L. A. B., Moura, V. M. B. D. de, Miguel, M. P., Lino-Júnior, R. de S., Tresvenzol, L. F. M., Paula, J. R. de, & Paulo, N. M. (2011). Angiogenic activity of *Calendula officinalis* flowers L. in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, 26(1), 19–24. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502011000100005>
- Parente, L. M. L., Lino Júnior, R. D. S., Tresvenzol, L. M. F., Vinaud, M. C., De Paula, J. R., & Paulo, N. M. (2012). Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *calendula officinalis* L. growing in Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/375671>
- Patrick, K. F. M., Kumar, S., Edwardson, P. A. D., & Hutchinson, J. J. (1996). Induction of vascularisation by an aqueous extract of the flowers of *Calendula officinalis* L. the European marigold. *Phytomedicine*, 3(1), 11–18. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(96\)80004-3](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(96)80004-3)
- Pedram Rad, Z., Mokhtari, J., & Abbasi, M. (2019). *Calendula officinalis*

- extract/PCL/Zein/Gum arabic nanofibrous bio-composite scaffolds via suspension, two-nozzle and multilayer electrospinning for skin tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 530–543. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.204>
- Pérez, C. (2014). *SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA USANDO EXTRACTOS VEGETALES*. Escuela de Ingeniería de Antioquia.
- PETKOVA, D., MIHAYLOVA, D., DENEV, P., & KRASTANOV, A. (2020). Antioxidant Activity of Some Edible Flowers Water Extracts from Bulgaria. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology*, 77(1), 54. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-fst:2019.0025>
- Pires, T. C. S. P., Dias, M. I., Barros, L., Calhella, R. C., Alves, M. J., Oliveira, M. B. P. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Edible flowers as sources of phenolic compounds with bioactive potential. *Food Research International*, 105, 580–588. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.014>
- Pommier, P., Gomez, F., Sunyach, M. P., D'Hombres, A., Carrie, C., & Montbarbon, X. (2004). Phase III randomized trial of Calendula Officinalis compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22(8), 1447–1453. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.07.063>
- Preethi, K. C., Kuttan, G., & Kuttan, R. (2006). Antioxidant potential of an extract of Calendula officinalis flowers in vitro and in vivo. *Pharmaceutical Biology*. <https://doi.org/10.1080/13880200601009149>
- Rojas Bedoya, L. C., Gómez López, K., & Marín Pareja, N. (2020). Extraction of metabolites from Calendula officinalis and evaluation of their colorant and antibacterial capacity. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(1), 60–69. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.79999>
- Romero, H. (2018). “Efecto de membranas de PLA/PVA obtenidas por electrohilado y extracto acuoso de Quercus ilex en el tratamiento de heridas pos-quirúrgicas en piel de rata de la cepa Wistar.” Benemerita Universidad Autonoma de

Puebla.

- Rubio-Elizalde, I., Bernáldez-Sarabia, J., Moreno-Ulloa, A., Vilanova, C., Juárez, P., Licea-Navarro, A., & Castro-Ceseña, A. B. (2019). Scaffolds based on alginate-PEG methyl ether methacrylate-Moringa oleifera-Aloe vera for wound healing applications. *Carbohydrate Polymers*, 206, 455–467. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.027>
- Russo, F., Rodríguez Morcelle, M. I., & Apóstolo, N. M. (2015). Flavonoides de Calendula officinalis L. bajo cultivo. Efecto de diferentes fechas de siembra y fertilización. *Dominguezia*, 31(1), 23–29. <http://www.dominguezia.org/volumen/articulos/3113.pdf>
- Saavedra, J. S., Díaz, V. J. R., Domínguez, A. S., & Elizondo, R. B. (2005). Histología, biología celular y tisular. Instructivo de laboratorio. In *NASPA Journal*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Secretaría de Salud. (2016). *Manual Clínico para la estandarización del cuidado y tratamiento a pacientes con heridas agudas y crónicas*. http://www.calidad.salud.gob.mx/site/editorial/docs/Manual_Clinico_Heridas.pdf
- Singhvi, M. S., Zinjarde, S. S., & Gokhale, D. V. (2019). Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. *Journal of Applied Microbiology*, 127(6), 1612–1626. <https://doi.org/10.1111/jam.14290>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299(25), 152–178. <https://doi.org/10.1007/BF02530903>
- Stritt, M., Stalder, A. K., & Vezzali, E. (2020). Orbit image analysis: An open-source whole slide image analysis tool. *PLoS Computational Biology*, 16(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007313>
- Suda, S., Williams, H., Medbury, H. J., & Holland, A. J. A. (2016). A Review of Monocytes and Monocyte-Derived Cells in Hypertrophic Scarring Post Burn. *Journal of Burn Care and Research*, 37(5), 265–272. <https://doi.org/10.1097/BCR.0000000000000312>

- Taylor, G., & A, P. R. S. L. (1964). Disintegration of water drops in an electric field. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 280(1382), 383–397. <https://doi.org/10.1098/rspa.1964.0151>
- Ukiya, M., Akihisa, T., Yasukawa, K., Tokuda, H., Suzuki, T., & Kimura, Y. (2006). Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. *Journal of Natural Products*, 69(12), 1692–1696. <https://doi.org/10.1021/np068016b>
- Valencia-Gómez, L., Martel-Estrada, S. A., Vargas-Requena, C. L., Rodriguez-González, C. A., Olivas-Armendariz, I., Valencia-Gómez, L. E., Martel-Estrada, S. A., Vargas-Requena, C. L., Rodriguez-González, C. A., & Olivas-Armendariz, I. (2016). Natural polymers aposites for skin regeneration. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 37(3), 235–249. <https://doi.org/10.17488/RMIB.37.3.4>
- Vela, G., Stegensek, E. M., & Leija, C. (2018). Investigación Epidemiological characteristics and wound care costs in medical units of the Secretaría de Salud Características epidemiológicas y costos de la atención de las heridas en unidades médicas de la Secretaría de Salud. *Enfermería Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 26, 105–114.
- Voudouri, D., & Tesseromati, C. (2013). Medicinal plants in wound healing. In *Pharmakeftiki* (Vol. 25, Issue 4, pp. 135–144). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80215>
- Wilson, E. ., & Peter, F. M. (1989). Screening Plants for New Medicines. In *Biodiversity* (Vol. 243, Issue 4891, pp. 83–97). <https://doi.org/10.1126/science.243.4891.589-a>
- Wong, R., Geyer, S., Weninger, W., Guimberteau, J. C., & Wong, J. K. (2016). The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental Dermatology*, 25(2), 92–98. <https://doi.org/10.1111/exd.12832>
- World Health Organization. (2010). WHO monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States (NIS). 439. https://www.who.int/medicines/areas/traditional/nis_monograph/en/
- Xiong, W., Chen, X., Lv, G., Hu, D., Zhao, J., & Li, S. (2016). Optimization of

- microwave-assisted extraction of bioactive alkaloids from lotus plumule using response surface methodology. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(6), 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2016.05.007>
- Xue, J., Wu, T., Dai, Y., Xia, Y., States, U., & States, U. (2019). *Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications*. 119(8), 5298–5415. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00593>.Electrospinning
- Xue, J., Xie, J., Liu, W., Xia, Y., States, U., Holland, D., Medicine, R., States, U., States, U., & States, U. (2017). *Electrospun Nanofibers: New Concepts, Materials, and Applications*. 50(8), 1976–1987. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00218>.Electrospun
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomás-Barberán, F. A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. In *Plant Foods for Human Nutrition* (Vol. 59, Issue 3, pp. 113–122). Springer Science+Business Media, Inc. <https://doi.org/10.1007/s11130-004-0049-7>
- Zaiss, D. M., Minutti, C. M., & Knipper, J. A. (2019). Immune- and non-immune-mediated roles of regulatory T-cells during wound healing. *Immunology*, 157(3), 190–197. <https://doi.org/10.1111/imm.13057>

11 Anexos

Anexo 1


BUAP

D.C. Maura Cárdenas García
Facultad de Medicina
PRESENTE

Por este medio reciba un cordial saludo y así mismo aprovecho la presente para entregarle la identificación de la planta solicitada, que hizo el curador M.Phil Allen J. Coombes, siendo la siguiente:

ID	Nombre Científico	Familia
79017	<i>Calendula officinalis</i> L.	ASTERACEAE

Sin más por el momento me despido de usted.

ATENTAMENTE

PENSAR BIEN PARA VIVIR MEJOR
Puebla, Pue. a 01 de abril 2019


Dra. Maricela Rodríguez Acosta
Directora del Herbario y Jardín Botánico BUAP



c.c.p. Archivo

Jardín Botánico
Universitario

Prolongación 24 Sur y Av. San Claudio,
Edif. HJ81, Ciudad Universitaria,
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 7030 y 7031

Figura 58. Identificación taxonómica.

Anexo 2

Tabla 9. Estadística descriptiva.

Descriptivos									
		N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
DIA0	Control Negativo	2	78.59550	.878934	.621500	70.69859	86.49241	77.974	79.217
	Control Positivo	2	78.83000	1.268550	.897000	67.43253	90.22747	77.933	79.727
	MEMBRANA	2	77.25600	.108894	.077000	76.27762	78.23438	77.179	77.333
	EAMC	2	77.96350	.253851	.179500	75.68274	80.24426	77.784	78.143
	EEMS	2	78.10800	1.429770	1.011000	65.26203	90.95397	77.097	79.119
	EAMS	2	79.17100	.312541	.221000	76.36293	81.97907	78.950	79.392
	EEAM	2	78.30000	.707107	.500000	71.94690	84.65310	77.800	78.800
	EAAM	2	78.30000	.707107	.500000	71.94690	84.65310	77.800	78.800
	M+EAMC	2	77.76950	.983586	.695500	68.93233	86.60667	77.074	78.465
	M+EEMS	2	78.11500	.166877	.118000	76.61567	79.61433	77.997	78.233
	M+EAMS	2	77.28100	.302642	.214000	74.56187	80.00013	77.067	77.495
	M+EEAM	2	78.87950	.887419	.627500	70.90636	86.85264	78.252	79.507
	M+EAAM	2	79.04500	.714178	.505000	72.62837	85.46163	78.540	79.550
	Total	26	78.23200	.805576	.164438	77.89183	78.57217	77.067	79.550
DIA1	Control Negativo	2	65.60850	1.134906	.802500	55.41177	75.80523	64.806	66.411
	Control Positivo	2	63.19950	1.009041	.713500	54.13362	72.26538	62.486	63.913
	MEMBRANA	2	75.19350	.785596	.555500	68.13520	82.25180	74.638	75.749
	EAMC	2	64.34000	1.414214	1.000000	51.63380	77.04620	63.340	65.340
	EEMS	2	63.49300	4.521241	3.197000	22.87126	104.11474	60.296	66.690
	EAMS	2	69.60450	7.903332	5.588500	-1.40413	140.61313	64.016	75.193
	EEAM	2	74.40000	.707107	.500000	68.04690	80.75310	73.900	74.900
	EAAM	2	67.90000	.707107	.500000	61.54690	74.25310	67.400	68.400
	M+EAMC	2	67.96800	3.924443	2.775000	32.70828	103.22772	65.193	70.743
	M+EEMS	2	76.26800	1.667358	1.179000	61.28738	91.24862	75.089	77.447
	M+EAMS	2	64.59950	1.065610	.753500	55.02537	74.17363	63.846	65.353
	M+EEAM	2	74.67500	.459619	.325000	70.54548	78.80452	74.350	75.000
	M+EAAM	2	62.77150	.714885	.505500	56.34851	69.19449	62.266	63.277
	Total	26	68.90179	5.362522	1.094620	66.63740	71.16619	60.296	77.447
DIA2	Control Negativo	2	53.56200	5.037429	3.562000	8.30250	98.82150	50.000	57.124
	Control Positivo	2	58.85600	12.474778	8.821000	-53.22543	170.93743	50.035	67.677
	MEMBRANA	2	60.18050	10.434775	7.378500	-33.57223	153.93323	52.802	67.559
	EAMC	2	55.86250	.132229	.093500	54.67447	57.05053	55.769	55.956
	EEMS	2	69.51350	2.834791	2.004500	44.04391	94.98309	67.509	71.518
	EAMS	2	65.68500	9.804743	6.933000	-22.40712	153.77712	58.752	72.618
	EEAM	2	62.10000	.848528	.600000	54.47628	69.72372	61.500	62.700
	EAAM	2	64.85000	.636396	.450000	59.13221	70.56779	64.400	65.300
	M+EAMC	2	63.13300	2.008183	1.420000	45.09019	81.17581	61.713	64.553
	M+EEMS	2	63.49350	1.834942	1.297500	47.00720	79.97980	62.196	64.791
	M+EAMS	2	63.20300	1.634831	1.156000	48.51463	77.89137	62.047	64.359
	M+EEAM	2	67.46100	.722663	.511000	60.96813	73.95387	66.950	67.972
	M+EAAM	2	50.63400	.714178	.505000	44.21737	57.05063	50.129	51.139
	Total	26	61.63983	6.447752	1.316142	58.91719	64.36248	50.000	72.618
DIA3	Control Negativo	2	48.77250	11.379469	8.046500	-53.46798	151.01298	40.726	56.819
	Control Positivo	2	47.35700	5.827974	4.121000	-5.00527	99.71927	43.236	51.478

	MEMBRANA	2	51.87850	3.960505	2.800500	16.29477	87.46223	49.078	54.679
	EAMC	2	50.77000	6.192841	4.379000	-4.87047	106.41047	46.391	55.149
	EEMS	2	51.69100	4.190315	2.963000	14.04252	89.33948	48.728	54.654
	EAMS	2	60.76700	4.589123	3.245000	19.53537	101.99863	57.522	64.012
	EEAM	2	53.85000	.777817	.550000	46.86159	60.83841	53.300	54.400
	EAAM	2	56.85000	.777817	.550000	49.86159	63.83841	56.300	57.400
	M+EAMC	2	63.27900	2.527200	1.787000	40.57301	85.98499	61.492	65.066
	M+EEMS	2	36.85850	7.141071	5.049500	-27.30148	101.01848	31.809	41.908
	M+EAMS	2	51.29250	1.028840	.727500	42.04874	60.53626	50.565	52.020
	M+EEAM	2	60.44400	.702864	.497000	54.12902	66.75898	59.947	60.941
	M+EAAM	2	38.03850	.012021	.008500	37.93050	38.14650	38.030	38.047
	Total	26	52.04096	8.748551	1.785791	48.34677	55.73515	31.809	65.066
DIA4	Control Negativo	2	49.93050	8.944194	6.324500	-30.42989	130.29089	43.606	56.255
	Control Positivo	2	45.73000	6.453056	4.563000	-12.24841	103.70841	41.167	50.293
	MEMBRANA	2	54.28700	13.552409	9.583000	-67.47656	176.05056	44.704	63.870
	EAMC	2	44.06950	2.093743	1.480500	25.25796	62.88104	42.589	45.550
	EEMS	2	49.10750	3.458459	2.445500	18.03448	80.18052	46.662	51.553
	EAMS	2	53.41900	17.032788	12.044000	-99.61453	206.45253	41.375	65.463
	EEAM	2	52.10000	2.121320	1.500000	33.04069	71.15931	50.600	53.600
	EAAM	2	49.70000	.707107	.500000	43.34690	56.05310	49.200	50.200
	M+EAMC	2	58.20100	3.179152	2.248000	29.63745	86.76455	55.953	60.449
	M+EEMS	2	31.91500	4.019195	2.842000	-4.19603	68.02603	29.073	34.757
	M+EAMS	2	37.48950	9.811107	6.937500	-50.65980	125.63880	30.552	44.427
	M+EEAM	2	50.83550	.693672	.490500	44.60311	57.06789	50.345	51.326
	M+EAAM	2	35.60950	.000707	.000500	35.60315	35.61585	35.609	35.610
	Total	26	47.22200	9.716042	1.983279	43.11928	51.32472	29.073	65.463
DIA5	Control Negativo	2	43.41450	5.813125	4.110500	-8.81435	95.64335	39.304	47.525
	Control Positivo	2	43.74450	7.996671	5.654500	-28.10273	115.59173	38.090	49.399
	MEMBRANA	2	51.73650	14.581249	10.310500	-79.27082	182.74382	41.426	62.047
	EAMC	2	41.93000	.862670	.610000	34.17922	49.68078	41.320	42.540
	EEMS	2	51.41900	1.978485	1.399000	33.64302	69.19498	50.020	52.818
	EAMS	2	51.58400	5.037429	3.562000	6.32450	96.84350	48.022	55.146
	EEAM	2	44.75000	.070711	.050000	44.11469	45.38531	44.700	44.800
	EAAM	2	46.65000	.777817	.550000	39.66159	53.63841	46.100	47.200
	M+EAMC	2	46.23550	8.245572	5.830500	-27.84803	120.31903	40.405	52.066
	M+EEMS	2	24.05950	5.943232	4.202500	-29.33833	77.45733	19.857	28.262
	M+EAMS	2	33.19450	3.758273	2.657500	-.57224	66.96124	30.537	35.852
	M+EEAM	2	49.28200	.070711	.050000	48.64669	49.91731	49.232	49.332
	M+EAAM	2	35.20250	.047376	.033500	34.77684	35.62816	35.169	35.236
	Total	26	43.28817	9.327221	1.903911	39.34963	47.22671	19.857	62.047
DIA6	Control Negativo	2	43.35400	3.743423	2.647000	9.72068	76.98732	40.707	46.001
	Control Positivo	2	41.48900	5.159051	3.648000	-4.86323	87.84123	37.841	45.137
	MEMBRANA	2	48.65700	14.563571	10.298000	-82.19150	179.50550	38.359	58.955
	EAMC	2	38.83800	4.705089	3.327000	-3.43554	81.11154	35.511	42.165
	EEMS	2	41.21150	2.533564	1.791500	18.44833	63.97467	39.420	43.003
	EAMS	2	44.08450	5.821610	4.116500	-8.22059	96.38959	39.968	48.201
	EEAM	2	23.65000	.212132	.150000	21.74407	25.55593	23.500	23.800
	EAAM	2	34.85000	.636396	.450000	29.13221	40.56779	34.400	35.300
	M+EAMC	2	40.53950	1.716148	1.213500	25.12052	55.95848	39.326	41.753
	M+EEMS	2	21.12700	4.627307	3.272000	-20.44770	62.70170	17.855	24.399
	M+EAMS	2	31.84700	5.365526	3.794000	-16.36034	80.05434	28.053	35.641
	M+EEAM	2	34.85450	.190212	.134500	33.14552	36.56348	34.720	34.989
	M+EAAM	2	21.10200	.568514	.402000	15.99411	26.20989	20.700	21.504
	Total	26	35.34292	9.855911	2.011829	31.18113	39.50470	17.855	58.955

DIA7	Control Negativo	2	17.02600	2.303754	1.629000	-3.67241	37.72441	15.397	18.655
	Control Positivo	2	16.00850	3.213800	2.272500	-12.86635	44.88335	13.736	18.281
	MEMBRANA	2	22.07200	3.583617	2.534000	-10.12552	54.26952	19.538	24.606
	EAMC	2	17.27650	4.488007	3.173500	-23.04664	57.59964	14.103	20.450
	EEMS	2	20.88450	1.296127	.916500	9.23926	32.52974	19.968	21.801
	EAMS	2	14.65850	3.482501	2.462500	-16.63053	45.94753	12.196	17.121
	EEAM	2	22.50000	.707107	.500000	16.14690	28.85310	22.000	23.000
	EAAM	2	34.60000	.707107	.500000	28.24690	40.95310	34.100	35.100
	M+EAMC	2	38.32450	2.942271	2.080500	11.88924	64.75976	36.244	40.405
	M+EEMS	2	13.57500	.353553	.250000	10.39845	16.75155	13.325	13.825
	M+EAMS	2	25.48800	2.508815	1.774000	2.94719	48.02881	23.714	27.262
	M+EEAM	2	33.78950	.239709	.169500	31.63580	35.94320	33.620	33.959
	M+EAAM	2	17.06600	.701450	.496000	10.76372	23.36828	16.570	17.562
	Total	24	23.10504	8.308671	1.696000	19.59660	26.61349	12.196	40.405
DIA8	Control Negativo	2	14.45850	1.110865	.785500	4.47778	24.43922	13.673	15.244
	Control Positivo	2	12.28700	.625082	.442000	6.67086	17.90314	11.845	12.729
	MEMBRANA	2	18.55700	2.330624	1.648000	-2.38283	39.49683	16.909	20.205
	EAMC	2	14.14050	1.533715	1.084500	.36062	27.92038	13.056	15.225
	EEMS	2	16.81850	2.912573	2.059500	-9.34993	42.98693	14.759	18.878
	EAMS	2	13.85300	3.814134	2.697000	-20.41563	48.12163	11.156	16.550
	EEAM	2	20.25000	.353553	.250000	17.07345	23.42655	20.000	20.500
	EAAM	2	10.90000	.707107	.500000	4.54690	17.25310	10.400	11.400
	M+EAMC	2	32.61400	3.992325	2.823000	-3.25562	68.48362	29.791	35.437
	M+EEMS	2	12.83900	1.760696	1.245000	-2.98022	28.65822	11.594	14.084
	M+EAMS	2	20.33650	1.099551	.777500	10.45743	30.21557	19.559	21.114
	M+EEAM	2	32.69100	.213546	.151000	30.77236	34.60964	32.540	32.842
	M+EAAM	2	11.52750	.703571	.497500	5.20616	17.84884	11.030	12.025
	Total	26	18.24879	7.408488	1.512251	15.12046	21.37712	10.400	35.437
DIA9	Control Negativo	2	16.80350	3.602709	2.547500	-15.56556	49.17256	14.256	19.351
	Control Positivo	2	13.85400	2.989647	2.114000	-13.00692	40.71492	11.740	15.968
	MEMBRANA	2	16.83750	1.962221	1.387500	-.79236	34.46736	15.450	18.225
	EAMC	2	6.38750	.150614	.106500	5.03429	7.74071	6.281	6.494
	EEMS	2	16.27400	2.766202	1.956000	-8.57934	41.12734	14.318	18.230
	EAMS	2	13.27750	3.218043	2.275500	-15.63547	42.19047	11.002	15.553
	EEAM	2	11.10000	.282843	.200000	8.55876	13.64124	10.900	11.300
	EAAM	2	9.62000	.537401	.380000	4.79164	14.44836	9.240	10.000
	M+EAMC	2	21.17100	5.368355	3.796000	-27.06175	69.40375	17.375	24.967
	M+EEMS	2	9.95900	3.336130	2.359000	-20.01494	39.93294	7.600	12.318
	M+EAMS	2	16.68450	1.164605	.823500	6.22094	27.14806	15.861	17.508
	M+EEAM	2	19.65950	.757311	.535500	12.85533	26.46367	19.124	20.195
	M+EAAM	2	9.96700	.018385	.013000	9.80182	10.13218	9.954	9.980
	Total	26	13.97842	4.836021	.987149	11.93634	16.02049	6.281	24.967
DIA10	Control Negativo	2	15.54750	3.820498	2.701500	-18.77831	49.87331	12.846	18.249
	Control Positivo	2	6.06750	.092631	.065500	5.23524	6.89976	6.002	6.133
	MEMBRANA	2	18.17750	5.312493	3.756500	-29.55336	65.90836	14.421	21.934
	EAMC	2	4.64550	1.035911	.732500	-4.66179	13.95279	3.913	5.378
	EEMS	2	16.11100	2.677106	1.893000	-7.94185	40.16385	14.218	18.004
	EAMS	2	11.63300	.965908	.683000	2.95466	20.31134	10.950	12.316
	EEAM	2	5.75000	1.060660	.750000	-3.77965	15.27965	5.000	6.500
	EAAM	2	5.66250	.477297	.337500	1.37416	9.95084	5.325	6.000

	M+EAMC	2	18.37900	3.643014	2.576000	-14.35218	51.11018	15.803	20.955
	M+EEMS	2	5.44600	.916410	.648000	-2.78762	13.67962	4.798	6.094
	M+EAMS	2	3.76900	1.124300	.795000	-6.33243	13.87043	2.974	4.564
	M+EEAM	2	13.78850	.775696	.548500	6.81915	20.75785	13.240	14.337
	M+EAAM	2	8.19100	.777817	.550000	1.20259	15.17941	7.641	8.741
	Total	26	10.59171	5.758649	1.175479	8.16004	13.02337	2.974	21.934
DIA11	Control Negativo	2	13.07150	2.058388	1.455500	-5.42238	31.56538	11.616	14.527
	Control Positivo	2	5.77250	.241123	.170500	3.60609	7.93891	5.602	5.943
	MEMBRANA	2	17.17750	5.900806	4.172500	-35.83914	70.19414	13.005	21.350
	EAMC	2	2.72500	.707107	.500000	-3.62810	9.07810	2.225	3.225
	EEMS	2	15.91400	2.702562	1.911000	-8.36756	40.19556	14.003	17.825
	EAMS	2	8.74450	.143543	.101500	7.45482	10.03418	8.643	8.846
	EEAM	2	2.15000	.212132	.150000	.24407	4.05593	2.000	2.300
	EAAM	2	2.61250	.689429	.487500	-3.58177	8.80677	2.125	3.100
	M+EAMC	2	12.18100	1.052175	.744000	2.72758	21.63442	11.437	12.925
	M+EEMS	2	5.47400	.509117	.360000	.89977	10.04823	5.114	5.834
	M+EAMS	2	3.02050	.775696	.548500	-3.94885	9.98985	2.472	3.569
	M+EEAM	2	6.09400	.948937	.671000	-2.43186	14.61986	5.423	6.765
	M+EAAM	2	7.82150	.642760	.454500	2.04653	13.59647	7.367	8.276
	Total	26	8.08217	5.451665	1.112817	5.78013	10.38420	2.000	21.350
DIA12	Control Negativo	2	6.35250	.239709	.169500	4.19880	8.50620	6.183	6.522
	Control Positivo	2	5.72400	2.930251	2.072000	-20.60326	32.05126	3.652	7.796
	MEMBRANA	2	16.47700	5.052985	3.573000	-28.92227	61.87627	12.904	20.050
	EAMC	2	.69850	.987828	.698500	-8.17678	9.57378	.000	1.397
	EEMS	2	12.34700	2.326381	1.645000	-8.55471	33.24871	10.702	13.992
	EAMS	2	7.91500	.551543	.390000	2.95958	12.87042	7.525	8.305
	EEAM	2	.55000	.070711	.050000	-.08531	1.18531	.500	.600
	EAAM	2	.81250	.689429	.487500	-5.38177	7.00677	.325	1.300
	M+EAMC	2	5.62050	.406586	.287500	1.96747	9.27353	5.333	5.908
	M+EEMS	2	2.72300	1.547150	1.094000	-11.17759	16.62359	1.629	3.817
	M+EAMS	2	2.41300	.339411	.240000	-.63649	5.46249	2.173	2.653
	M+EEAM	2	5.06100	1.309562	.926000	-6.70495	16.82695	4.135	5.987
	M+EAAM	2	3.00100	.169706	.120000	1.47626	4.52574	2.881	3.121
	Total	26	5.33092	4.981751	1.016896	3.22731	7.43453	.000	20.050
DIA13	Control Negativo	2	6.55150	.523966	.370500	1.84385	11.25915	6.181	6.922
	Control Positivo	2	4.63750	1.506845	1.065500	-8.90096	18.17596	3.572	5.703
	MEMBRANA	2	16.33300	5.067127	3.583000	-29.19333	61.85933	12.750	19.916
	EAMC	2	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	EEMS	2	10.71450	2.559019	1.809500	-12.27738	33.70638	8.905	12.524
	EAMS	2	5.63950	.509824	.360500	1.05891	10.22009	5.279	6.000
	EEAM	2	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	EAAM	2	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
	M+EAMC	2	5.36600	.721249	.510000	-1.11416	11.84616	4.856	5.876
	M+EEMS	2	2.41150	1.706249	1.206500	-12.91854	17.74154	1.205	3.618
	M+EAMS	2	.30600	.079196	.056000	-.40555	1.01755	.250	.362
	M+EEAM	2	2.45000	.707107	.500000	-3.90310	8.80310	1.950	2.950
	M+EAAM	2	1.35900	.241831	.171000	-.81376	3.53176	1.188	1.530
	Total	26	4.26092	5.102075	1.041457	2.10650	6.41533	.000	19.916
DIA14	Control Negativo	2	2.28650	1.298955	.918500	-9.38415	13.95715	1.368	3.205
	Control Positivo	2	1.40900	1.203496	.851000	-9.40398	12.22198	.558	2.260

MEMBRANA	2	11.67950	2.658014	1.879500	-12.20181	35.56081	9.800	13.559
EAMC	2	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
EEMS	2	9.59900	1.045104	.739000	.20911	18.98889	8.860	10.338
EAMS	2	3.53250	.753069	.532500	-3.23355	10.29855	3.000	4.065
EEAM	2	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
EAAM	2	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
M+EAMC	2	1.68300	.869741	.615000	-6.13132	9.49732	1.068	2.298
M+EEMS	2	1.53600	1.046518	.740000	-7.86659	10.93859	.796	2.276
M+EAMS	2	.24850	.033234	.023500	-.05010	.54710	.225	.272
M+EEAM	2	.27800	.393151	.278000	-3.25432	3.81032	.000	.556
M+EAAM	2	.55500	.784889	.555000	-6.49694	7.60694	.000	1.110
Total	26	2.61650	3.914984	.799143	.96335	4.26965	.000	13.559

Tabla 10. Análisis de varianza de una vía.

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
D0	Entre grupos	9.211	12	.768	1.250	.347
	Dentro de grupos	7.984	13	.614		
	Total	17.195	25			
D1	Entre grupos	613.584	12	51.132	6.106	.001
	Dentro de grupos	108.867	13	8.374		
	Total	722.451	25			
D2	Entre grupos	719.821	12	59.985	1.919	.129
	Dentro de grupos	406.297	13	31.254		
	Total	1126.118	25			
D3	Entre grupos	1518.566	12	126.547	5.202	.003
	Dentro de grupos	316.258	13	24.328		
	Total	1834.823	25			
D4	Entre grupos	1477.217	12	123.101	2.163	.091
	Dentro de grupos	739.769	13	56.905		
	Total	2216.986	25			
D5	Entre grupos	1606.824	12	133.902	3.797	.012
	Dentro de grupos	458.440	13	35.265		
	Total	2065.263	25			
D6	Entre grupos	1961.420	12	163.452	5.756	.002
	Dentro de grupos	369.130	13	28.395		
	Total	2330.550	25			
D7	Entre grupos	1612.031	12	134.336	22.091	.000
	Dentro de grupos	79.054	13	6.081		
	Total	1691.085	25			
D8	Entre grupos	1274.527	12	106.211	25.639	.000
	Dentro de grupos	53.853	13	4.143		
	Total	1328.379	25			
D9	Entre grupos	460.824	12	38.402	5.802	.002

	Dentro de grupos	86.046	13	6.619		
	Total	546.870	25			
D10	Entre grupos	730.588	12	60.882	11.317	.000
	Dentro de grupos	69.935	13	5.380		
	Total	800.523	25			
D11	Entre grupos	642.741	12	53.562	13.723	.000
	Dentro de grupos	50.741	13	3.903		
	Total	693.482	25			
D12	Entre grupos	533.915	12	44.493	12.638	.000
	Dentro de grupos	45.767	13	3.521		
	Total	579.682	25			
D13	Entre grupos	562.224	12	46.852	15.607	.000
	Dentro de grupos	39.026	13	3.002		
	Total	601.249	25			
D14	Entre grupos	342.180	12	28.515	25.594	.000
	Dentro de grupos	14.483	13	1.114		
	Total	356.664	25			