



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA  
EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**



**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

---

**Tema:** Elaboración de andamios biológicos a partir de polímeros naturales recubiertos con extracto de *Clinopodium tomentosum* (Kunth).

---

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyectos de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autor:** Geovanna Noemí Carrera Fonseca

**Tutor:** PhD. Irvin Ricardo Tubón Usca

**Ambato – Ecuador**

**Septiembre - 2023**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

PhD. Irvin Ricardo Tubón Usca

### **CERTIFICA**

Que el presente Trabajo de Titulación curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autoriza la presentación de este Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el reglamento de titulación y Grados de la Facultad de Ciencias e ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 24 de Julio del 2023

.....  
PhD. Irvin Ricardo Tubón Usca

**C.I 060425035-7**

**TUTOR**

## **AUTORIA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, Geovanna Noemí Carrera Fonseca, manifiesto que los resultados obtenidos en el Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga son absolutamente auténticos y personales a excepción de las citas bibliográficas.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Geovanna Noemí Carrera Fonseca', with a stylized flourish at the end.

Geovanna Noemí Carrera Fonseca

**C.I. 200008405-9**

**AUTOR**

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de Trabajo de Titulación, o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con los fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este informe dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia y se realice respetando mis derechos de autor.



Geovanna Noemí Carrera Fonseca

**C.I. 200008405-9**

**AUTOR**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos profesores calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la facultad de Ciencia e ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para la constancia firman:

.....

Presidente del Tribunal

.....

PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

C.I.180425690-5

.....

Mg. María Daniela Garcés Moncayo

C.I 180357158-5

Ambato, 25 de agosto del 2023

## DEDICATORIA

*A Dios y al Universo por permitirme seguir aquí*

*A la vida por darme unos padres maravillosos*

*A mi familia y amigos que siempre están*

*A esas personas que confiaron sin dudar*

*A los retos que enfrenté y me ayudaron a crecer*

*A todo lo que viví, que me hizo llegar hasta aquí*

## AGRADECIMIENTO

*Gracias a la vida que me ha dado tanto...*

*A mi papá Polo Carrera, por su apoyo y amor incondicional. Porque sin él nada de esto sería posible*

*A mis primos Gaby, Magus, Titi y Leo que han sabido estar en cada una de mis batallas internas y celebrar conmigo cada logro obtenido. A mis tíos Juan Carrera y Sandra Mazón, por ayudarme tanto fuera como dentro de este proyecto.*

*A mis tortuguitas Mafer y Alejandro, que pese a la distancia han sabido mantenerse cerca de mí. A mis amigos y compañeros Erick S, Wladi, Josesín y Raque por alegrarme la existencia y hacer de los problemas algo llevadero. A esas personas mágicas que encontré en mi caminar universitario, entre ellas Erick y Vic, que sin pensarlo han llegado a ser grandes amigos.*

*Al PhD. Irvin Tubón por toda su paciencia, motivación y conocimiento impartido a lo largo de este proyecto. Gracias infinitas por ser fuente de inspiración para nosotros. A mis docentes de la FCIAB por incentivar me a continuar en la carrera. Muchos de ellos no tienen el reconocimiento que se merecen entre los estudiantes, pero créanme nada que vale la pena es fácil.*

*A los Ingenieros Daniel Guáitara y Edith Guamán por sus consejos y tiempo brindado para el desarrollo de esta investigación.*

*A Mishu, Nía y Jona por donarme su sangre para la realización de este trabajo. A Grace y Washo por aprender conmigo en esta prueba. No hace falta decir que más de uno fue lastimado en el proceso, lo siento chicos, peeeero ya aprendimos a sacar sangre. Los amo.*

*Gracias por coincidir y conectar conmigo. No sé a dónde nos lleve el destino, pero estoy segura de que uno vuelve siempre a los viejos sitios donde amó la vida...*

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

<b>APROBACIÓN DEL TUTOR</b> .....	<b>ii</b>
<b>AUTORIA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b> .....	<b>iii</b>
<b>DERECHOS DE AUTOR</b> .....	<b>iv</b>
<b>APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO</b> .....	<b>v</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>vi</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>RESUMEN EJECUTIVO</b> .....	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiii</b>
<b>CAPITULO I.-MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Antecedentes Investigativos .....	1
1.1.1. Ingeniería de tejidos .....	1
1.1.2. Andamios biológicos (ABs).....	1
1.1.3. Biomateriales utilizados en la fabricación de ABs .....	2
1.1.4. Elaboración de ABs.....	6
1.1.5. Uso de extractos en la ingeniería de tejidos .....	7
1.1.6. Plantas Ancestrales.....	8
1.1.7. <i>Clinopodium tomentosum</i> (Kunth).....	9
1.1.8. Extracción con solventes.....	11
1.1.9. Tamizaje fitoquímico .....	11
1.1.10. Capacidad antioxidante .....	12
1.1.11. Método de difusión en pozos de Agar.....	13
1.2. Objetivos.....	13
1.2.1. Objetivo General .....	13
1.2.2. Objetivos específicos .....	13
<b>CAPITULO II.- METODOLOGÍA</b> .....	<b>14</b>
2.1. Materiales .....	14



2.1.1.	Material Vegetal.....	14
2.1.2.	Material microbiano .....	14
2.1.3.	Material de laboratorio.....	14
2.1.4.	Reactivos .....	15
2.1.5.	Equipos de laboratorio .....	16
2.2.	Métodos .....	16
2.3.	Caracterización del extracto etanólico .....	16
2.4.	Elaboración de ABs.....	21
2.5.	Evaluación de las propiedades de los ABs.....	23
2.6.	Análisis de resultados .....	27
<b>CAPITULO III.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>		<b>28</b>
3.1.	Análisis y discusión de los resultados .....	28
3.1.1.	Caracterización del extracto etanólico .....	28
3.1.3.	Elaboración de ABs.....	34
3.1.4.	Evaluación de las propiedades morfológicas, físicas y biológicas de los ABs .....	36
<b>CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>		<b>56</b>
4.1.	Conclusiones.....	56
4.2.	Recomendaciones.....	57
<b>MATERIALES DE REFERENCIA .....</b>		<b>58</b>
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....		58
<b>ANEXOS .....</b>		<b>79</b>
ANEXO A. Caracterización de extracto .....		79
ANEXO B. Curvas de calibración para la caracterización de los extractos .....		80
ANEXO C. Elaboración de ABs.....		81
ANEXO D. Evaluación de las propiedades de los ABs.....		82
ANEXO E. Tablas de las propiedades morfológicas, físicas y biológicas .....		83
ANEXO F.- Análisis de varianza.....		94
ANEXO G.- Permisos.....		99

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura del colágeno .....	4
<b>Figura 2.</b> Estructura de la quitina y quitosano .....	5
<b>Figura 3.</b> <i>Clinopodium tomentosum</i> (Kunth).....	10
<b>Figura 4.</b> Elaboración de ABs .....	22
<b>Figura 5.</b> Esquema de la evaluación morfológica de los ABs .....	23
<b>Figura 6.</b> Esquema de las evaluaciones físicas .....	25
<b>Figura 7.</b> Proceso de evaluación de biodegradación .....	26
<b>Figura 8.</b> ABs liofilizados .....	35
<b>Figura 9.</b> Imágenes SEM de los ABs .....	38
<b>Figura 10.</b> Porosidad de ABs liofilizados .....	40
<b>Figura 11.</b> Capacidad de absorción de agua.....	42
<b>Figura 12.</b> Capacidad de absorción de agua.....	43
<b>Figura 13.</b> Permeabilidad del vapor de agua.....	44
<b>Figura 14.</b> Propiedades mecánicas de los ABs .....	48
<b>Figura 15.</b> Biodegradación de ABs .....	50
<b>Figura 16.</b> Biodegradabilidad de los ABs .....	51
<b>Figura 17.</b> Porcentaje de inhibición frente <i>S.aureus</i> en los ABs.....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Metabolitos secundarios identificados de los extractos de Pumín.....	29
<b>Tabla 2.</b> Capacidad antioxidante de pumín.....	30
<b>Tabla 3.</b> Contenido de fenoles y flavonoides totales presentes en pumín.....	32
<b>Tabla 4.</b> Halos de inhibición del extracto de pumín.....	33
<b>Tabla 5.</b> Propiedades mecánicas de los ABs a diferentes concentraciones.....	46
<b>Tabla 6.</b> Halos de inhibición de los ABs.....	53

## RESUMEN EJECUTIVO

La piel es el órgano más grande de todo el cuerpo y también el más afectado en accidentes y lesiones, que comprometen el tejido. En algunas ocasiones se requiere de un trasplante para promover la regeneración celular. La ingeniería de tejidos y los avances en la medicina regenerativa han encontrado el potencial en la fabricación de andamios biológicos. En Ecuador, la gran diversidad de especies vegetales, saberes y conocimientos ancestrales poco explorados, limitan el uso de extractos herbales. Entre ellas, *Clinopodium tomentosum* (Kunth) una especie endémica con propiedades antioxidantes y angiogénicas, que pueden ser aprovechadas dentro de la cicatrización de heridas.

Este estudio se centró en la fabricación de andamios con extracto de *C. tomentosum* (Kunth) a 50 y 100 microgramos por mililitros, tomando como control andamios híbridos de colágeno y quitosano. Para ello, el extracto fue caracterizado mediante pruebas cualitativas y microbiológicas. Con la técnica de liofilización para andamios, se preservó tanto la estructura 3D como los metabolitos secundarios del extracto. Esto fue confirmado a través de las imágenes de microscopía electrónica de barrido. Adicionalmente, se evaluaron las propiedades morfológicas, físicas y biológicas.

El andamio a 50 microgramos por mililitro de extracto fue el más apto, ya que presentó características apropiadas en cuanto al porcentaje y tamaño de poro. Sin mencionar las propiedades mecánicas, que brindan un soporte tras realizar el trasplante. Además, de ser biodegradables y exhibir propiedades antimicrobianas frente a *S. aureus*. Por tanto, puede ser aplicado para heridas epiteliales.

**Palabras clave:** Cicatrización, andamios biológicos, biodiversidad, conocimientos ancestrales, *Clinopodium tomentosum* (kunth), extractos herbales.

## ABSTRACT

The skin, being the largest organ in the body, is highly susceptible to damage from accidents and injuries, leading to tissue compromise. In certain cases, cell regeneration necessitates transplantation. In this context, tissue engineering and advancements in regenerative medicine have explored the potential of biological scaffolds. However, in Ecuador, the use of herbal extracts is limited due to unexplored knowledge and underutilization of the country's rich diversity of plant species. Among these valuable resources lies *Clinopodium tomentosum* (Kunth), an endemic species with antioxidant and angiogenic properties, holding promise for wound healing applications.

The focus of this study was on the fabrication of scaffolds containing *C. tomentosum* (Kunth) extract at concentrations of 50 and 100 micrograms per milliliter, with collagen-chitosan hybrid scaffolds serving as controls. The extract underwent qualitative and microbiological tests to ensure its quality. The lyophilization technique preserved the 3D structure of the scaffolds while retaining the secondary metabolites of the extract, a finding corroborated through scanning electron microscopy images. Comprehensive evaluations of morphological, physical, and biological properties were conducted.

Among the tested scaffolds, the one with 50 micrograms per milliliter of extract exhibited the most promising characteristics in terms of percentage and pore size. Moreover, it demonstrated favorable mechanical properties that ensure support after transplantation. Additionally, its biodegradability and antimicrobial properties against *S. aureus* make it a compelling candidate for application in epithelial wound healing.

**Keywords:** Wound healing, biological scaffolds, biodiversity, ancestral knowledge, *Clinopodium tomentosum* (Kunth), herbal extracts.

## CAPITULO I.-MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes Investigativos

#### 1.1.1. Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos (IT) es un campo interdisciplinario destinado a restaurar, mantener y mejorar la funcionalidad del tejido. La IT tiene como objetivo la creación de reemplazos biológicos que imiten el tejido nativo, con el fin de evitar inconvenientes asociados al trasplante de órganos ( **Sharma et al., 2019**).

Dentro de los accidentes y lesiones existen heridas que comprometen el tejido de manera parcial o total en donde los tratamientos convencionales no son suficientes, por lo que la IT se convierte en una gran alternativa. La cicatrización de heridas representa una respuesta fisiológica muy compleja ya sea por una lesión física, química, mecánica o térmica (**Helary et al., 2015**). La deficiencia de la cicatrización normal puede ser causada por quemaduras, infecciones o incluso complicaciones derivadas de estados patológicos (**Negut et al., 2020**). En la actualidad el campo de la ingeniería de tejidos ha evolucionado para combinar células, factores de crecimiento y andamios biológicos (**Vesvoranan et al., 2022**).

#### 1.1.2. Andamios biológicos (ABs)

Los andamios buscan imitar la matriz extracelular (MEC) del tejido original, por lo que la arquitectura y funciones (mecánicas y biológicas) sean semejantes para facilitar el crecimiento y la proliferación celular tras su implantación en el paciente (**Suamte et al., 2023**). Los ABs son elaborados a partir de polímeros naturales y sintéticos. Sin embargo, al fabricar un andamio se debe tomar en consideración la porosidad, integridad mecánica, elección del material, degradación y la compatibilidad celular con el tejido nativo (**Vesvoranan et al., 2022**).

### **1.1.2.1. Características requeridas en los ABs**

Independientemente del tipo de tejido, existen una serie de consideraciones para que el andamio cumpla la función de regeneración como: las propiedades físicas, mecánicas y biológicas, además de ser biodegradable (**Suamte et al., 2023**). Las propiedades físicas son de gran importancia ya que factores como la porosidad, tamaño y estructura de los poros, generan un crecimiento celular, transporte de nutrientes y desechos metabólicos óptimos (**Sultana, 2018**). Los poros interconectados y alta porosidad aseguran la penetración celular y difusión adecuada de sustratos. En general, se ha demostrado que los tamaños de poros superiores a 100  $\mu\text{m}$  son apropiados para fomentar la adhesión, migración e infiltración celular (**Vesvoranan et al., 2022**).

Para una manipulación *in vitro* e *in vivo* se necesitan buenas propiedades mecánicas de tensión y deformación, características que dan estructura y durabilidad al andamio (**Agrawal & Srivastava, 2020**). Las similitudes entre la resistencia mecánica de la piel y el andamio es fundamental para apoyar la angiogénesis y el desarrollo del sistema linfático (**Suamte et al., 2023**). La biodegradabilidad es necesaria para conformar el nuevo tejido, si está es más rápida, el tejido generado puede ser defectuoso y es posible que los subproductos no se expulsen del cuerpo. En cambio, si es lenta pueda conducir a la encapsulación del andamio, desencadenando una respuesta inmune y una mala integración o rechazo del tejido (**Echeverria et al., 2021**).

### **1.1.3. Biomateriales utilizados en la fabricación de ABs**

Existen biomateriales inorgánicos y polímeros de origen natural y sintéticos, mismos que pueden generar diversas estructuras de andamiaje dependiendo del procesamiento empleado (**Bhattacharai et al., 2018**). Los biomateriales inorgánicos son utilizados ampliamente para reparar y regenerar huesos como el titanio y sus aleaciones que se caracterizan por su resistencia, pero con el tiempo puede llegar a ser tóxicos en el cuerpo (**Collins et al., 2021**).

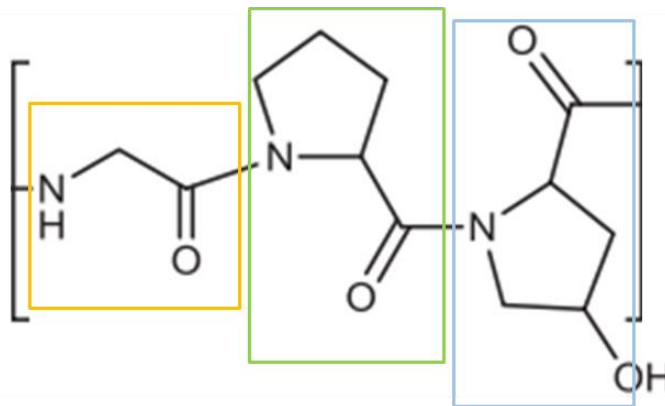
Por otro lado, existen polímeros biodegradables como los de origen natural y sintético. Se ha demostrado que este último es biocompatible siempre y cuando sean administrado de manera controlada. Por ejemplo, la policaprolactona (PCL), se trata de un poliéster de alta resistencia mecánica, usado en técnicas de modelado debido a sus propiedades fisicoquímicas. De tal forma, que es aplicado en la IT como anclajes y soportes de suturas quirúrgicas **(Kulda & Babuska, 2019)**.

Además del PCL, el ácido poliláctico (PLA) y alcohol polivinílico (PVA) hay otros empleados en la medicina regenerativa. Sin embargo, se requiere de más de un polímero para lograr un efecto específico y aun así, muchas de estas sustancias químicas son incompatibles con las células **(Xia et al., 2022)**. En cuanto a los biopolímeros naturales, se presentan mayores ventajas ya que presentan similitud con la MEC, lo que da mayor compatibilidad y biodegradabilidad, reduciendo el riesgo de una respuesta inmunitaria **(Filippi et al., 2020)**. Estos pueden estar basados en proteínas o polisacáridos. Entre los más estudiados se encuentran las proteínas como el colágeno, gelatina, y entre los polisacáridos el alginato, quitosano y ácido hialurónico **(Collins et al., 2021)**.

#### **1.1.3.1. Uso del colágeno como biomaterial**

El colágeno es uno de los polímeros naturales más usado que se encuentra en el tejido conectivo. Es una de las proteínas más abundantes en el ser humano y el componente principal de la MEC, ya que consta del 25 a 35 % del contenido de proteínas de todo el cuerpo **(Zhao et al., 2021)**. Su cadena polipeptídica contiene glicina, prolina, hidroxiprolina y lisina (Figura 1). El grado de flexibilidad está determinado por la cantidad de glicina **(Kulda & Babuska, 2019)**.





**Figura 1.** Estructura del colágeno

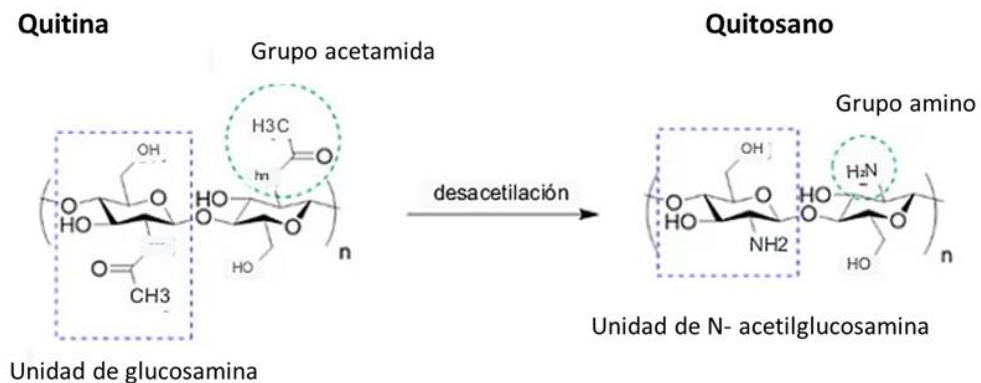
Se presenta la unión de los aminoácidos correspondiente en la formación de la cadena de colágeno. Los aminoácidos de glicina, prolina e hidroxiprolina se encuentran señalados por cuadros de naranja, verde y azul respectivamente. Ilustración tomada de (Zou et al., 2018)

Actualmente, se conoce la existencia de 28 tipos de colágeno codificados por al menos 45 genes diferentes (Meyer, 2019). Los colágenos cumplen la función principal de ofrecer fuerza y flexibilidad a los tejidos, sobre todo los de tipo I, II, y III que son los más empleados en aplicaciones clínicas (Xia et al., 2022). El colágeno tipo I es el más frecuente en tejido óseo y que también prevalece en la piel, tendón y hueso, mientras que el tipo II se encuentra principalmente en el cartílago (Zhao et al., 2021).

Los colágenos exhiben varias características ventajosas debido a su capacidad dentro de la formación de tejidos y crecimiento celular (Collins et al., 2021). Sin embargo, en la fabricación de ABs, el colágeno tiende a degradarse con mayor rapidez al contacto con el tejido. Esto a causa de la presencia de prolina y la desnaturalización frente al calor corporal (Nurfriana et al., 2019). En consecuencia, tiene una resistencia mecánica insuficiente, lo que limita sus aplicaciones. Se ha descubierto que para superar esta deficiencia, los ABs de colágeno pueden reticulares por métodos químicos/físicos o modificarse con polímeros naturales/sintéticos para mejorar su actividad biológica (Irawan et al., 2018).

### 1.1.3.2. Uso del Quitosano como biomaterial

El quitosano es un derivado de la quitina, es uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza, se encuentra en la concha de los crustáceos y las paredes de los hongos. Está compuesto por unidades estructurales de D-glucosamina (glucosamina) y N-acetil-D-glucosamina distribuidas al azar, estructuralmente similares al glucosaminoglicano, un componente clave de la matriz ósea (Sukpaita et al., 2021). Para aplicaciones biomédicas, la quitina en estado sólido se puede convertir mediante destilación enzimática o química en su derivado de sustancia fibrosa más conocido como quitosano (figura 2) (Santos et al., 2020).



**Figura 2.** Estructura de la quitina y quitosano

La quitina se presenta con un grupo acetamida y una unidad de glucosamina de verde y azul respectivamente. El quitosano al presentar un desacetilación se transforma en grupo amino y unidad N-acetilglucosamina. Ilustración tomada de (Aroca & Ressler, 2022).

El quitosano tiene tres grupos funcionales: Grupo amino, abundantes grupos hidroxilo primarios y grupos hidroxilo secundarios. Estos grupos funcionales pueden generar fácilmente enlaces de hidrógeno sin alterar su polimerización, lo que es ventajoso al momento de fabricar varios tipos de ABs para la regeneración y reparación de tejidos (Sukpaita et al., 2021). Su estructura hidrófila promueve la adhesión, proliferación y diferenciación celular (Sultankulov et al., 2019). En comparación con otros polímeros, el quitosano presenta una degradación más lenta y sus propiedades físicas dependen de su peso molecular, grado de polimerización y pureza del producto (Zhao et al., 2021).

### **1.1.3.3. Uso de la agarosa como biomaterial**

La agarosa se compone de polisacáridos como la D-galactosa y la 3-6 anhidro-L-galactopiranosil, que se puede extraerse de fuentes marinas y purificarse en un laboratorio (**Samrot et al., 2023**). Esto último, ayuda a eliminar sustancias tóxicas y hemolíticas y obtener una baja degradabilidad (**Irastorza et al., 2021**). La agarosa es un polisacárido natural con gran potencial dentro de la IT (**Zarrintaj et al., 2018**). En cuanto a la capacidad de absorción de agua proporciona un microambiente adecuado para la actividad celular en la fabricación de ABs (**Salati et al., 2020**). La principal desventaja como material de andamio es su falta de reconocimiento celular. En los últimos años, para crear ABs y superar esta limitación, la agarosa se ha mezclado con otros biomateriales como el quitosano, colágeno y gelatina que poseen motivos de reconocimiento celular con el fin de adaptarse a diferentes tipos de tejidos blandos (**Samrot et al., 2023**).

### **1.1.4. Elaboración de ABs**

Existe una gran variedad de biomateriales, así como especificidad según el tejido a insertar. Se puede usar diversas técnicas de fabricación, pero se debe tener en cuenta el ambiente microbiológico, ya que es responsable de los procesos de diferenciación, proliferación y migración celular (**Krishani et al., 2023**). La fabricación debe comprender funciones a niveles de macroescala y microescala. A nivel de microescala genera un entorno adecuado de supervivencia y funciones celulares mientras que la construcción a macroescala permite una coordinación de procesos multicelulares, como el transporte de nutrientes y propiedades mecánicas eficientes (**Eltom et al., 2019**).

En este sentido, las técnicas de fabricación de ABs son realmente importantes ya que son necesarios para obtener ABs con buenas propiedades, poros interconectados, estructura porosa y una distribución uniforme. Las técnicas de elaboración se clasifican en convencionales y avanzadas. Dentro de los métodos avanzados requieren de equipos y tratamientos más costoso que pese a su gran eficiencia no es factible a gran escala. (**Krishani et al., 2023**).

#### **1.1.4.1.Métodos convencionales**

Los métodos para la elaboración de ABs de forma convencional son varios, pero los primeros en descubrirse fueron la fundición de solventes y lixiviación de partículas. Estos procesos que se basan en la dispersión de porógeno de una solución polimérica, para luego lixiviar sumergiendo los andamios en un solvente adecuado dejando los poros dentro de la matriz. Estas técnicas son relativamente simples, reproducibles y generan armazones con alto grado de porosidad.

##### **1.1.4.1.1. Liofilización**

Este método consta de cuatro pasos: En primer lugar, se prepara la solución del polímero. Segundo, la solución se moldea y luego se congela por debajo de su punto triple. Tercero, se lleva a un secado primario para eliminar la mayor parte de los cristales de hielo por sublimación. Finalmente, los cristales de hielo se eliminan durante la fase de secado secundario (Collins et al., 2021).

Este método resalta de entre los demás ya que permite obtener ABs altamente porosos con alta interconectividad (Hassanajili et al., 2019). Así también, el sistema se encuentra controlado por la temperatura velocidad de secado y concentración de polímero. Se ha demostrado que, tras evaluaciones en su morfología por Microscopia electrónica de barrido (SEM) la alta porosidad es mayor al 77 %. Al mismo tiempo, se consigue mantener las propiedades mecánicas (Singaravelu et al., 2016).

#### **1.1.5. Uso de extractos en la ingeniería de tejidos**

Los biomateriales son un componente importante dentro de la ingeniería de tejidos. Actualmente se ha explorado el uso de extractos como componente bioactivo (Bu et al., 2020). En la ingeniera de tejido ha tenido diferentes aplicaciones como la diferenciación de células madre, propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias y proangiogénicas (Agarwal et al.,2021).

El diseño y procesamiento de construcciones herbales con propiedades óptimas son esenciales para obtener mejores resultados. Es más, dependiendo de la aplicación se puede seleccionar las diferentes técnicas de fabricación, con el fin de conseguir una mejor morfología, propiedades mecánicas, fisicoquímicas y de degradación. Hasta el momento, se han utilizado tecnologías de fabricación, incluida la fundición con disolventes, liofilización, hidrogeles, técnicas con electrohilado e impresiones en 3D (**Agarwal et al.,2021**).

#### **1.1.6. Plantas Ancestrales**

Los pueblos indígenas son los autores y gestores activos del conocimiento ancestral del uso de plantas como medicina alternativa, misma que ha tomado fuerza en una economía basada en la conservación y aprovechamiento de los recursos renovables. Los conocimientos empíricos están asociados en gran medida al uso y aplicación de las plantas para curar y aliviar enfermedades. Actualmente, la Ley Orgánica de Salud promueve la implementación de la medicina indígena en los servicios de salud (**Sarauz, 2021;González et al., 2021**).

Las plantas contienen una gran variedad de fitoquímicos como compuestos fenólicos, alcaloides y terpenos que brindan propiedades antioxidantes. Entre las comunidades indígenas, las plantas con mayores usos terapéuticos pertenecen a la familia Lamiaceae como el orégano, albahaca y menta (**Sarauz, 2021**). Cabe destacar, que en Ecuador existen plantas ancestrales enfocadas a la cicatrización como la sangre de drago, muña e incluso la ayahuasca (**Gonçalves et al., 2022; Sugawara & Nikaido, 2014**).

##### **1.1.6.1.Características del Género *Clinopodium***

El género *Clinopodium* pertenece a la familia Lamiaceae como la sexta familia de plantas más grande con más de 200 géneros (**Bekut et al., 2018**). *Clinopodium* consta de más de

140 especies distribuidas por todo el mundo, por su gran facilidad de adaptación y cultivo (Moncayo, 2020). Son empleadas como remedios naturales en diferentes regiones de América (Romani et al., 2019). Según Bayas, (2018) son plantas perennes, herbáceas, ligeramente aromáticas con hojas simples y con aplicaciones dentro de las diferentes culturas para tratar malestares desde cólicos hasta infecciones. Se ha demostrado el alto contenido de polifenoles y flavonoides con grandes efectos en la salud (Ramos Da Silva et al., 2021). Actualmente, se han desarrollado estudios con especies pertenecientes al género, determinando la actividad antibacterial y antifúngica, uno de ellos es *Clinopodium tomentosum* (Kunth).

### 1.1.7. *Clinopodium tomentosum* (Kunth)

#### 1.1.7.1. Taxonomía

**Reino:** Plantae  
**División:** Magnoliophyta  
**Clase:** Magnoliopsida  
**Orden:** Lamiales  
**Familia:** Lamiaceae  
**Género:** *Clinopodium*  
**Especie:** *Clinopodium Tomentosum*

**Fuente:** (Vélez, 2019)

#### 1.1.7.2. Descripción Botánica

*Clinopodium Tomentosum* es un arbusto de 30-80 cm que crece en América Latina entre 3000 a 4000 msnm. Las flores son tubulares de color rojo anaranjado, hojas ovaladas (Figura 3) (Saltos et al., 2014). Es una especie ubicada en las provincias de Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Pichincha y Tungurahua también conocida como “Pumín” (Moncayo, 2020).



**Figura 3.** *Clinopodium tomentosum* (Kunth)

Se muestra la morfología de la planta, siendo un arbusto, presenta flores amarillo-anaranjadas con pequeñas hojas.

#### **1.1.7.3. Usos de *Clinopodium tomentosum* (Kunth)**

Siete especies de *Clinopodium* son endémicas de Ecuador, distribuidas en la región central. Dentro de la medicina tradicional, se utiliza las partes aéreas de la planta para tratar afecciones respiratorias, inflamaciones, y trastornos gastrointestinales (**De la Torre et al., 2008**). Las aplicaciones están ampliamente relacionadas con sus aceites esenciales, los mismos que tiene diversas actividades antioxidantes, antiinflamatorias y analgésicas (**Braca et al., 2014**).

#### **1.1.7.4. Metabolitos secundarios**

Existe una gran variedad de metabolitos secundarios como flavonoides, alcaloides, terpenoides, tanino, etc., Este género es particularmente conocido por ser rico en compuestos fenólicos y aceites esenciales (**Abbas et al., 2012**). Estos metabolitos son realmente importantes ya que están asociadas a las actividades biológicas (antibacteriana, antifúngica, antiviral y antioxidante) que son empleadas dentro de la medicina tradicional. Los compuestos fenólicos se han detectado ácido rosmarínico, miricetina, quercetina, luteolina, hesperetina, apigenina, ácido vanílico, vainillina y ácido gálico aunque en diferentes concentraciones pero en casi todas las especies evaluadas (**Beddiar et al., 2021**)

### **1.1.8. Extracción con solventes**

La extracción es un proceso muy utilizado que tiene como finalidad la obtención de metabolitos secundarios como: alcaloides, flavonoides, terpenos, saponinas, entre otros. La elección del tipo de extracción depende del solvente seleccionado, la temperatura, tiempo de extracción y usos previos relacionados con la finalidad del estudio (**Abubakar & Haque, 2020**). Se han empleado métodos modernos de extracción para la preparación de extractos de plantas tales como la extracción asistida por microondas, entre otros. Estos métodos presentan diversas ventajas como la baja temperatura de extracción, un tiempo reducido de extracción. Por otro lado, también hay métodos convencionales como la maceración que se destaca por su simplicidad conveniencia y menor costo en términos de instrumentación (**Sithisarn et al., 2006**).

#### **1.1.8.1. Extracción por maceración**

Es una técnica de bajo costo en la que se introduce la muestra en el disolvente bajo condiciones ambientales por un mínimo de 3 días, requiere de una agitación cada cierto tiempo, al término de la maceración se separa la muestra por filtración o decantación. Este método es adecuado para material vegetal termolábil (**Bitwell et al., 2023**). Este método resulta aplicable en pequeñas y medianas empresas y en países en desarrollo. En áreas donde el acceso a la atención médica es escaso. Las plantas medicinales son la primera opción de tratamiento. En este sentido, los métodos de extracción basados en maceración son los más ampliamente utilizados (**Ngoua Meye et al., 2019**).

### **1.1.9. Tamizaje fitoquímico**

La detección fitoquímica se emplea para la identificación de compuestos y características específicos basado en especies, es un proceso cualitativo que sirve para determinar la presencia de metabolitos secundarios de una especie (**T. Sharma et al., 2020**).



<b>Ensayo</b>	<b>Metabolito</b>
Dragendorff	Alcaloides
Espuma	Saponinas
Shinoda	Flavonoides
Cloruro Férrico	Fenoles
Gelatina	Taninos
Borntrager	Quinonas
Acetato de cobre	Diterpenos

Fuente: **(Shaikh & Patil, 2020)**

### **1.1.10. Capacidad antioxidante**

Los antioxidantes evitan la generación de reacciones en cadena provocados por los radicales libres mediante la transferencia de electrones, mismas que provocan un impacto negativo en los organismos vivos. Existen dos categorías de ensayos para determinar la capacidad antioxidante: Ensayos basados en la transferencia de electrones (TE) y ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (TAH) **(Ruiz, 2020; Vázquez et al., 2022)**. La oxidación de la sonda se puede medir mediante diferentes tecnologías y entre los métodos más empleado se encuentra el método DPPH (2,2-difenil-1 picrilhidrazilo) **(Munteanu & Apetrei, 2021)**.

#### **1.1.10.1. Método DPPH**

La prueba DPPH es una técnica fácil de realizar, económica y proporciona una detección de la actividad general de los antioxidantes. La decoloración actúa como un indicador de la actividad antioxidante; de violeta intenso a amarillo, en donde el DPPH reacciona con un compuesto antioxidante y la propiedad de radicales libres se pierde, misma que se puede observar mediante la disminución en la absorbancia a 517 nm **(Goncalves et al., 2018)**.

### **1.1.11. Método de difusión en pozos de Agar**

El método de difusión en pozos de agar se usa generalmente para evaluar la actividad antimicrobiana de plantas (**Balouiri et al., 2016**). Este ensayo se basa en la observación y medición del halo de inhibición generado por el cultivo bacteriano previamente inoculado sobre toda la superficie de la placa. Este halo de inhibición se da alrededor de unos pozos/huecos de 6-8 mm, mismos que llevan un volumen adecuado de la solución de muestra a la concentración elegida. Posteriormente, la placa de agar se incuba bajo los requerimientos necesarios de la bacteria, que da como resultado la zona de inhibición (**Hossain et al., 2022**).

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo General**

Elaborar andamios biológicos a partir de polímeros naturales recubiertos con extracto etanólico de *Clinopodium tomentosum* (Kunth) para futuras aplicaciones en ingeniería de tejidos.

### **1.2.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar el extracto etanólico de *Clinopodium tomentosum* (Kunth) mediante pruebas fitoquímicas y microbiológicas.
- Elaborar andamios biológicos a partir de polímeros naturales y el extracto etanólico de *Clinopodium tomentosum* (Kunth) utilizando la técnica de liofilización
- Determinar las propiedades físicas, morfológicas y biológicas de los andamios elaborados.

## CAPITULO II.- METODOLOGÍA

### 2.1. Materiales

#### 2.1.1. Material Vegetal

- Hojas de Pumín

#### 2.1.2. Material microbiano

- *Staphylococcus aureus* ATCC 12600

#### 2.1.3. Material de laboratorio

- Botellas de frasco azul (250 mL)
- Probetas (10,50,500 mL)
- Tubos Falcon (15-50 mL)
- Tubos eppendorf
- Tubos de ensayo con tapa rosca
- Vasos de precipitación (50,100 y 250 mL)
- Asas de inoculación
- Mechero Bunsen
- Balones de aforo (100 mL)
- Micropipetas de 100-1000 mL)
- Agitadores magnéticos
- Pinzas
- Gradillas
- Cajas Petri
- Paca de 96 pocillos
- Papel aluminio
- Hisopos estériles
- Tubos con citrato de sodio

#### **2.1.4. Reactivos**

- Hipoclorito de sodio (5 %)
- Etanol (70 %)
- Metanol (99 %)
- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico)
- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)
- Folin-ciocalteu 2 N
- Carbonato de sodio 7 %
- Cloruro de aluminio
- PBS
- Ácido acético
- Colágeno
- Quitosano
- Agarosa
- Agar Mueller-Hinton
- Caldo Mueller-Hinton
- Agua destilada
- Gentamicina
- Vancomicina
- Cloruro de bario (1 %)
- Ácido sulfúrico (1 %)
- Reactivo Dragendorff
- Ácido clorhídrico concentrado
- Cinta de magnesio metálico
- Cloroformo
- Hidróxido de sodio (5 %)
- Tricloruro férrico (5 %)
- Alcohol amílico
- Acetato de cobre

- Solución de gelatina (1 %)

### **2.1.5. Equipos de laboratorio**

- Deshidratador por convección
- Balanza analítica
- Ratoevaporador
- Espectrofotómetro
- Refrigeradora
- Vortex
- Autoclave
- Plancha de agitación
- Incubadora
- Cámara de flujo laminar
- Liofilizador

## **2.2.Métodos**

### **2.3.Caracterización del extracto etanólico**

#### **2.3.1. Recolección del material vegetal**

Las hojas de Pumín, se recolectaron en la parroquia rural de Totoras del cantón Ambato de la provincia de Tungurahua en las coordenadas 1°21'49'.9"S12°29'22.5"W, posterior a la autorización del Ministerios del Ambiente y Agua. El material vegetal se trasladó y almacenó en bolsas ziploc hasta su uso en los laboratorios de la Unidad Operativa de la dirección de Investigación y Desarrollo (UODIDE) de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

#### **2.3.2. Preparación del material vegetal**

Las hojas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5 % y agua por 5 minutos, y se enjuagaron con abundante agua. Posteriormente, se secaron en una estufa a 55 °C durante

3 días, y se trituraron hasta obtener un pulverizado, mismo que se almacenó en bolsas ziploc.

### **2.3.3. Extracción hidroalcohólica de las hojas**

Para la extracción de las hojas de pumín, se implementó el método descrito **Das et al.(2020)** con ciertas modificaciones. Se pesó material vegetal y se mezcló en etanol 70 % en proporción 1: 10 durante 48 h, a temperatura ambiente y con períodos cortos de agitación. Posteriormente, se utilizó papel filtro para separar el material vegetal. Para obtener el extracto se separó el solvente con ayuda de un rotavaporador a una temperatura de 55 °C. El extracto obtenido se almacenó a 4 °C hasta su posterior análisis.

### **2.3.4. Análisis de Tamizaje Fitoquímico**

Para el análisis cualitativo de metabolitos secundarios del extracto de pumín se siguió la metodología de **Garcia et al., (2020)** y **Abubakar & Haque, (2020)**. que se detalla a continuación:

#### **2.3.4.1. Ensayo de Dragendorff**

En un tubo de ensayo se colocó 1 mL del extracto y 1 mL del reactivo de Dragendorff (solución de yoduro de bismuto y potasio) que, tras la homogenización, se observó y se verificó si la prueba es positiva para alcaloides al obtener un precipitado rojo anaranjado.

#### **2.3.4.2. Ensayo de espuma**

Con 1 mL de la muestra se diluyó 5 veces en agua destilada, se agitó fuertemente por 5 minutos y la formación de espuma de aproximadamente 2 mm demostró la presencia de saponinas.

#### **2.3.4.3. Ensayo de Shinoda**

Se colocó en un tubo de ensayo 1 mL del extracto, ácido clorhídrico concentrado, al igual que segmentos pequeños de cinta de magnesio metálico. Esto se mantuvo en reposo durante 5 minutos y se añadió 1 mL de alcohol amílico. La presencia de Flavonoides se verificó al visualizar el cambio de color de la solución a una tonalidad amarilla o rojo intenso.

#### **2.3.4.4. Ensayo de Cloruro férrico**

En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, 3 gotas de tricloruro férrico al 5 % y se agitó. La coloración de la reacción negro azulado indicó la presencia de fenoles.

#### **2.3.4.5. Ensayo de Gelatina**

Se añadió en un tubo de ensayo 1 mL del extracto y una solución de gelatina al 1 % y se procedió a agitar. La formación de un precipitado blanco indicó la presencia de taninos.

#### **2.3.4.6. Ensayo de Borntrager**

Se disolvió en 1 mL de cloroformo en el extracto, luego se incorporó 1 mL de hidróxido de Sodio al 5 % y se agitó hasta mezclar las fases. Se dejó reposar hasta que la separación de fases fue visible. Si en la fase alcalina se observa de una coloración rojo o rosado, la prueba es positiva para quinonas.

#### **2.3.4.7. Ensayo de Acetato de Cobre**

Se disolvió el extracto en agua destilada y se le añadió 3 gotas de acetato de cobre. La prueba dio positiva para diterpenos cuando la coloración de la solución es verde esmeralda.

### **2.3.5. Determinación de fenoles totales**

Se realizó este ensayo mediante el método de Folin y Ciocalteu, por lo que en una placa de 96 pocillos se mezclaron 10  $\mu\text{L}$  del extracto de Pumín con 130  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Posteriormente, se añadió 10  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N y se almacenó durante 6 minutos. Después, se añadió 100  $\mu\text{L}$  de una solución de carbonato de sodio al 7 % y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente con restricción a la luz para luego medir la absorbancia a 750 nm. Se empleó una curva estándar preparada con soluciones seriadas de ácido gálico (GAE) que varía de 10 a 100 mg/L. Los análisis se realizaron por sextuplicado y el contenido fenólico total se expresó como equivalente de miligramos de ácido gálico por gramo de peso seco de la muestra (mg GAE/g PS) (**Baek et al., 2021**)

### **2.3.6. Determinación de flavonoides totales**

Se empleó el método descrito por **N'guessan et al., (2021)** con ciertas modificaciones en donde inicialmente se mezcló en una placa de 96 pocillos, 60  $\mu\text{L}$  del extracto con 120  $\mu\text{L}$  de cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) al 2 %. La solución se incubó durante 60 minutos y se midió la absorbancia a 420 nm. La curva estándar se realizó utilizando soluciones de quercetina en serie (QE) que varían de 10 a 100 mg/L. Los resultados se expresaron como equivalentes de miligramos de quercetina por gramo de peso seco de muestra (mg QE/g PS).

### **2.3.7. Capacidad antioxidante**

Para la determinación de la actividad antioxidante se siguió la metodología de captación de radicales libres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) en microplaca de 96 pocillos descrita por **Bobo et al., (2019)** con algunas modificaciones: Se preparó una solución madre de DPPH de concentración 150  $\mu\text{M}$ , con 0,0059g de DPPH en 100 mL de una solución metanol-agua que fue agitada de 30 a 40 min. Así también, se utilizó como estándar una solución madre de Trolox a 500  $\mu\text{M}$  para generar una curva de calibración, para ello se disolvió 0,0125 g de Trolox en 100 mL de una solución metanol-agua (50:50) y se agitó. A partir de la solución madre del Trolox, se preparó diluciones a diferentes



concentraciones. En una placa de 96 pocillos, se añadió el blanco, control y el extracto de estudio. Cada uno se preparó de siguiente manera:

**Blanco:** 180 µL del diluyente DPPH (metanol-agua, 80:20) + 20 µL agua destilada

**Control:** 180 µL de la solución DPPH + 20 µL agua destilada

**Extracto:** 180 µL de la solución DPPH + 20 µL extracto diluido

Una vez preparada la placa se agitó y se cubrió con papel aluminio. Posteriormente, se dejó reposar por 40 minutos a temperatura ambiente en un lugar oscuro. Finalmente, se midió la absorbancia a 515 nm con un espectrofotómetro. Se determinó el porcentaje de inhibición de DPPH mediante la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición\ DPPH = \left[ 1 - \frac{(A_m - A_b)}{(A_c - A_b)} \right] * 100$$

**Ecuación 1.** *Porcentaje de inhibición de DPPH*

$A_m$ : Absorbancia de la muestra

$A_b$ : Absorbancia del blanco

$A_c$ : Absorbancia del control

### **2.3.8. Actividad antimicrobiana por difusión en agar**

Para la activación y estandarización McFarland de las cepas bacterianas se siguió el método descrito por **Balouiri et al., (2016)** basado en la estandarización de difusión en agar por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), con ciertas modificaciones. Para ello, se empleó *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 como patógeno bacteriano Gram positivo. Se activó la cepa con 5 mL Caldo Mueller-Hinton (MH), se incubó bajo condiciones estándar durante 24 horas. Posteriormente, se ajustó la turbidez resultante del cultivo hasta llegar a la turbidez estándar de 0,5 McFarland.

### 2.3.9. Difusión en pozos de agar

El cultivo bacteriano se inoculó por toda la superficie de la caja Petri con agar Mueller-Hinton (MH) con hisopos estériles. Luego, se realizó 4 secciones en la caja Petri, dos de ellas a concentración 50 µg/mL y las otras a 100 µg/mL. Posteriormente, se realizaron tres pozos por cada sección, en el que se agregó 50 µL del extracto. Además, se tuvo como control positivo (gentamicina y vancomicina) y un control negativo (agua destilada estéril). Se incubó a 37 °C por 24 horas (Osés et al., 2021). Se midió el halo de inhibición en milímetros (mm) y se calculó el porcentaje de inhibición antimicrobiana con la ecuación descrita a continuación:

$$\%Inhibición = \left( \frac{\phi HE - \phi HB}{\phi HC - \phi HB} \right) * 100$$

**Ecuación 2.** *Porcentaje de inhibición antimicrobiana*

$\phi HE$ : Diámetro del halo extracto

$\phi HB$ : Diámetro del halo blanco

$\phi HC$ : Diámetro del halo control

## 2.4. Elaboración de ABs

### 2.4.1. Obtención de quitosano y colágeno

El colágeno que se utilizó para la elaboración de los ABs será de tipo 1 y 2 mismo que fue obtenido de manera comercial descrito como colágeno natural transparente. Este fue donado por PhD. Orestes López Docente- Investigador de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. En cuanto al quitosano también se obtuvo de manera comercial con un grado de desacetilación de 90 %. Este fue donado por el PhD. Irvin Tubón Docente- Investigador de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. Para la elaboración de los ABs se siguió la metodología descrita por **Martínez et al., (2015)** y **Offeddu et al., (2016)** con algunas modificaciones:

#### 2.4.2. Preparación de la solución de PBS y ácido acético

Se disolvió una pastilla de PBS en 100 mL de agua destilada. Para la solución de ácido acético se tomaron 10 mL y se aforaron en 350 mL de agua destilada.

#### 2.4.3. Preparación de solución híbrida de quitosano y colágeno (CQ)

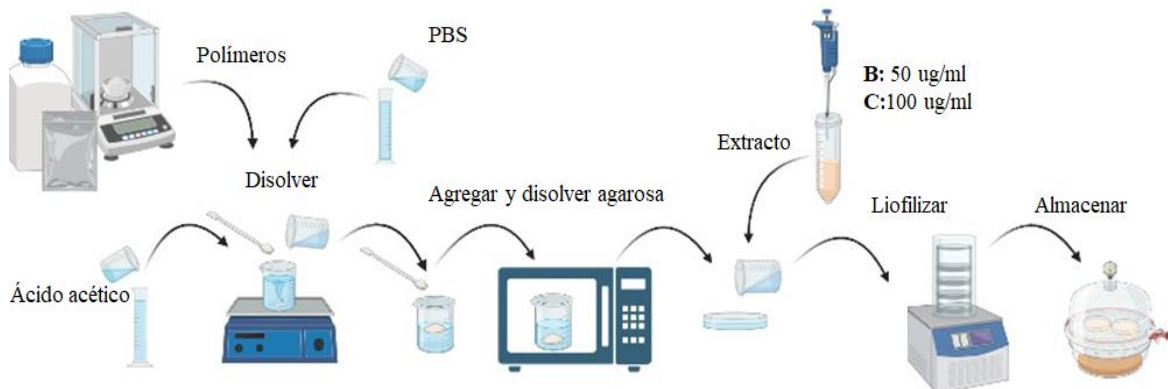
Los biopolímeros se disolvieron en ácido acético 0.5M, en una concentración del 1 % p/v. Se añadió la solución de PBS con agarosa a 0,5 %. Se disolvió la agarosa empleando un microondas en intervalos de 20 segundos evitando la ebullición.

#### 2.4.4. Preparación de la solución híbrida de quitosano, colágeno y extracto (CQ+EECT)

Se disolvió colágeno y quitosano en ácido acético 0.05 M. Una vez disuelto se agregó la solución de PBS y agarosa. Tras disolverse la agarosa, se añadió el extracto vegetal a diferente concentración (50 y 100 µg/mL).

#### 2.4.5. Formación de ABs

Las mezclas se vertieron en cajas Petri y se llevaron a refrigeración y ultracongelación por 24 h a -18 °C. Finalmente se liofilizaron a -40 °C por 24 horas, y se colocaron en un desecador hasta su posterior uso, tal como se muestra en la figura 4.



*Figura 4. Elaboración de ABs*

Los ABs obtenidos fueron: colágeno y quitosano (CQ) y ABs con extracto (CQ+EECT) a 50 µg/mL y 100 µg/mL

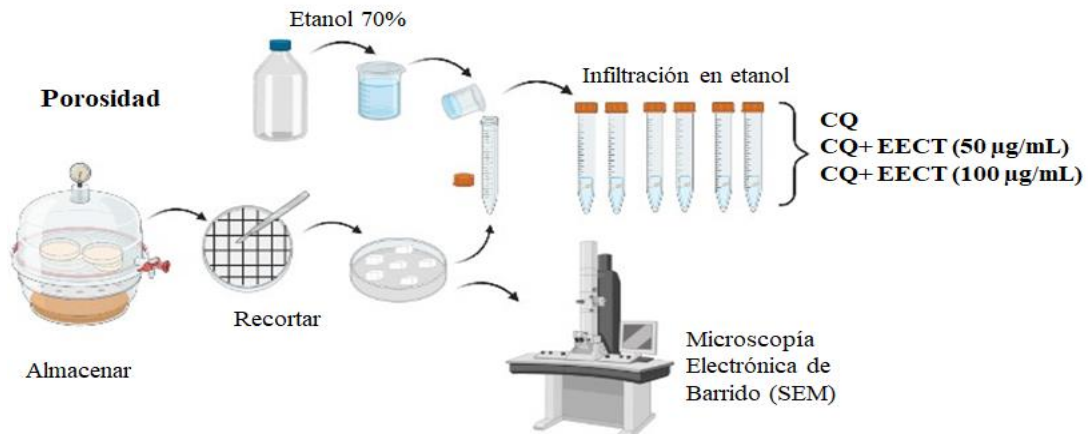
## 2.5. Evaluación de las propiedades de los ABs

### 2.5.1. Evaluación morfológica

Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se obtuvieron imágenes de la superficie de los ABs. Para ello se preparó la muestra en un soporte de aluminio y se pulverizó con una alineación de oro para disipar las cargas estáticas. Por otro lado, la porosidad se calculó con el método de infiltración de etanol, utilizando el peso seco de los andamios ( $W_s$ ), la densidad del biomaterial ( $p_1$ ), la densidad del etanol ( $p_2$ ) y el peso final ( $W_f$ ). Este valor se obtuvo de pesar los andamios después de estar sumergidos 24 h en etanol (Nocera et al., 2018). Se repitió por sextuplicado con cada uno de los ABs

$$Porosidad(\%) = \frac{(w_f - w_s)p_1}{p_1w_f + (p_2 - p_1)w_s} * 100$$

**Ecuación 3. Porcentaje de porosidad**



**Figura 5. Esquema de la evaluación morfológica de los ABs**

### 2.5.2. Evaluación de la capacidad de absorción de agua

Los ABs se recortaron en secciones de 1 cm<sup>2</sup>, se pesaron para obtener el peso seco ( $W_s$ ) y se sumergieron en agua destilada por 6 horas. Cada 30 minutos se pesaron los ABs para

obtener el peso húmedo ( $W_h$ ). La capacidad de absorción de agua se obtuvo mediante la siguiente fórmula descrita por **Pipattanawarothai et al.,(2017)** :

$$\text{Capacidad de absorción} = \frac{W_h - W_s}{W_s} * 100$$

**Ecuación 4.** *Capacidad de absorción*

### 2.5.3. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

Se llenaron tubos falcón de 50 mL con 10 g de gel sílice (0 %  $RH_1$ ). Posteriormente, se cubrieron con la muestra de andamio a modo de tapa. El sistema se selló y colocó en un desecador que contenía una solución saturada de Cloruro de Sodio (NaCl) en agua en proporción 4:10 (75 %  $RH_2$ ). El sistema se mantuvo a temperatura ambiente, en donde se bloqueó la entrada de vapor de agua al interior del matraz y se pesaron cada hora durante 8 h. La WVP se calculó usando la siguiente ecuación (**Sobral et al., 2001**).

$$WVP = \frac{WVTR * e}{P_o(RH_1 - RH_2)}$$

**Ecuación 5.** *Permeabilidad al vapor de agua*

$WVTR$ : Tasa de transmisión de vapor de agua

$e$ : Espesor medio del andamio antes de la prueba

$P_o$ : Presión de vapor de saturación a 25 °C

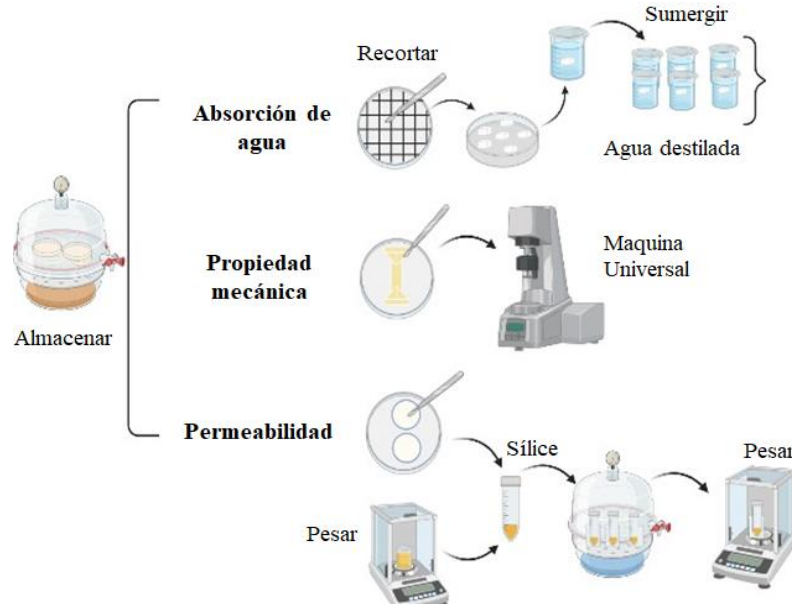
$RH_1 - RH_2$ : Diferencia entre la humedad relativa del gel de sílice y solución de NaCl

La tasa de transmisión de vapor de agua ( $WVTR$ ) es la pendiente de la curva de cambio de masa en función del tiempo (g/h). Las mediciones se realizaron por triplicado.

### 2.5.4. Evaluación Mecánica

Las propiedades mecánicas de los ABs fueron evaluadas tanto en resistencia a la tracción (MPa), alargamiento a la rotura (%) y rotura de desplazamiento como también el módulo

elástico (mm), para ello se tomaron las medidas de acuerdo a las condiciones de ASTM D 882–88 (Instron Universal Testing). Se recortaron segmentos de ABs CQ y CQ+EECT a 50 y 100 µg/mL Este proceso se realizó por triplicado (**Ramanathan et al., 2017**).



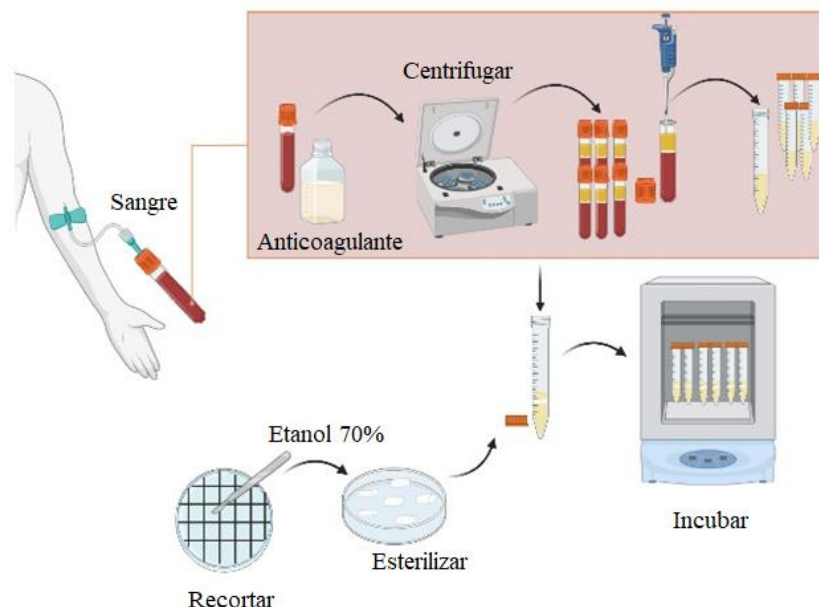
**Figura 6.** Esquema de las evaluaciones físicas

### 2.5.5. Evaluación de Biodegradabilidad

Los ABs se cortaron con un bisturí de un tamaño de 1 cm<sup>2</sup>, se pesaron (Ws) y se colocaron en plasma sanguíneo durante un periodo de 18 días. Los ABs fueron previamente esterilizados con etanol durante 5 minutos y enjuagados con una solución de PBS. Las mediciones se realizaron en los días 2,4,7 hasta los 18 días cambiando el plasma sanguíneo después de cada medición (Wf) (**Gholizadeh et al., 2017**).

$$\%Biodegradabilidad = \frac{W_s - W_f}{W_s} * 100$$

**Ecuación 6.** Porcentaje de biodegradabilidad



**Figura 7.** Proceso de evaluación de biodegradación

### 2.5.5.1. Difusión en pozos de agar

El cultivo bacteriano se inoculó por toda la superficie de la caja Petri con agar Mueller-Hinton (MH) con hisopos estériles. Luego, se realizó tres secciones en la caja Petri y en cada uno se colocaron los ABs a las diferentes concentraciones del extracto. Los ABs fueron esterilizados con etanol y enjuagados con PBS. Además, se tuvo como control positivo (gentamicina y vancomicina) y un control negativo (agua destilada estéril). Esto se incubó a 37 °C por 24 horas (Osés et al., 2021). Se midió la zona de inhibición en mm y se calculó el porcentaje de inhibición antimicrobiana con la ecuación descrita a continuación.

$$\%Inhibición = \left( \frac{\varnothing HE - \varnothing HB}{\varnothing HC - \varnothing HB} \right) * 100$$

**Ecuación 7.** Porcentaje de inhibición antimicrobiana

$\varnothing HE$ : Diámetro del halo extracto

$\varnothing HB$ : Diámetro del halo blanco

$\varnothing HC$ : Diámetro del halo control

## **2.6. Análisis de resultados**

Para el análisis se realizó una comparación de medias, con el fin de observar a través de graficas los resultados concernientes a las evaluaciones del: porcentaje de porosidad, biodegradabilidad, absorción de agua, entre otros. Además de determinar la eficacia de los ABs CQ+EECT con respecto a los ABs CQ.



## CAPITULO III.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1.Análisis y discusión de los resultados

#### 3.1.1. Caracterización del extracto etanólico

##### 3.1.1.1.Rendimiento de los extractos

Existen diferentes factores que influyen en el porcentaje de rendimiento como la técnica de extracción, el solvente utilizado y las condiciones de extracción. Dentro de las técnicas de extracción se debe considerar; la duración y la estabilidad al calor (**Abubakar & Haque, 2020**). Por otra parte, el solvente utilizado depende del tipo de planta, la parte a extraer y la naturaleza de compuestos bioactivos (**Zhang et al., 2018**). Razón por la cual el extracto se obtuvo empleando la técnica de maceración, esto debido a la presencia de compuestos termolábiles como alcaloides y flavonoides los cuales presentan propiedades antioxidantes y antiinflamatorias en el género *Clinopodium* (R. Chen et al., 2015).

El rendimiento de la extracción de las hojas de Pumín fue de 11,34 % que en comparación con estudios realizador por **Culqui, (2017)** y **Tubon et al., (2020)** fueron similares, ya que se obtuvo rendimientos de 11,66 % y 5,35 % respectivamente. En las investigaciones mencionadas, al igual que el proyecto de investigación, se empleó etanol como solvente debido a su baja toxicidad, baja cantidad de calor para concentrar el extracto y afinidad por los compuestos polares (**Abubakar & Haque, 2020**). Las condiciones de extracción tales como la temperatura, tiempo de extracción y la relación solvente-planta también pueden influir en el rendimiento del extracto tal como se evidencia en la investigación realizada **Tubon et al., (2020)**.

##### 3.1.1.2.Determinación de metabolitos secundarios

El género *Clinopodium* es abundante en compuestos biológicamente activos como polifenoles, flavonoides, triterpenos, saponinas triterpenoides, quinonas diterpenoides, alcaloides y tatinos (**Castillo, 2020**). Estos compuestos bioactivos se han evidenciado en especies como *C. nubigenum*, *vulgare* y *chinense* (**Petrova et al., 2023**). Según **Zhu et**

**al., (2018)** estos compuestos exhiben diversas actividades biológicas incluyendo actividades antiinflamatorias, antibacterianas e inmunosupresoras. Así también **Petrova et al., (2023)** menciona que los metabolitos secundarios se este género se encuentran principalmente en las partes aéreas de la planta, razón por la que se realizó la extracción de las hojas.

**Tabla 1.** *Metabolitos secundarios identificados de los extractos de Pumín*

<b>Ensayo</b>	<b>Metabolitos</b>	<b>Extracción con Etanol al 70%</b>
Wagner	Alcaloides	++
Dragendorff	Alcaloides	++
Mayer	Alcaloides	+
Fehling	Azucares reductores	++
Cloruro Férrico	Fenoles	++
Lieberman	Triterpenos	+
Borntrager	Quinonas	+
Shinoda	Flavonoides	+
Espuma	Saponinas	++
Gelatina	Taninos	++
Antocianina	Antocianina	+
Acetato de cobre	Diterpenos	++

El signo (+/-) significa presencia y ausencia respectivamente; Intensidad del metabolito: Alta (+++), Media (++) , Baja (+)

El análisis fitoquímico de pumín (Tabla 1) evidencio la presencia abundante de saponinas, flavonoides, fenoles y taninos, una cantidad baja de alcaloides y quinonas además de la ausencia de diterpenos. Los resultados obtenidos son similares a los realizados **Vélez, (2019)** y **Castillo, (2020)**, esto puede deberse a la diferencia de parámetros en los pasos preliminares de preparación de la materia prima, como el secado y la molienda. Factores que también pueden influir en el contenido fitoquímico de los extractos finales obtenidos.

Esta fase de preparación de la muestra es crucial, ya que se pretende reducir la pérdida de los componentes activos presentes en el extracto (Krakowska et al., 2022).

### 3.1.1.3. Determinación de la actividad antioxidante

Los antioxidantes son compuestos capaces de bloquear o ralentizar la producción de radicales libres, mismos que tienen un impacto negativo en el organismo (Siddeeg et al., 2021). La producción excesiva de radicales libres produce un estrés oxidativo, que en consecuencia genera trastornos como: diabetes, cáncer, envejecimiento prematuro preeclampsia, Alzheimer y Parkinson (Munteanu & Apetrei, 2021). Los antioxidantes de origen natural se encuentran presentes en alimentos y plantas medicinales, especialmente en compuestos polifenólicos, llegando a ser antiinflamatorios y anticancerígenos (Xu et al., 2017). De este modo, pumín al ser una planta empleada en la medicina ancestral podría ser una fuente de antioxidantes (Munteanu & Apetrei, 2021).

La actividad antioxidante del extracto se llevó a cabo mediante la técnica de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). Donde se obtuvo un valor de 76,87 %  $\pm$  2,60 y 430,76  $\mu$ mol Equivalente Trolox/L (Tabla 2). En una investigación realizada por Sarikurkcu et al., (2015) se expone un valor similar de 78,65 %. Esto se atribuye al solvente empleado, el metanol a diferencia del etanol es el segundo compuesto más polar después del agua, por lo que brinda una mayor extracción de los metabolitos secundarios, razón por la que el porcentaje que se muestra es mayor.

**Tabla 2.** Capacidad antioxidante de pumín

Matriz vegetal	% de inhibición	Umol Equivalente Trolox/L
Hoja	76,87 $\pm$ 2,34	430,76 $\pm$ 13,34

**Vladimir et al., (2014)** expone en su estudio enfocado en las diferentes especies de la familia Lamiaceae, que la capacidad antioxidante oscila en un rango desde  $254,97 \pm 2,68$  hasta  $855,78 \pm 6,12$   $\mu\text{mol}$  Equivalente Trolox/L para *Acinos arvensis* y *Melisa officinalis* respectivamente. Dentro del mismo estudio también se determinó la capacidad antioxidante de *Clinopodium vulgare* que presentó valores similares con  $473,62 \pm 1,53$   $\mu\text{mol}$  Equivalente Trolox/L. A diferencia de lo reportado por **Tusevski et al., (2014)** que presenta valores de  $213 \pm 17,65$   $\mu\text{mol}$  Equivalente Trolox/L. La diferencia de resultados se debe a varias causas entre ellas: la sección de la planta empleada, el método de extracción, la madurez de la planta, el almacenamiento y procesamiento Este último se ve afectado por la exposición solar, el calor y la humedad que pueden degradar los compuestos, disminuyendo de tal forma su actividad (**Zargoosh et al., 2019**).

#### **3.1.1.4. Determinación de Fenoles y flavonoides totales**

En los últimos años, se han llevado a cabo numerosos estudios epidemiológicos centrados en los compuestos bioactivos. Uno de ellos los fenoles y flavonoides que, debido a sus múltiples beneficios a la salud, son capaces de atacar a los radicales libres (**Alara et al., 2020**). Para la determinación de fenoles y flavonoides totales se realizó una curva de calibración estándar de ácido gálico y quercetina respectivamente (ANEXO B). Los resultados se obtuvieron a partir de la regresión lineal de la curva estándar. Los valores se expresaron mg equivalentes de peso seco.

El contenido de fenoles totales de pumín fue  $67,35 \pm 4,12$  mg GAE/g peso seco, mientras que el contenido de flavonoides totales fue  $17,84 \pm 0,72$  mg QE/g peso seco (Tabla 3). En una investigación realizada por **Tusevski et al., (2014)** menciona que, *Clinopodium Vulgare* posee un contenido de fenoles totales similares al obtenido con  $57,07$  mg GAE/g, a diferencia del contenido de flavonoides de  $46,33$  mgQE/g que difiere de manera significativa. En pumín se han registrado valores de fenoles y flavonoides totales de  $13,366$  mgGAE/g y  $1,68$  mgQE/g respectivamente (**Culqui, 2017**). La disparidad de los resultados se debe a la recuperación de metabolitos asociado al proceso de extracción,

mismo que incluye parámetros como el tiempo, temperatura y concentración del solvente (Azahar et al., 2017).

**Tabla 3.** Contenido de fenoles y flavonoides totales presentes en pumín

<b>Disolvente</b>	<b>Fenoles totales</b>	<b>Flavonoides totales</b>
<b>Concentración 1:10</b>	<b>(mg GAE/g)</b>	<b>(mgQE/g)</b>
Etanol al 70%	67,35 ± 4,12	17,84 ± 0,72

Según Alara et al., (2020) la extracción mediante métodos convencionales como maceración incluyen un tiempo prolongado de recuperación y por ende en una menor calidad de fenoles y flavonoides, lo que explica la menor cantidad de metabolitos encontrados. Así también, Tyskiewicz et al.,(2018) menciona el impacto de la temperatura durante la extracción, tomando en consideración que tanto los fenoles como flavonoides son compuestos termolábiles. De tal forma, que la temperatura óptima de extracción va de 40 a 60°C, superiores a estas temperaturas pueden ocurrir dependiendo de la naturaleza del compuesto una degradación. Otra variable que afecta la calidad de los componentes bioactivos es el estado de madurez, junto con las condiciones de crecimiento de la planta. En este sentido, el contenido de fenoles y flavonoides tienden a aumentar durante el desarrollo temprano de la planta y puede variar en concentración en diferentes etapas de su crecimiento (Nurzyńska, 2023).

### **3.1.2. Evaluación microbiológica de la concentración de extracto**

Las plantas medicinales contienen varios fitoquímicos como flavonoides, alcaloides, taninos y terpenoides. Los metabolitos secundarios poseen propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Propiedades que son de gran interés en el descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos, debido a la resistencia de antibióticos. *Staphylococcus aureus*, es una bacteria patógena, con alta resistencia a antibiótico. Este microorganismo se encuentra involucrado en las infecciones cutáneas, llegando a provocar complicaciones más graves

como infecciones en la sangre o infecciones sistémicas (Elisha et al., 2017; Gonelimali et al., 2018) .

En este contexto, se empleó *S. aureus* para evaluar las propiedades antimicrobianas del extracto etanólico de pumín (EECT) a concentraciones de 50 y 100 µg/mL. Los resultados obtenidos revelaron que el extracto etanólico suprimió de manera eficiente el crecimiento de *S. aureus*. Como se indica en la tabla 4, la concentración de 100 µg/mL presentó un valor de inhibición frente a la concentración de 50 µg/mL de 12,22±0,51 mm. Mientras que, la concentración de 50 µg/mL presentó una inhibición de 10,33±0,33 mm. Estos datos fueron confirmados por Tubon et al., (2020) en un estudio realizado en pumín, donde las concentración con mayor inhibición dieron a 50 a 100 µg/mL. La inhibición se da por la diversidad de compuestos como alcaloides, flavonoides, terpenoides, taninos que puede utilizarse como alternativa o complemento a los antibióticos convencionales (Khameneh et al., 2021).

**Tabla 4.** Halos de inhibición del extracto de pumín

Extracto (EECT)	Concentración (µg/mL)	Halos de inhibición (mm)
		<i>S. aureus</i>
	50	10,33±0,33 <sup>a</sup>
	100	12,22±0,51 <sup>b</sup>
Hoja	Vancomicina	17,00±0,33 <sup>c</sup>
	Gentamicina	25,56±0,19 <sup>d</sup>
	Control -	0

**EECT:** Extracto etanólico de pumín **Controles+:** Vancomicina y gentamicina **Control -:** Agua destilada. Las letras a,b,c,d indican la diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95%

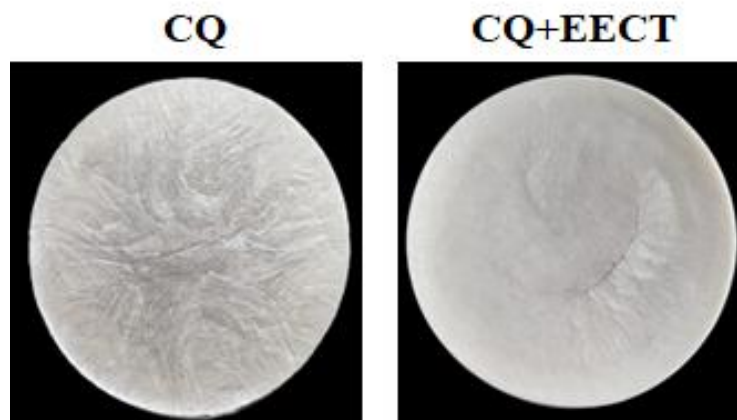
Estos compuestos ejercen actividades antimicrobianas a través de diferentes mecanismos que incluyen: la alteración estructural de la célula bacteriana, aumento de la permeabilidad celular y fuga de componentes celulares, además de la alteración en la pared y membrana celular bacteriana. Por lo que los fitoquímicos pueden inhibir la síntesis de peptidoglicanos, dañar las estructuras de la membrana y modificar la hidrofobicidad de la superficie bacteriana. Los compuestos fenólicos, que se producen a concentraciones altas muestran una actividad prometedora contra bacterias patógenas. Sin embargo, la actividad de los fenoles es generalmente débil y a menudo no específica. Los flavonoides, a su vez, pueden promover la formación de proteínas inhibir las proteínas de la pared celular, así como el metabolismo y síntesis de ADN (**Cheesman et al., 2017; Monte et al., 2014**)

Así también las bacterias Gram positivas suelen ser más susceptibles a los terpenos que las Gram negativas. Adicionalmente, los monoterpenos (una clase de terpenos) presentan actividad antibacteriana, estudiada en las últimas dos décadas. Varios estudios afirman que el timol y el carvacrol (monoterpenoides fenólicos) son capaces de inhibir el crecimiento de muchas bacterias. También, se ha demostrado que los taninos inducen el daño a la membrana bacteriana y la activación del metabolismo (**Barbieri et al., 2017; Khameneh et al., 2021**). En este sentido, la inhibición se produjo a causa de los metabolitos secundarios inmersos en el extracto a diferentes concentraciones, donde la concentración mayor tendrá mayor cantidad de compuestos bioactivos (Tabla4)

### **3.1.3. Elaboración de ABs**

Hasta el momento se han empleado diversas tecnologías de fabricación de ABs, desde la fundición con disolvente hasta la técnica de electrohilado, todo esto con el propósito de desarrollar estructuras a partir de componentes herbales (**Agarwal et al., 2021**). En este proyecto de investigación, se elaboró andamios mediante la técnica de liofilización empleando extracto de Pumín a concentraciones de 50 y 100 µg/mL (**Figura 5**), tomando como referencia de control ABs CQ, realizados en una investigación previa por **Guáitara & Núñez, (2022)**.

En los ABs de la Figura 8 se muestra una diferencia evidente de color entre CQ y CQ+EECT. Adicionalmente para los ABs CQ, se observó secciones húmedas o más cristalinas en la parte central. Los parámetros de procesamiento como la temperatura, presión y tiempo dentro de la técnica de liofilización permiten preservar la estructura del andamio y con ello su funcionalidad (Agarwal et al., 2021). La liofilización conserva la estabilidad de los ABs sobre todo aquellos que contiene factores de crecimiento, proteínas u otros componentes bioactivos que son importantes para generar un crecimiento y proliferación celular (Nitti et al., 2021).



**Figura 8.** *ABs liofilizados*

**CQ:** Colágeno-quitosano; **CQ+EECT:** Colágeno-quitosano con extracto de pumín

En consecuencia, el uso del extracto de Pumín junto con sus propiedades antioxidantes son preservados, debido a que en la fase de ultracongelación se ralentiza los procesos de degradación y oxidación (Neri et al., 2020). Por lo que el color blanquecino podría ser parte de la conservación de los compuestos bioactivos.



### **3.1.4. Evaluación de las propiedades morfológicas, físicas y biológicas de los ABs**

#### **3.1.4.1. Evaluación morfológica de los ABs mediante Microscopia electrónica de Barrido (SEM)**

La arquitectura de los andamios, incluyendo el tamaño de los poros y las interconexiones contribuyen a la migración y organización celular (**Lutzweiler et al., 2020**). Según **Zhang et al., (2022)**, el tamaño del poro afecta el crecimiento celular por lo que la microscopia electrónica de barrido (SEM) se utilizó para evaluar la morfología y estructura superficial de las muestras liofilizadas.

En la figura 9, se presentan las imágenes SEM a 500  $\mu\text{m}$ , donde se evidenció una estructura superficial uniforme en cuanto a su textura. Sin embargo, en algunos ABs se observó rugosidades e irregularidades (CQ+EECT) que corresponden a las fibras y la distribución que estas poseen. En CQ se suele presentar estructuras de la capa superior laminar, resultados que fueron corroborados por **Tamburaci et al., (2023)**. Así también, se pudo visualizar a 200  $\mu\text{m}$  la presencia de poros en la superficie del andamio, del que se estimó valores promedio de  $55,27 \pm 4,70$ ;  $120,37 \pm 5,31$ ;  $100,45 \pm 5,89$   $\mu\text{m}$  para los ABs CQ, CQ+ EECT a 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. En ABs CQ se informan que los diámetros adecuados van de 80 a 150  $\mu\text{m}$  de longitud.

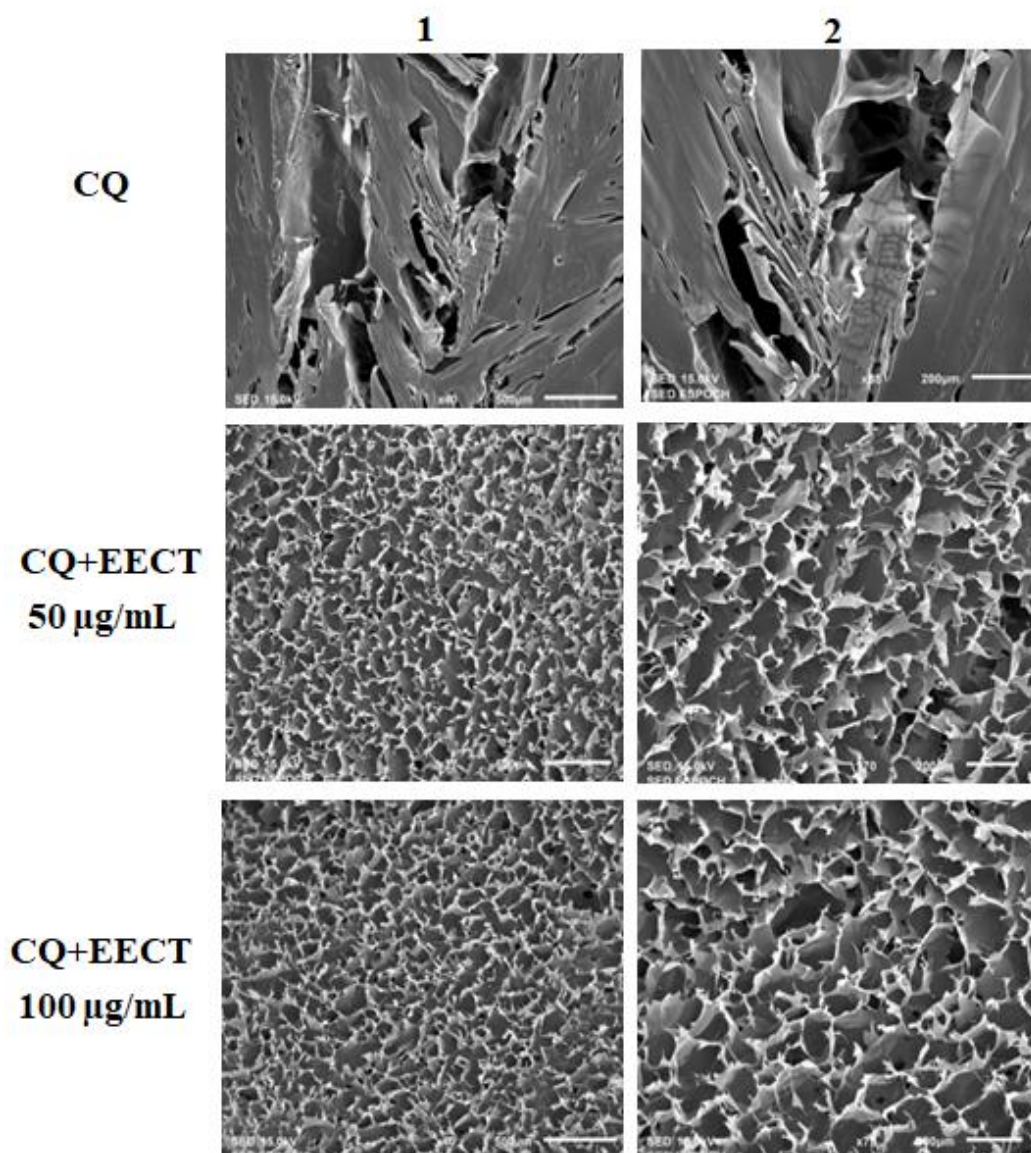
En las imágenes, si pudo distinguir la falta de homogeneidad en el tamaño de los poros, entre los ABs CQ+ EECT a 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ , de los cuales, CQ+ EECT (50  $\mu\text{g/mL}$ ) presenta mayor diversidad. Se ha documentado que, los ABs asimétricos tienen un mejor rendimiento con la construcción de piel (**Han et al., 2010; Ma et al., 2003**). Los poros más grandes facilitan la colonización celular e infiltración de nutrientes (sobre todo para los fibroblastos). Además de que permite una mayor migración celular e infiltración de vasos sanguíneos, lo que favorece a la vascularización del andamio. En cambio, en poros pequeños mejora la retención de células, que dan paso a un soporte adecuado para

queratinocitos que requieren un entorno estable para la formación de capas dérmicas (**Lutzweiler et al., 2020; Maji et al., 2016**).

En polímeros que presentan entrelazamiento como el colágeno generan un mayor intercambio de micronutrientes influyendo de tal manera en el destino de las células (**Matsiko et al., 2015; Ramanathan et al., 2017**). El colágeno, al ser una proteína fibrilar, tiene una estructura caracterizada por fibrillas. Las fibrillas interfieren en el tamaño de los poros ya que, ocupan cierto espacio y aumentan el tamaño del mismo (**Lutzweiler et al., 2020; Matsiko et al., 2015**). El colágeno es más propenso a la desnaturalización y degradación durante el proceso de liofilización, perjudicando así su estructura (**Kulda & Babuska, 2019**). Por lo que carece de una distribución y organización uniforme, tal como se presenta en la figura 9 para los ABs CQ+EECT.

Sin embargo, la presencia del quitosano ayuda mitigar la desnaturalización durante esta técnica. La adición de quitosano da como resultado una estructura de poros compacta, uniforme y más adecuada para la preparación de ABs. Por lo que puede facilitar la formación de poros y aumentar de tal manera la porosidad total. Los tamaños de los poros en ABs de quitosano oscilan de 70-120  $\mu\text{m}$  de longitud. En este sentido, el biomaterial utilizado puede influir en el crecimiento y la unión celular, más aún si se fabrican implantes 3D (**Stenhamre et al., 2011; Ma et al., 2003**).

Tomando en cuenta esto, los ABs CQ+EECT son más porosos y diversos en tamaño, esto se puede atribuir al extracto agregado. La interacción de los metabolitos secundarios como fenoles y flavonoides pueden formar enlaces e interacción químicas con los polímeros. Esto podría afectar a la formación de poros y organización de las fibrillas y posiblemente actuar como estabilizadores en el andamio (Figura 9) (**Jithendra et al., 2013; Perumal et al., 2018; Thongtham et al., 2020**).



**Figura 9.** *Imágenes SEM de los ABs*

**CQ:** Colágeno-quitosano, **CQ + EECT:** Colágeno-quitosano+ Extracto etanólico de pumín (50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ). En la columna 1 y 2 corresponden a la barra de escala de 500 y 200  $\mu\text{m}$ . Para las mediciones del tamaño de poro del andamio se realizó utilizando el software ImageJ de las imágenes a 200  $\mu\text{m}$

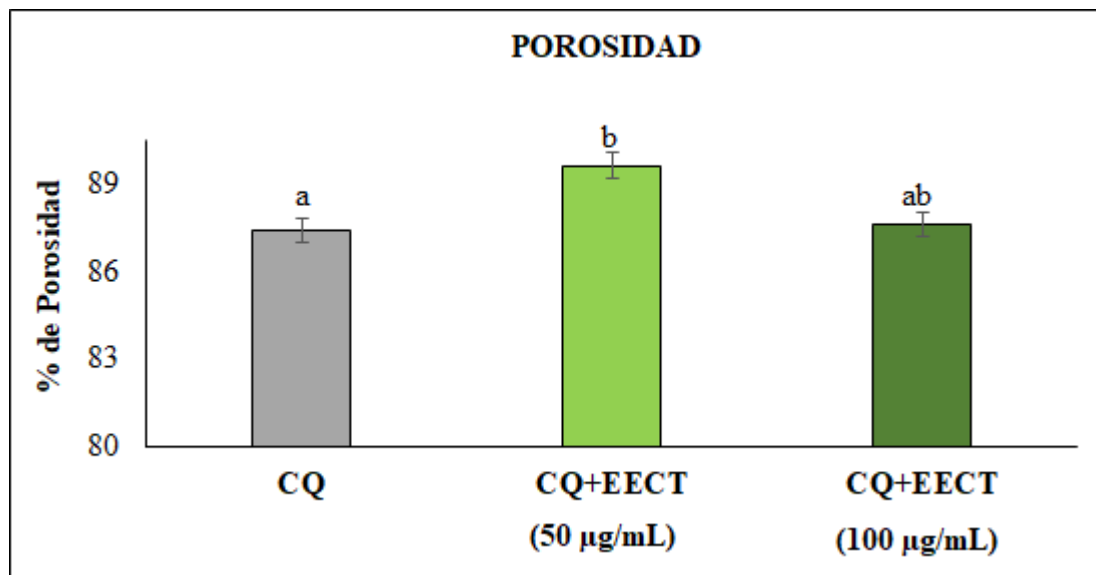
La longitud de los ABs óptimos varía entre 100-300  $\mu\text{m}$  para fomentar la difusión de nutrientes (Vesvoranan et al., 2022). En consecuencia, los valores de CQ+EECT (50  $\mu\text{g/mL}$ ) se encuentran dentro del rango establecido a excepción de CQ. Este factor puede cambiar dependiendo el tipo de tejido. Cabe mencionar que, el tamaño de entre 200 a 350  $\mu\text{m}$  son óptimos para que crezca tejido óseo (Murphy et al., 2010; Murphy & Brien,

**2010**). Por tanto, los ABs CQ+EECT (50 y 100 µg/mL) constan de una longitud y estructura optima en cuanto a diversidad de poros, siendo semejantes con respecto a la piel nativa, mejorando apariencia y funcionalidad del andamio.

#### **1.1.3.1.2. Evaluación de la porosidad**

Dentro del campo de la ingeniería de tejidos, es esencial que los ABs posean una porosidad elevada y una estructura de poros interconectados (**Archana et al., 2013**). Esto es fundamental para crear un entorno biológicamente favorable que permita la unión, proliferación y diferenciación celular (**Zhang et al., 2022**). Los ABs porosos facilitan la oxigenación y nutrición de la piel herida a través de la matriz extracelular (**Karuppuswamy et al., 2014**).

Para determinar el porcentaje de porosidad se realizó una infiltración en etanol para cada uno de los ABs, siendo los ABs CQ+EECT (50 y 100 µg/mL) con porcentajes más altos de 89,61 % y 87,60 % respectivamente, en comparación con el andamio CQ que posee un porcentaje de 87,39 % tal como se muestra en la figura 10. Los porcentajes obtenidos se atribuyen al método de liofilización, que durante la fase de congelación se generan cristales de hielo, que al ser sublimados dan lugar a la estructura porosa (**Merivaara et al., 2021**). Por ende la porosidad depende de ciertos factores de congelación entre ellos el gradiente de temperatura y la velocidad de enfriamiento (**Sutar et al., 2021**).



**Figura 10.** Porosidad de ABs liofilizados

**CQ:** Colágeno-quitosano, **CQ + EECT:** Colágeno-quitosano+ Extracto etanólico de pumín (50 y 100 µg/mL). Los ABs CQ tienen una porosidad de  $87,39 \pm 1,58$  % y CQ + EECT (50 y 100 µg/mL) tienen una porosidad de  $89,61 \pm 0,63$  % y  $87,60 \pm 0,72$  % respectivamente. Las letras diferentes encima de las barras indican diferencias significativas a un nivel de confianza del 95%.

Estos resultados coinciden con los de **Sutar et al., (2021)** que obtuvo un 90 % en ABs de *Croton oblongifolius*. Cabe destacar que los ABs con porosidades de entre 60-90 % son adecuados para la cicatrización de heridas (**Nosrati et al., 2021**). Tales como los registrados por **Veerasubramanian et al., (2018)**, que reporta valores de 74 % en extracto de *Avena sativa*. Se debe tener en cuenta, que tanto a porcentajes altos como bajos de porosidad soportan la unión temprana, difusión y proliferación, pero solo los ABs de alta porosidad soportan la migración e infiltración de células activas. Así también, **Radhika et al., (2020)** menciona, que la estructura de un andamio ideal para ingeniería de tejidos de la piel es aquella que tiene una porosidad mayor al 70 %. Por consiguiente, todos los ABs realizados son aptos para tejido epitelial.

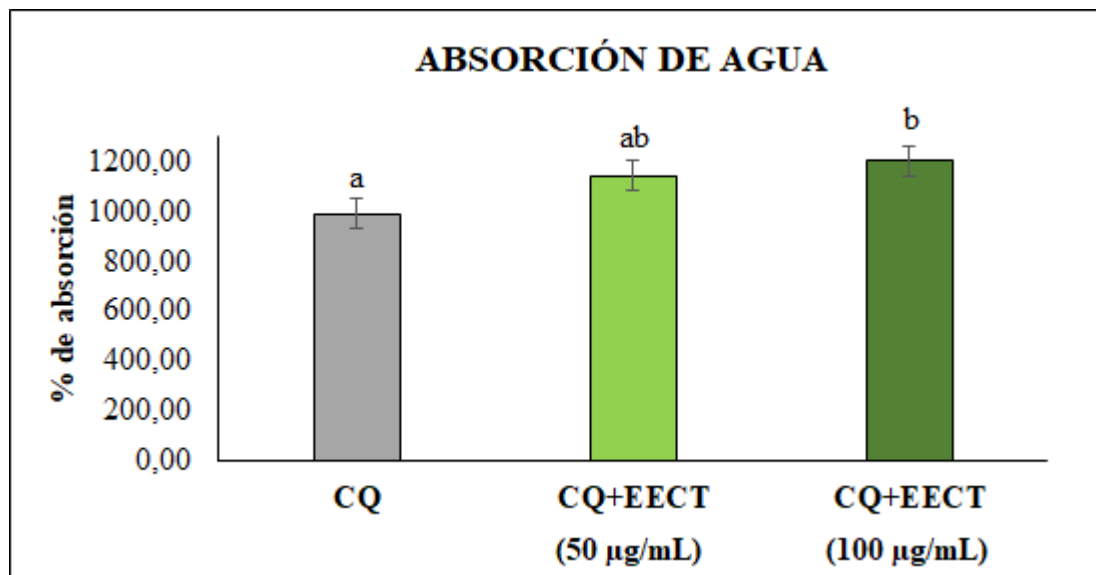
#### 3.1.4.2. Evaluación de la capacidad de absorción de agua

La capacidad de absorción de agua en los ABs permite captar y suministrar agua a las células inmersas en el andamio, lo cual es esencial para mantener la hidratación. La

hidratación celular da paso a la supervivencia y actividad metabólica de las células, favoreciendo a la regeneración tisular (**Morgado et al., 2015**). Esta característica está estrechamente relacionada con el transporte de nutrientes (permeabilidad), ya que actúa como un medio para la difusión de gases (**Nosrati et al., 2021**). La hidratación celular, el transporte de nutrientes y la capacidad de absorción de agua también contribuye a la estabilidad y la integridad estructural de los ABs

El porcentaje reportado en esta investigación se encuentra en la figura 11, con valores promedio de  $990,15 \pm 2,12$  %;  $1141,54 \pm 2,34$  %;  $1199,94 \pm 2,08$  % para CQ y CQ+EECT (50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ) respectivamente. La capacidad de absorción de agua de los ABs CQ+EECT fueron mejores que la obtenida por el andamio CQ. Estos resultados fueron confirmados por **Perumal et al., (2018)** y **Grabska et al., (2020)** que presentó porcentajes superiores a 1000% sobre todo en ABs con extracto de plantas medicinales. Es de gran relevancia mencionar, que en esa misma investigación se utilizó colágeno como biopolímero debido a su naturaleza hidrofílica. La estructura helicoidal de este polímero proporciona una matriz tridimensional con espacio para la retención de agua (**Kulda & Babuska, 2019**).

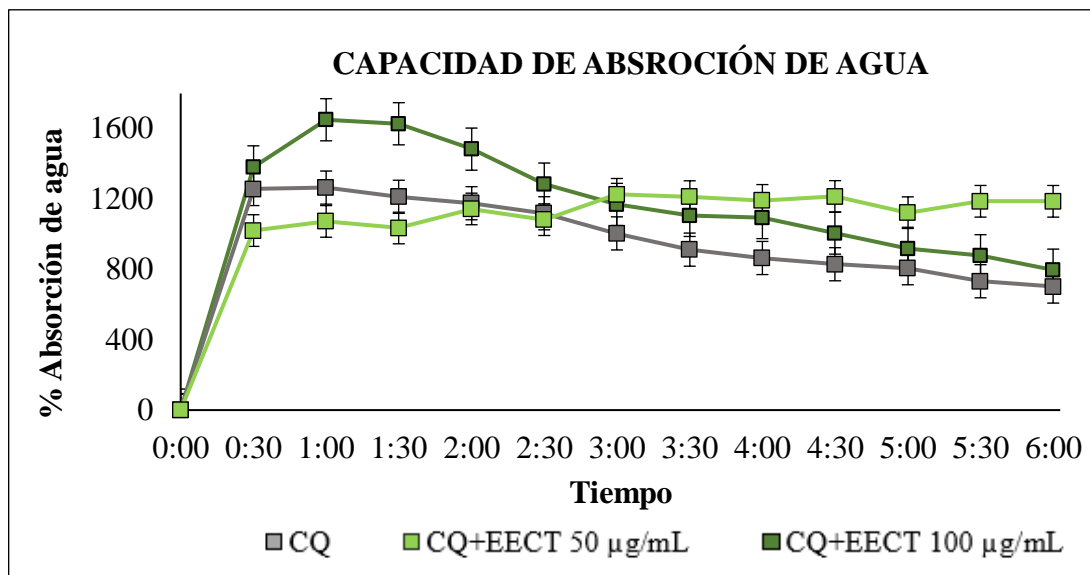
En cuanto al quitosano, se han reportado un hinchamiento máximo de 360 % datos que reportó **Stanescu et al., (2021)**, en el que se observó una mayor estabilidad. La estructura química rica en grupos hidroxilos y amino interactúan con las moléculas de agua, ocasionando una mayor penetración de moléculas en la matriz. No obstante, el grado de acetilación puede interferir en la prueba de hinchamiento, especialmente en presencia de agua, ya que, la proporción de grupos acetilos presentes en la cadena afecta la hidrofobicidad, lo que significa menor afinidad por el agua (**Sukpaita et al., 2021; Chatelet et al., 2001; Lim et al., 2021**). Por tanto, un grado de acetilación bajo (mayor cantidad de grupos amino), muestra mayor capacidad de absorción de agua. El grado de pureza (desacetilación) fue del 90 % siendo un factor determinante para la absorción de agua en los ABs.



**Figura 11.** Capacidad de absorción de agua

Los ABs tienen una capacidad de absorción promedio de  $990,15 \pm 2,12$  %;  $1141,54 \pm 2,34$  %;  $1199,94 \pm 2,08$  % para los ABs de colágeno y quitosano (CQ), Colágeno-quitosano + Extracto (CQ+EECT) a 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ . No hay diferencia significativa entre los ABS, por lo que sólo se identificó un grupo homogéneo (a).

Un andamio de piel ideal debe tener un porcentaje de absorción de 100 a 900 % para evitar la acumulación de líquidos con el fin de mejorar la formación de la nueva MEC (**Morgado et al., 2015**). En este sentido, todos los ABs realizados presentan valores promedio dentro del rango establecido. De hecho, en la figura 12 se pudo notar una estabilidad en CQ+EECT (50  $\mu\text{g/mL}$ ) a partir de la 3:00 hasta las 4:30 horas, lo que se puede atribuir a la adición del extracto de pumín y sus metabolitos, que fomentan las propiedades de absorción de agua en los polímeros.



**Figura 12.** Capacidad de absorción de agua

Resultados registrados durante 6 horas cada media hora para los ABs **CQ**: Colágeno-quitosano, **CQ + EECT**: Colágeno-quitosano+ Extracto etanólico de pumín (50 y 100 µg/mL).

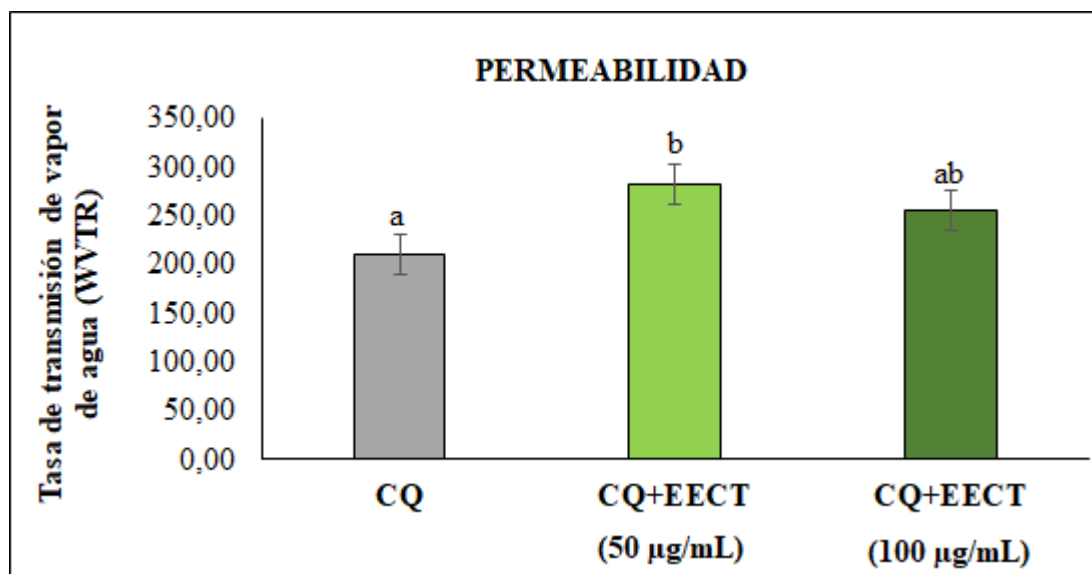
### 3.1.4.3. Evaluación de Permeabilidad del vapor de agua (WVR)

El método estándar ASTM E96 es el más utilizado para estudiar la WVR, considerando que la permeabilidad es una propiedad intrínseca del material. La tasa de transmisión de Vapor de agua (WVTR), tiene como propósito medir la cantidad de vapor de agua que puede pasar a través de un material, mediante un periodo de tiempo (Díaz et al., 2012). Las mediciones se realizan en base a condiciones controladas de temperatura y humedad. En donde el andamio debe poseer un cierto control de humedad para brindar un ambiente adecuado en el crecimiento de las células (Cazón et al., 2022). Así también, la permeabilidad afecta la capacidad de las células para intercambiar gases y metabolitos en el entorno.

Se empleó la WVTR para obtener una medida cuantitativa de la capacidad del material, para los ABs CQ, CQ+EECT a 50 y 100 µg/mL se produjo un valor de  $210,51 \pm 3,39$ ;  $281,81 \pm 2,77$ ;  $255,78 \pm 3,55$  g/m<sup>2</sup> día respectivamente, tal como se presenta en la figura 13. Los valores más altos fueron presentados por los ABs de CQ+EECT a diferencia del



andamio CQ. Se ha informado que la WVTR puede llegar a ser superior en extracto y menores en ABs sin extracto, la adición de extractos interfiere por la composición química de los polímeros incrementando sus capacidades tal como se mencionó en el apartado capacidad de absorción de agua (Alves et al., 2022;Sutar et al., 2021).



**Figura 13.** Permeabilidad del vapor de agua

Los ABs presenta valores de WVTR de 210,51±3,39; 281,81±2,77 y 255,78 ± 3,55 g/m<sup>2</sup> día para CQ, CQ+EECT (50 y 100 µg/mL) respectivamente. Los datos que se presentan corresponden a 3 réplicas. Las letras diferente encima de las barras indican las diferencias significativas con un nivel del 95% de confianza (ANEXO F)

Una WVTR adecuada permite la difusión de oxígeno, nutrientes y factores de crecimiento hacia las células, favoreciendo de tal manera una cicatrización de las células. Por el contrario, una permeabilidad inadecuada provoca la acumulación de exudados en el interior, lo que puede provocar algún tipo de infección derivado del crecimiento de microorganismos no deseados (Díaz et al., 2012). Los resultados y la variación de los mismos se deben a la pérdida de masa causada por la evaporación del agua absorbida por la muestra. En ABs de quitosano se han reportado datos de entre 200-250 g/m<sup>2</sup> día, valores que depende de la naturaleza hidrofílica (Cazón et al., 2022). Al igual que el colágeno, el quitosano tiene alta capacidad de retener agua debido a su estructura química (Sukpaita et al., 2021). Sin embargo, el Quitosano al no ser tan compacto ni denso como el colágeno

genera una menor difusión a través de los poros con espacio para la retención (porosidad) y difusión del agua (**Kulda & Babuska, 2019**).

La porosidad es el principal mecanismo de transmisión por humedad a través de los poros bajo una diferencia de presión parcial (**Basha et al., 2011**). Estos valores son congruentes ya que la porosidad en los ABs CQ+EECT fueron mayores al de CQ. Dicha absorción facilita la difusión de nutrientes y metabolitos inmersos en el extracto de pumín. **Alves et al., (2022)**, explica que los principios activos de un extracto pueden actuar sólo o en conjunto. Este último tiene un efecto sinérgico, que muchas veces puede superar los efectos obtenidos de manera individual en los polímeros confirmando los datos para los ABs CQ+EECT (50 y 100 µg/mL).

Es importante mencionar que, la WVTR normal de piel sana es de 204 g/m<sup>2</sup> día. Sin embargo, en heridas con granulación va desde 279g/m<sup>2</sup> día a 5138 g/m<sup>2</sup> día. En consecuencia, se ha informado que los apósitos comercializados exhiben una WVTR en el rango de 90 a 3350 g/m<sup>2</sup> día (**Sutar et al., 2021**). Por consiguiente, los valores expuestos se encuentran dentro del rango establecido, por lo que puede ser aplicados en tejidos epiteliales con heridas leves.

#### **3.1.4.4.Evaluación Mecánica**

Dentro de la cicatrización de herida, las propiedades mecánicas de los ABs deben ser adecuadas para soportar actividades celulares como la proliferación, migración y angiogénesis (**Zaman et al., 2011**). Además, deben ser capaces de proteger las estructuras presentes en la piel nativa. Un andamio ideal debe ser compatible con el sitio anatómico correspondiente y debe imitar la estructura original. Por lo que dentro de este criterio, la resistencia a la tracción, el porcentaje de elongación y el alargamiento a la rotura son indispensables para que se cumplan las funciones tanto a nivel estructural como en su durabilidad (**Suamte et al., 2023**).

En primera instancia, la resistencia a la tracción hace referencia al soporte de fuerzas o estiramiento antes de romperse o sufrir una deformación permanente. Cuanto mayor sea el valor a la resistencia, más fuerte y resistente será el material. Esto se pudo evidenciar en la tabla 5, donde los ABs tienen una resistencia a la tracción que va desde 0,04 a 0,13Mpa que en comparación con el estudio de **Nokoorani et al., (2021)** informó valores de entre 0,04-0,18 Mpa. De hecho, en ABs elaborados a partir de quitosano y gelatina se tuvieron valores de 0,001-0,004 Mpa. En el caso del colágeno, se reportan datos de 0,53-0,92 Mpa asociados al porcentaje de porosidad tras agregar el extracto de *Cynodom* ya la naturaleza del mismo era viscosa (**Perumal et al., 2018**).

Según **Pui et al., (2012)** la menor resistencia a la tracción genera menor elasticidad, lo que explica los valores generados para el andamio CQ+EECT (100 µg/mL). Un andamio con una alta resistencia puede soportar mejor las fuerzas mecánicas aplicadas en el sitio de la lesión y proporcionar un soporte estructural adecuado para la generación de tejido (**Dermott et al., 2016**). Cabe señalar que, este criterio puede variar según el tipo de andamio y los materiales utilizados en su fabricación. Respecto a esto, los compuestos bioactivos a diferentes concentraciones es uno de los materiales empleados explicando los valores para CQ +EECT a 50 y 100 µg/mL conforme se observa en la figura 14.

**Tabla 5.** *Propiedades mecánicas de los ABs a diferentes concentraciones*

Tipo de ABs	Resistencia a la tracción (Mpa)	Alargamiento a la rotura (%)	Rotura de desplazamiento (mm)
CQ	0,13 ± 0,07 <sup>a</sup>	5,90 ± 1,68 <sup>b</sup>	2,18 ± 0,58 <sup>c</sup>
CQ+EECT (50 µg/mL)	0,09 ± 0,052 <sup>a</sup>	8,16 ± 1,05 <sup>b</sup>	3,11 ± 0,44 <sup>c</sup>
CQ+ EECT (100 µg/mL)	0,04 ± 0,04 <sup>a</sup>	4,50 ± 6,70 <sup>b</sup>	1,62 ± 2,41 <sup>c</sup>

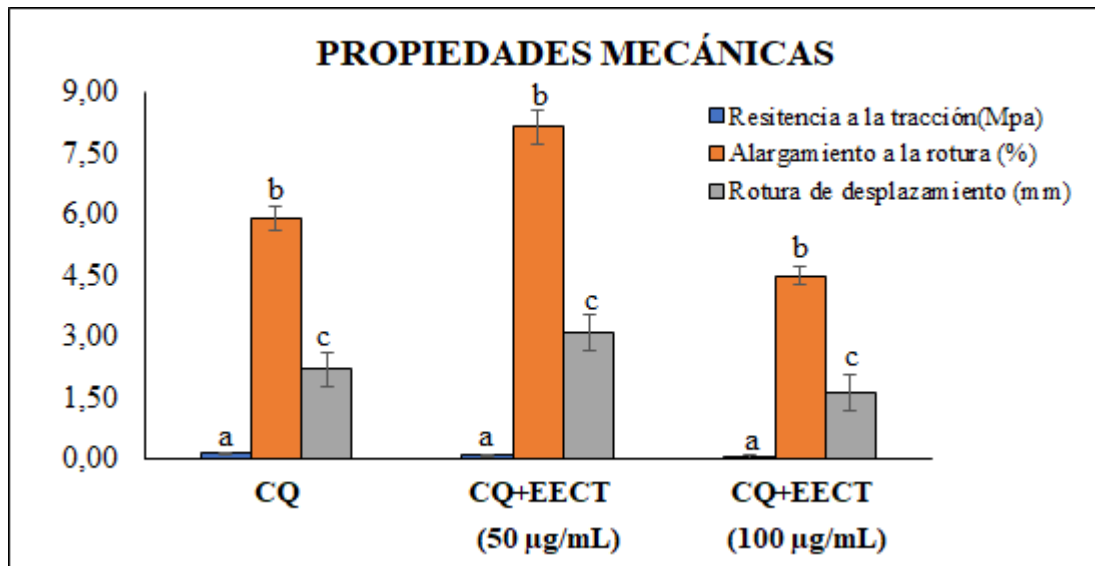
**CQ:** Colágeno-quitosano, **CQ + EECT:** Colágeno-quitosano+ Extracto etanólico de pumín (50 y 100 µg/mL).

Con forme a la figura 14, el alargamiento a la rotura es una medida expresada en porcentaje. Indica la capacidad de un material para estirarse o deformarse antes de romperse bajo una carga aplicada, y se utiliza como indicador de su flexibilidad. En el presente trabajo, se obtuvieron valores de 4,50-8,16 % que al comparar con **Ramanathan et al., (2017)** se mantienen una similitud puesto que expresa valores entre 5,51-6,29 % .Esto se debe a la naturaleza flexible de los polímeros empleados (colágeno y quitosano), mismos que tiene la habilidad de deformarse y adaptarse a diferentes entornos biológicos. Sin mencionar, que al ser procesadas en diferentes formas tales como películas, membranas y ABs, conservan en gran medida su flexibilidad y por ende un mayor valor de alargamiento a la rotura (**Zimina et al., 2020**).

La flexibilidad de los ABs se incrementó al incluir el extracto de pumín para el andamio CQ+EECT (50µg/mL) ya que favorece al engrosamiento de las paredes interconectadas y la porosidad de los ABs. Además, la presencia de fenoles y alcaloides presentes en el extracto actúan como agente de entrecruzamiento para el aumento del porcentaje de elongación (**Ramanathan et al., 2017**). Pese a esto, las concentraciones altas de extracto pueden tener un efecto negativo en las propiedades mecánicas. El aumentar la concentración de extracto se introduce una mayor cantidad de compuestos y dependiendo la naturaleza, puede tener efectos adversos como la resistencia y flexibilidad. Esta información se corrobora con lo encontrado para CQ+EECT (100 µg/mL).

Finalmente, la rotura de desplazamiento se refiere a la cantidad máxima de deformación que llega a experimentar el andamio antes de romperse. Sin embargo, si la rotura de desplazamiento es muy baja, significa que poseerá una limitada adaptabilidad al entorno, restricción del crecimiento celular y riesgo de fractura prematura (**Loh & Choong, 2013;Zhou et al., 2023**). Por el contrario, al poseer valores muy altos, conlleva la pérdida de soporte estructural y menor resistencia mecánica. La rigidez excesiva de los ABs puede causar dolor, mientras que una flexibilidad excesiva, da como resultado fallas a la

contracción mientras ocurre el proceso de curación (Tseng et al., 2013). En este sentido, resulta fundamental analizar cuidadosamente las propiedades de tracción de los ABs dérmicos y con esto lograr un equilibrio adecuado entre la rigidez y flexibilidad (Boateng et al., 2008).



**Figura 14.** *Propiedades mecánicas de los ABs*

**CQ:** Colágeno-quitosano, **CQ + EECT:** Colágeno-quitosano+ Extracto etanólico de pumín (50 y 100 µg/mL). Las letras a,b y c corresponden a los parámetros de resistencia a la tracción, alargamiento a la rotura y rotura de desplazamiento. El \* significa la diferencia significativa. En este caso en ningún parámetro se presenta diferencia significativa.

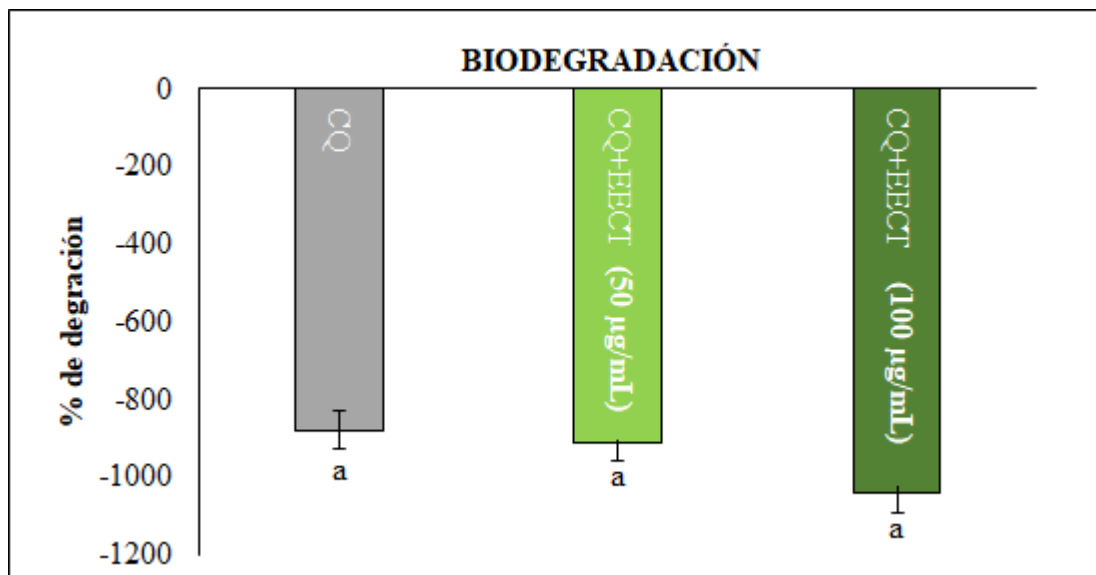
En definitiva, CQ presenta cierta flexibilidad asociada a la resistencia de tracción con capacidad de deformación para permitir la migración celular y regeneración de tejido. No obstante, una rotura muy alta puede comprometer la estabilidad y resistencia del andamio como lo expuesto CQ+EECT (100 µg/mL). Para tejido epitelial, se busca que el andamio tenga cierta flexibilidad y capacidad de deformación para permitir la migración y proliferación, es decir; soportar deformaciones elásticas sin sufrir una rotura prematura como CQ+EECT (50 µg/mL).

### **3.1.4.5. Evaluación de biodegradabilidad**

La degradación es un proceso gradual del material del andamio mediado por la actividad biológica del entorno, es decir; después de la implantación debe adaptarse y degradarse para garantizar una remodelación del tejido en el transcurso del tiempo. Esta propiedad es de gran relevancia en los biomateriales, sobre todo en los polímeros naturales, que no requieren una segunda intervención quirúrgica para su extracción. Por el contrario, los materiales sintéticos tienden a ser tóxicos, lo que genera una inflamación o interrupción en la reparación del tejido. El uso de polímeros naturales como el colágeno y el quitosano pueden ser metabolizados y descompuestos por enzimas en el organismo, facilitando el proceso de regeneración del tejido sin dejar residuos no deseados en el cuerpo (**Egorikhina et al., 2021; Böstman, 1998**).

Se ha encontrado en el cuerpo varios fluidos corporales, entre ellos el plasma. El uso de plasma es propicio ya que contiene diversas proteínas, factores de coagulación y enzimas que al interactuar con el andamio provocan su degradación (**Fan et al., 2019; Casalini, 2017; Satish et al., 2019**). De hecho, uno de los enfoques para evaluar esta propiedad, se basa en la examinar la masa residual del andamio posterior a la incubación de una solución similar a un fluido corporal (**Egorikhina et al., 2021**). Pese a esto, el uso del plasma no imita el ambiente real pero brinda una interacción del material, siendo útil como prueba preliminar (**Weber et al., 2018**)

Las enzimas actúan como catalizadores biológicos acelerando las reacciones químicas. Entre ellas la serina proteasas y las metaloproteinasas involucradas con mayor frecuencia en las lesiones. El andamio se convierte o actúa como sustrato para estas enzimas, y en consecuencia se suscita una degradación (**Toriseva & Kähäri, 2009; Egorikhina et al., 2021**). Por cual se reflejan una posible degradación enzimática después de la implantación, en este caso después de ser sumergido en el plasma, que de acuerdo con la figura 15, se tuvo porcentajes promedio de  $-878,15 \pm 3,51$  %;  $-910,59 \pm 2,98$  %;  $-1040,39 \pm 3,52$  % correspondientes para los ABs CQ, CQ+EECT (50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ).



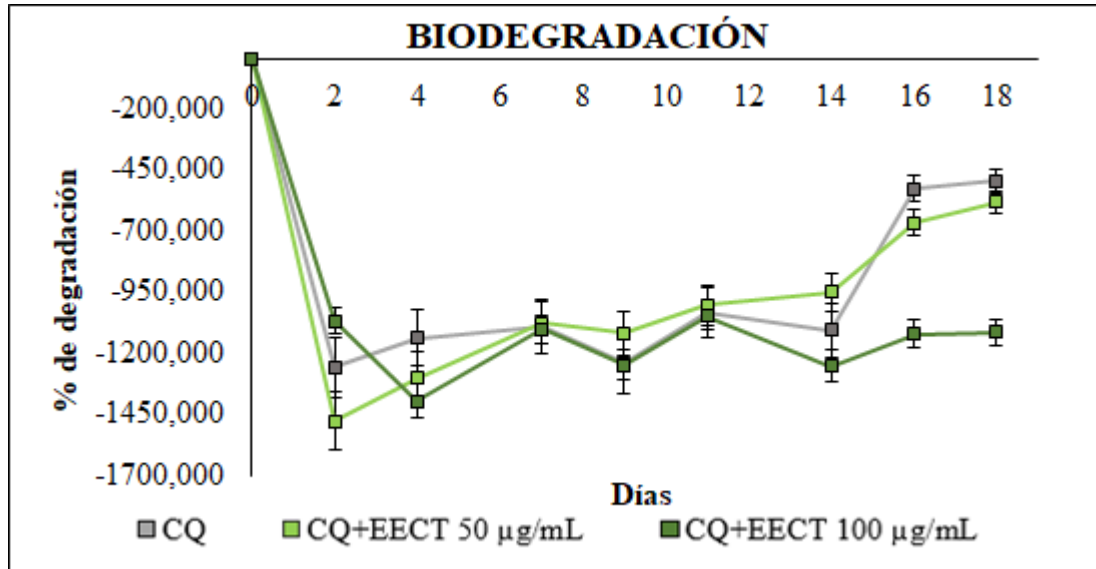
*Figura 15. Biodegradación de ABs*

**CQ:** Colágeno-quitosano, **CQ + EECT:** Colágeno-quitosano+ Extracto etanólico de pumín (50 y 100 µg/mL). Los valores promedio fueron de -878,15±3,51 %; -910,59±2,98 %; -1040,39 %±3,52 % correspondientes para los ABs CQ, CQ+EECT (50 y 100 µg/mL). Las letras iguales indican de no existe diferencias significativas con un nivel del 95% de confianza (ANEXO F)

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son un grupo de enzimas que degradan componentes de la matriz extracelular como el colágeno mediante la colagenasa. Esta enzima rompe los enlaces peptídicos en la estructura del colágeno, pero esta enzima no se encuentra de manera significativa en el plasma. Por otro lado, el quitosano es mayormente degradado por la lisozima, interfiere en los enlaces glucosídicos, separando las unidades mediante una hidrólisis en los enlaces glucosídicos que mantiene enlazadas las unidades de glucosamina, fragmentando en secciones más simples al quitosano (**Toriseva & Kähäri, 2009; Lončarević et al., 2017**)

Si bien no se han realizado pruebas en plasma, se puede inferir que estos factores pudieron estar presentes para las ABs de CQ, CQ+ EECT (50 y 100 µg/mL). Estos resultados fueron confirmados por **Guáitara & Núñez, (2022)** en CQ para el día 4 donde se muestra una biodegradación. Cabe destacar que en esa investigación se evaluó durante 7 días por lo que la estabilidad del andamio no pudo ser evidenciar, a diferencia del presente estudio,

en el cual los días de incubación fueron 18, encontrando una cierta estabilidad a partir de en el día 16 (Figura 16).



**Figura 16.** Biodegradabilidad de los ABs

**CQ:** Colágeno-quitosano, **CQ + EECT:** Colágeno-quitosano+ Extracto etanólico de pumín (50 y 100 µg/mL).

El plasma contiene aproximadamente 92% de agua y 8% de sólidos, por lo que una degradación hidrolítica también es posible. El agua se comporta como un agente degradante y rompe los enlaces en el andamio, conforme se explicó en de la capacidad de absorción de agua, ya que está asociado a la naturaleza de los polímeros (biodegradable). Hay que tener en cuenta que la degradación rápida puede inferir en la ausencia del material, lo que repercute en la proliferación celular y por ende en la regeneración del tejido. Por el contrario, si la degradación es lenta puede provocar una inflamación crónica y cicatrices en el futuro (Costa et al., 2017; Wissing et al., 2019).

La degradabilidad menor en el resto de ABs de CQ+EECT se asocia a la porosidad, por lo que retienen y almacenan fluidos con mayor facilidad. Adicionalmente, un estudio realizado por Ramanathan et al., (2017), emplearon colagenasa en ABs con extracto de



*Coccinia grandis* y explica que el efecto sinérgico del compuesto bioactivo del extracto, ayudan a mantener una estabilidad. Si bien, no se utilizó colagenasa en la evaluación, se demostró el comportamiento estable en los ABs de CQ+EECT, aún más en CQ+EECT (50 µg/mL) a partir del día 7 al 14. Por tanto, se requiere de una estabilidad que brinde el andamio para una regeneración óptima, siendo CQ+EECT (50 µg/mL) el más apto.

#### **3.1.4.6. Evaluación de la actividad antimicrobiana**

La implantación de los ABs es uno de los principales desafíos dentro de la IT, ya que se pretende establecer estrategias para prevenir infecciones. Pese a esto, el uso de antibióticos es una solución, en la que se debe tomar en cuenta la resistencia al medicamento. Las infecciones bacterianas es un problema al igual que la resistencia bacteriana, pueden provocar el fracaso del implante, la hospitalización y en algunas ocasiones la muerte del paciente. Los ABs deben poseer esta característica que da soporte a la efectividad de la regeneración de tejidos locales ( **Chen et al., 2006; Gholami et al., 2021**)

En congruencia con la inhibición del extracto, se evaluó la actividad antimicrobiana en ABs de CQ, CQ+EECT (50 y 100 µg/mL), que conforme a la Tabla 6, exhiben valores de  $10,11 \pm 0,51$ ;  $10,61 \pm 0,25$  y  $5,78 \pm 2,14$  mm respectivamente. Los resultados muestran que EECT suprimió de manera eficiente el crecimiento de *S. aureus*, a diferencia de CQ. En ABs de colágeno con extracto se observó el mismo comportamiento, en comparación con aquellos que no tenía extracto **Ramanathan et al., (2017)**. Esto pudo darse por diferentes factores.

**Tabla 6.** Halos de inhibición de los ABs

Tipo de andamio	Concentración (µg/mL)	Halos de inhibición (mm)
		<i>S. aureus</i>
CQ	0	5,78±2,14 <sup>a</sup>
CQ+EECT	50	10,61±0,25 <sup>b</sup>
	100	10,11±0,50 <sup>b</sup>
Controles	Vancomicina	17,00±0,33 <sup>c</sup>
	Gentamicina	25,89±0,69 <sup>d</sup>
	Control -	0

**CQ:** colágeno-quitosano; **CQ+EECT:** Extracto etanólico de pumín **Controles+:** Vancomicina y gentamicina **Control -:** Agua destilada. Las letras corresponden a la diferencia significativa control positivo y los \* la diferencia significativa con respecto al que no posee.

Uno de ellos es el quitosano, que tiene propiedad antibacteriana. En primera instancia, el proceso se da con la interacción con la membrana celular. El quitosano entra en contacto con la membrana mediante interacciones electrostáticas, lo que provoca cambios en la permeabilidad de la membrana, afectando la capacidad de la bacteria para regular el paso de moléculas y nutrientes. Una vez que el quitosano interactuó con la membrana, penetra la pared celular afectando su morfología, generando dificultades en la resistencia de la presión osmótica, dando paso a la lisis celular (Tian et al., 2022).

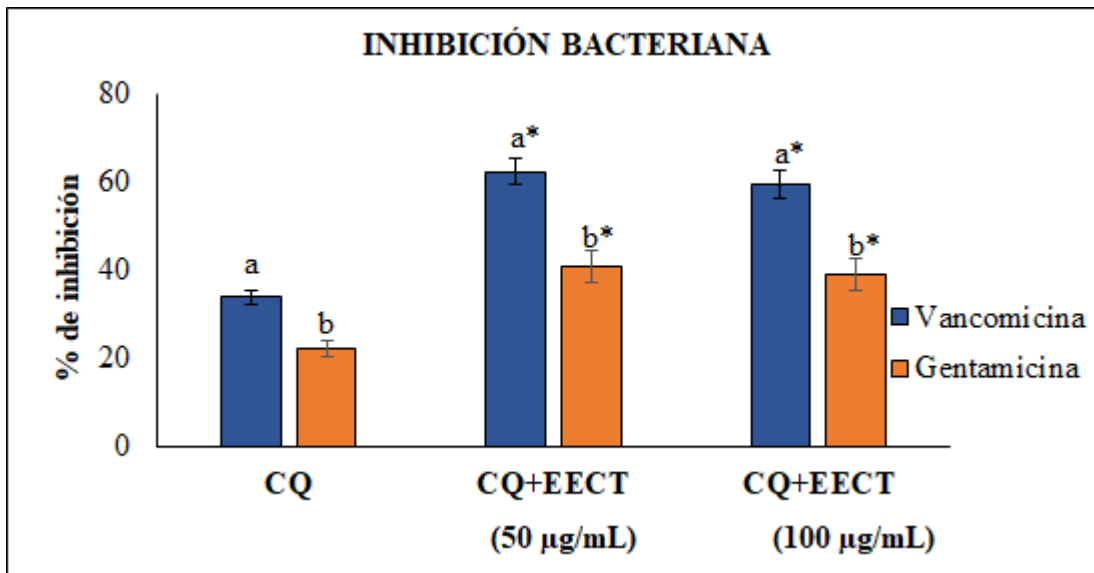
Este polímero es aplicable a diferentes cepas, debido a que la carga negativa es mayor en la superficie de las bacterias Gram negativas que en Gram positivas. Esto aumenta la adsorción de quitosano en la superficie. Como resultado, el quitosano penetra y daña la membrana de manera más efectiva. Se debe enfatizar que *S. aureus* es un microorganismo involucrado en la etapa inicial del proceso de infección, mientras que *Escherichia coli* se encuentra en etapas posteriores, es decir; cuando se desarrolla la herida crónica. Por tanto,

indispensable realizar una investigación enfatizando las dos diferentes bacterias (**Tian et al., 2022**; Rubio et al., 2019)

Por otro lado, estudios previos demuestran que la presencia de taninos y flavonoides en los ABs, exhiben actividades antimicrobianas. De hecho, el porcentaje de inhibición obtenido fue de 62,43 % CQ+EECT (50  $\mu\text{g/mL}$ ), mientras que en CQ fue de 59,53 % tomando como referencia vancomicina. En Gentamicina el porcentaje alto CQ+EECT (50  $\mu\text{g/mL}$ ) se mantiene en relación con los otros ABs, esta diferencia significativa se muestra en la Figura 16. Estos resultados demostraron que el EECT posee una mejor actividad antibacteriana, mismo que está asociado a los compuestos fenólicos. Pese a esto, CQ+EECT (50  $\mu\text{g/mL}$ ) presentó una inhibición mejor a la de 100  $\mu\text{g/mL}$ , esto se debe a que la propiedad antimicrobiana está asociada a la porosidad del andamio.

Un porcentaje de porosidad más grande brindará un área más grande de contacto, esto quiere decir; que los compuestos bioactivos pueden interactuar directamente con los microorganismos. Además, un andamio poroso permite una liberación más rápida y eficiente de los compuestos bioactivos. De igual forma, en el apartado de propiedades mecánicas se reveló que estas ayudarán a combatir las infecciones y evitar que los patógenos colonicen los ABs, ya que las características de elongación, fuerza de tracción y alargamiento permitirán cubrir la herida y evitar la entrada de patógenos (**Veerasubramanian et al., 2018**; **Dermott et al., 2016**).

En definitiva, la porosidad es una de las características más importantes en el andamio, ya que influye significativamente en la inhibición de *S. aureus*. Por lo que CQ+EECT (50  $\mu\text{g/mL}$ ) es el más apto dentro de la implantación de heridas confirmando sus características de porosidad y propiedades mecánicas.



**Figura 17.** Porcentaje de inhibición frente *S.aureus* en los ABs

Se tomo como referencia controles positivos de Vancomicina y Gentamicina. En Vancomicina el porcentaje de inhibición para CQ, CQ+EECT (50 y 100 µg/mL) fueron 33,84±1,21 ;62,43±1,61; 59,53±2,16 %. Para Gentamicina los valores fueron de 22,24±2,5; 41,02±1,97 ; 39,09±2,61% . Las letras corresponden al control positivo y los \* la diferencia significativa con respecto al que no posee.

## CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1. Conclusiones

➤ Los ABs CQ y CQ+EECT a 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$  fueron liofilizados, obteniendo características propicias en cuanto a estructura tridimensional, siendo aplicables dentro de la Ingeniería de tejidos con enfoque al tejido epitelial.

➤ Sé obtuvo un rendimiento de 11,34% del extracto de pumín, mismo que consta de metabolitos secundarios como alcaloides, saponinas, quinonas, flavonoides y fenoles, mismos que son responsables en gran parte de la actividad antioxidante del extracto. Los valores altos obtenidos reflejan que las hojas poseen gran cantidad de compuestos bioactivos y dependiendo del estado de madurez puede variar la concentración de los mismos. Adicionalmente, los extractos demostraron capacidad antimicrobiana, necesaria dentro de los trasplantes epiteliales.

➤ La técnica de liofilización fue óptima para preservar la estructura del andamio, así como los compuestos bioactivos del extracto, importantes para promover un crecimiento celular. Los componentes bioactivos se mantuvieron en el andamio a través la fase de ultracongelación ya que se ralentiza los procesos de degradación y oxidación.

➤ Los ABs CQ y CQ+EECT a 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$  fueron evaluados en cuanto a sus propiedades morfológicas, físicas y biológicas, cada una con características específicas y relacionadas entre sí. Dentro de las propiedades morfológicas, el tamaño del poro y el porcentaje de porosidad, dan paso a la difusividad y transporte de nutrientes que son generados por las propiedades físicas de absorción y permeabilidad, para que las células proliferen en un ambiente biodegradable, seguro y estéril de microorganismos como *S. aureus*. Por lo que, el andamio con mejores características fue el CQ+EECT a 50  $\mu\text{g/mL}$  para tratamiento en heridas.

#### 4.2. Recomendaciones

- Dentro del rendimiento de extracción se debe tomar en cuenta, el tipo de planta, la parte a extraer y la naturaleza de compuesto bioactivos. Sobre todo, para que el solvente sea compatible y se extraiga los metabolitos secundarios. Así también, es recomendable conocer las condiciones de extracción como la temperatura, tiempo de extracción y la relación solvente-planta, ya que pueden influir en la cuantificación de fenoles y flavonoides totales
  
- Se comienda estandarizar el cultivo y la recolección de la planta de pumín puesto que los metabolitos secundarios, dependen de la fase de maduración de la planta, al igual que factores externos como el almacenamiento posterior a la extracción.
  
- Tomar en consideración dentro de la técnica de liofilización, parámetros como la temperatura, presión y tiempo de procesado de la muestra, ya que esto influye de manera directa con el secado. Sobre todo, si la muestra es criogénica puesto que puede provocar una degradación de los compuestos bioactivos del extracto, además de perjudicar la estructura de los ABs.
  
- Al momento de elaborar ABs tomar en cuenta los polímeros, la naturaleza e interacción por separado y verificar previamente si la funcionalidad de ambos es posible. Con la finalidad de que, las propiedades morfológicas, físicas y biológicas no se vean afectadas. Así mismo, se recomienda dentro de las propiedades físicas, evaluar la capacidad de absorción en PBS ya que este es un entorno propicio para las células. Dentro de las propiedades biológicas evaluar la inhibición en bacterias Gram negativas como *E. coli* con el fin de ampliar el estudio *in vitro* de *Clinopodium tomentosum* (Kunth). También se recomienda realizar pruebas en sangre con el finde imitar el ambiente real de un trasplante.

## MATERIALES DE REFERENCIA

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abbas, M., Shahid, M., Rehman, H. M., Sharif, S., Muhammad, R., Khan, A., & Munawar, I. (2012). Screening of Selected Medicinal Plants for Secondary Metabolites. *Abstract Accepted for Poster Presentation In11 International and 23 National Chemistry Conference Held at NCEPC, University of Peshawar (October 15-17, 2012)*, 8(3), 119.
- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 12(1), 1. [https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS\\_175\\_19](https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS_175_19)
- Agarwal, T., Tan, S.-A., Onesto, V., Law, J. X., Agrawal, G., Pal, S., Lim, W. L., Sharifi, E., Moghaddam, F. D., & Maiti, T. K. (2021). Engineered herbal scaffolds for tissue repair and regeneration: Recent trends and technologies. *Biomedical Engineering Advances*, 2, 100015. <https://doi.org/10.1016/J.BEA.2021.100015>
- Agrawal, S., & Srivastava, R. (2020). Osteoinductive and osteoconductive biomaterials. In *Racing for the Surface: Antimicrobial and Interface Tissue Engineering*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-34471-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-34471-9_15)
- Alara, O., Abdurahman, N., & Olalere, O. (2020). Ethanolic extraction of flavonoids, phenolics and antioxidants from *Vernonia amygdalina* leaf using two-level factorial design. *Journal of King Saud University - Science*, 32(1), 7–16. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2017.08.001>
- Alves, M., Nascimento, M., de Almeida, B., Alves, M., Lima, I., Costa, D., Araújo, D., de Paula, M., Mello, J., Cano, A., & Cardoso, J. (2022). Hydrophilic Scaffolds Containing Extracts of *Stryphnodendron adstringens* and *Abarema cochliacarpa* for Wound Healing: In Vivo Proofs of Concept. *Pharmaceutics*, 14(10), 2150. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14102150>
- Archana, D., Upadhyay, L., Tewari, R., & Dutta, J. (2013). Chitosan-pectin-alginate as a novel scaffold for tissue engineering applications. *Indian Journal of Biotechnology*,

12(4), 475–482.

- Aroca, S., & Ressler, A. (2022). Chitosan-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering Applications: A Short Review. *Polymers* 2022, Vol. 14, Page 3430, 14(16), 3430. <https://doi.org/10.3390/POLYM14163430>
- Azahar, N. F., Gani, S. S. A., & Mohd Mokhtar, N. F. (2017). Optimization of phenolics and flavonoids extraction conditions of Curcuma Zedoaria leaves using response surface methodology. *Chemistry Central Journal*, 11(1), 96. <https://doi.org/10.1186/S13065-017-0324-Y>
- Baek, S. H., Cao, L., Jeong, S. J., Kim, H. R., Nam, T. J., & Lee, S. G. (2021). The Comparison of Total Phenolics, Total Antioxidant, and Anti-Tyrosinase Activities of Korean Sargassum Species. *Journal of Food Quality*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6640789>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71. <https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2015.11.005>
- Barbieri, R., Coppo, E., Marchese, A., Daglia, M., Sobarzo-Sánchez, E., Nabavi, S. F., & Nabavi, S. M. (2017). Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiological Research*, 196, 44–68. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2016.12.003>
- Basha, R. K., Konno, K., Kani, H., & Kimura, T. (2011). Water Vapor Transmission Rate of Biomass Based Film Materials. *Engineering in Agriculture, Environment and Food*, 4(2), 37–42. [https://doi.org/10.1016/S1881-8366\(11\)80018-2](https://doi.org/10.1016/S1881-8366(11)80018-2)
- Bayas, A. M. I. (2018). “Estudio del perfil fitoquímico y posibles aplicaciones de los extractos alcohólicos, etéreo y acuoso del SUNFO (Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze)”. *Universidad Técnica De Cotopaxi Facultad*, 1, 101. <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4501/1/PI-000727.pdf>
- Beddiar, H., Boudiba, S., Benahmed, M., Tamfu, A. N., Ceylan, Ö., Hanini, K.,



- Kucukaydin, S., Elomari, A., Bensouici, C., Laouer, H., Akkal, S., Boudiba, L., & Dinica, R. M. (2021). Chemical Composition, Anti-Quorum Sensing, Enzyme Inhibitory, and Antioxidant Properties of Phenolic Extracts of *Clinopodium nepeta* L. Kuntze. *Plants*, *10*(9), 1955. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10091955>
- Bekut, M., Brkić, S., Kladar, N., Dragović, G., Gavarić, N., & Božin, B. (2018). Potential of selected Lamiaceae plants in anti(retro)viral therapy. *Pharmacological Research*, *133*, 301–314. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2017.12.016>
- Bhattarai, D. P., Aguilar, L. E., Park, C. H., & Kim, C. S. (2018). A Review on Properties of Natural and Synthetic Based Electrospun Fibrous Materials for Bone Tissue Engineering. *Membranes*, *8*(3). <https://doi.org/10.3390/MEMBRANES8030062>
- Bitwell, C., Indra, S. Sen, Luke, C., & Kakoma, M. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African*, *19*, e01585. <https://doi.org/10.1016/J.SCIAF.2023.E01585>
- Boateng, J., Matthews, K., Stevens, H., & Eccleston, G. (2008). Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *97*(8), 2892–2923. <https://doi.org/10.1002/JPS.21210>
- Bobo, G., Davidov, G., Arroqui, C., Vírseda, P., Marín, M. R., & Navarro, M. (2019). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*(1), 204–209. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>
- Böstman, O. (1998). Osteoarthritis of the ankle after foreign-body reaction to absorbable pins and screws. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B*, *80*(2), 333–338. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.80B2.8302>
- Braca, A., Saltos, M., Dal Piaz, F., De Tommasi, N., Naranjo Puente, B., Ebrahimi, S., & Hamburger, M. (2014). Diterpenes from *Euphorbia laurifolia*. *Planta Medica*, *80*(16). <https://doi.org/10.1055/s-0034-1394730>

- Bu, L., Dai, O., Zhou, F., Liu, F., Chen, J. F., Peng, C., & Xiong, L. (2020). Traditional Chinese medicine formulas, extracts, and compounds promote angiogenesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *132*, 110855. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2020.110855>
- Casalini, T. (2017). Bioresorbability of polymers: Chemistry, mechanisms, and modeling. *Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications: From Fundamentals to Translational Medicine*, 65–83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100262-9.00003-3>
- Castillo, J. (2020). Caracterización de los compuestos bioactivos de *Clinopodium nubigenum* con propósito agroindustriales. *Angewandte Chemie International Edition*, *6(11)*, 951–952., 80.
- Cazón, P., Morales-Sanchez, E., Velazquez, G., & Vázquez, M. (2022). Measurement of the Water Vapor Permeability of Chitosan Films: A Laboratory Experiment on Food Packaging Materials. *Journal of Chemical Education*, *99(6)*, 2403–2408. [https://doi.org/10.1021/ACS.JCHEMED.2C00449/SUPPL\\_FILE/ED2C00449\\_SI\\_010.DOCX](https://doi.org/10.1021/ACS.JCHEMED.2C00449/SUPPL_FILE/ED2C00449_SI_010.DOCX)
- Chatelet, C., Damour, O., & Domard, A. (2001). Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, *22(3)*, 261–268. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00183-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00183-6)
- Cheesman, M. J., Ilanko, A., Blonk, B., & Cock, I. E. (2017). Developing New Antimicrobial Therapies: Are Synergistic Combinations of Plant Extracts/Compounds with Conventional Antibiotics the Solution? *Pharmacognosy Reviews*, *11(22)*, 57. [https://doi.org/10.4103/PHREV.PHREV\\_21\\_17](https://doi.org/10.4103/PHREV.PHREV_21_17)
- Chen, R. C., Xu, X. D., Zhi Liu, X., Sun, G. B., Zhu, Y. Di, & Sun, X. B. (2015). Total Flavonoids from *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Ktze Protect against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity In Vitro and In Vivo. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/472565>

- Chen, W., Liu, Y., Courtney, H., & Ong, J. L. (2006). In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating. *Biomaterials*, 27(32), 5512–5517. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.07.003>
- Collins, M. N., Ren, G., Young, K., Pina, S., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. (2021). Scaffold Fabrication Technologies and Structure/Function Properties in Bone Tissue Engineering. *Advanced Functional Materials*, 31(21), 2010609. <https://doi.org/10.1002/ADFM.202010609>
- Costa, A., Naranjo, J., Londono, R., & Badylak, S. (2017). Biologic Scaffolds. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(9). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A025676>
- Culqui, X. (2017). *Determinación de la actividad Antiinflamatoria de la Planta Clinopodium tomentosum en edema plantar inducido por carragenina en ratas Rattus norvegicus.* 90. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/6788/1/56T00717.pdf>
- Das, P. E., Majdalawieh, A. F., Abu-Yousef, I. A., Narasimhan, S., & Poltronieri, P. (2020). Use of A Hydroalcoholic Extract of Moringa oleifera Leaves for the Green Synthesis of Bismuth Nanoparticles and Evaluation of Their Anti-Microbial and Antioxidant Activities. *Materials 2020*, Vol. 13, Page 876, 13(4), 876. <https://doi.org/10.3390/MA13040876>
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador (con extracto de datos). In *Herbario QCA & Herbario AAU*.
- Dermott, A., Mason, D., Lin, A. S. P., & Boerckel, J. D. (2016). Influence of structural load-bearing scaffolds on mechanical load- and BMP-2-mediated bone regeneration. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 62, 169–181. <https://doi.org/10.1016/J.JMBBM.2016.05.010>
- Díaz, M., Fernandes, P., Guedes, J., & Hollister, S. (2012). Permeability analysis of

- scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomechanics*, 45(6), 938–944. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2012.01.019>
- Echeverria, M., Malollari, K., & Komvopoulos, K. (2021). Design Challenges in Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 231. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.617141/BIBTEX>
- Egorikhina, M. N., Bronnikova, I. I., Rubtsova, Y. P., & Aleynik, D. Y. (2021). Aspects of In Vitro Biodegradation of Hybrid Fibrin–Collagen Scaffolds. *Polymers*, 13(20), 3470. <https://doi.org/10.3390/POLYM13203470>
- Elisha, I. L., Botha, F. S., & Eloff, J. N. (2017). The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 133. <https://doi.org/10.1186/S12906-017-1645-Z/TABLES/3>
- Eltom, A., Zhong, G., & Muhammad, A. (2019). Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3429527>
- Fan, T., Potroz, M., & Tan, E. (2019). Human blood plasma catalyses the degradation of Lycopodium plant sporoderm microcapsules. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-39858-Z>
- Filippi, M., Born, G., Chaaban, M., & Scherberich, A. (2020). Natural Polymeric Scaffolds in Bone Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 474. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.00474/BIBTEX>
- Garcia, A. P., Tamargo, B., Salas, E., Calzadilla, C., Acevedo, R., & Sierra, G. (2020). Phytochemical screening of extracts obtained from the *Sapindus saponaria* L plant that grows in Cuba. *Bionatura*, 5(3), 1209–1214. <https://doi.org/10.21931/RB/20120.05.03.7>
- Gholami, Z., Hasanpour, S., Ataei, K., Javari, E., Amani, M., & Rezaei, Y. (2021). Antibacterial agent-releasing scaffolds in dental tissue engineering. *Journal of*

*Advanced Periodontology & Implant Dentistry*, 13(1), 43.  
<https://doi.org/10.34172/JAPID.2021.003>

Gholizadeh, S., Moztaarzadeh, F., Haghhipour, N., Ghazizadeh, L., Baghbani, F., Shokrgozar, M. A., & Allahyari, Z. (2017). Preparation and characterization of novel functionalized multiwalled carbon nanotubes/chitosan/ $\beta$ -Glycerophosphate scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 365–372. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.12.086>

Goncalves, A., Bento, C., Jesus, F., Alves, G., & Silva, L. (2018). Sweet Cherry Phenolic Compounds: Identification, Characterization, and Health Benefits. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 59). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00002-5>

Gonçalves, J., Luís, Â., Gallardo, E., & Duarte, A. P. (2022). Evaluation of the In Vitro Wound-Healing Potential of Ayahuasca. *Molecules*, 27(18). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27185760>

Gonelimali, F. D., Lin, J., Miao, W., & Hatab, S. R. (2018). Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), 389103. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01639/BIBTEX>

González, A. J., Julexi, K., Zamora, M., Blandariz, S. R., & Cabrera, A. (2021). Utilización de plantas medicinales en cuatro localidades de la zona sur de Manabí, Ecuador. *Siembra*, 8(2), e3223–e3223. <https://doi.org/10.29166/SIEMBRA.V8I2.3223>

Grabska, S., Sionkowska, A., Reczyńska, K., & Pamuła, E. (2020). Physico-Chemical Characterization and Biological Tests of Collagen/Silk Fibroin/Chitosan Scaffolds Cross-Linked by Dialdehyde Starch. *Polymers 2020*, Vol. 12, Page 372, 12(2), 372. <https://doi.org/10.3390/POLYM12020372>

Guáitara, S., & Núñez, L. (2022). *Elaboración de andamios biológicos a partir de biopolímeros naturales mediante métodos manuales y bioimpresión 3D para*

- Han, C. M., Zhang, L. P., & Sun, J. Z. (2010). Application of collagen-chitosan/fibrin glue asymmetric scaffolds in skin tissue engineering. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 11(7), 524. <https://doi.org/10.1631/JZUS.B0900400>
- Hassanajili, S., Karami-Pour, A., Oryan, A., & Talaei-Khozani, T. (2019). Preparation and characterization of PLA/PCL/HA composite scaffolds using indirect 3D printing for bone tissue engineering. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 104. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.109960>
- Helary, C., Abed, A., Mosser, G., Louedec, L., Letourneur, D., Coradin, T., Giraud-Guille, M. M., & Meddahi-Pellé, A. (2015). Evaluation of dense collagen matrices as medicated wound dressing for the treatment of cutaneous chronic wounds. *Biomaterials Science*, 3(2), 373–382. <https://doi.org/10.1039/C4BM00370E>
- Hossain, M. L., Lim, L. Y., Hammer, K., Hettiarachchi, D., & Locher, C. (2022). A Review of Commonly Used Methodologies for Assessing the Antibacterial Activity of Honey and Honey Products. *Antibiotics 2022, Vol. 11, Page 975*, 11(7), 975. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11070975>
- Irastorza, A., Sánchez, D., Ortiz, O., Frutos, M., Esteban, E., Fernández, J., Janer, A., Campos, A., Campos, F., & Alaminos, M. (2021). Evaluation of Marine Agarose Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–20. <https://doi.org/10.3390/IJMS22041923>
- Irawan, V., Sung, T. C., Higuchi, A., & Ikoma, T. (2018). Collagen Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering and Relevant Approaches for Future Development. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 15(6), 673. <https://doi.org/10.1007/S13770-018-0135-9>
- Jithendra, P., Rajam, A. M., Kalaivani, T., Mandal, A. B., & Rose, C. (2013). Preparation and characterization of aloe vera blended Collagen-Chitosan composite scaffold for tissue engineering applications. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 5(15), 7291–

7298. <https://doi.org/10.1021/am401637c>

- Karuppuswamy, P., Venugopal, J. R., Navaneethan, B., & Laiva, A. (2014). Functionalized hybrid nanofibers to mimic native ECM for tissue engineering applications. *Applied Surface Science*, 322, 162–168. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2014.10.074>
- Khameneh, B., Eskin, N. A. M., Iranshahy, M., & Fazly Bazzaz, B. S. (2021). Phytochemicals: A Promising Weapon in the Arsenal against Antibiotic-Resistant Bacteria. *Antibiotics*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10091044>
- Krakowska, A., Kielbasa, A., Rafińska, K., Ligor, M., & Buszewski, B. (2022). Modern Methods of Pre-Treatment of Plant Material for the Extraction of Bioactive Compounds. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 730, 27(3), 730. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27030730>
- Krishani, M., Shin, W. Y., Suhaimi, H., & Sambudi, N. S. (2023). Development of Scaffolds from Bio-Based Natural Materials for Tissue Regeneration Applications: A Review. *Gels* 2023, Vol. 9, Page 100, 9(2), 100. <https://doi.org/10.3390/GELS9020100>
- Kulda, V., & Babuska, V. (2019). Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/MA12040568>
- Lim, C., Hwang, D., & Lee, D. (2021). Intermolecular interactions of chitosan: Degree of acetylation and molecular weight. *Carbohydrate Polymers*, 259(December 2020), 117782. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117782>
- Loh, Q. L., & Choong, C. (2013). Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 19(6), 485. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEB.2012.0437>
- Lončarević, A., Ivanković, M., & Rogina, A. (2017). Lysozyme-Induced Degradation of Chitosan: The Characterisation of Degraded Chitosan Scaffolds. *Journal of Tissue Repair and Regeneration*, 1(1), 12–22. <https://doi.org/10.14302/ISSN.2640->

6403.JTRR-17-1840

- Lutzweiler, G., Halili, A., & Vrana, N. (2020). The Overview of Porous, Bioactive Scaffolds as Instructive Biomaterials for Tissue Regeneration and Their Clinical Translation. *Pharmaceutics*, *12*(7), 1–29. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS12070602>
- Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J., & Han, C. (2003). Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials*, *24*(26), 4833–4841. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00374-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00374-0)
- Maji, K., Dasgupta, S., Pramanik, K., & Bissoyi, A. (2016). Preparation and Evaluation of Gelatin-Chitosan-Nanobioglass 3D Porous Scaffold for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Biomaterials*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9825659>
- Martínez, A., Blanco, M. D., Davidenko, N., & Cameron, R. E. (2015). Tailoring chitosan/collagen scaffolds for tissue engineering: Effect of composition and different crosslinking agents on scaffold properties. *Carbohydrate Polymers*, *132*, 606–619. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2015.06.084>
- Matsiko, A., Gleeson, J. P., & O'Brien, F. J. (2015). Scaffold mean pore size influences mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation and matrix deposition. *Tissue Engineering. Part A*, *21*(3–4), 486–497. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEA.2013.0545>
- Merivaara, A., Zini, J., Koivunotko, E., & Valkonen, S. (2021). Preservation of biomaterials and cells by freeze-drying: Change of paradigm. *Journal of Controlled Release*, *336*, 480–498. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2021.06.042>
- Meyer, M. (2019). Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. *BioMedical Engineering OnLine* 2019 18:1, 18(1), 1–74. <https://doi.org/10.1186/S12938-019-0647-0>
- Moncayo, A. (2020). Caracterización de metabolitos secundarios de naturaleza esteroidea presentes en el aceite esencial y extractos etanólico y clorofórmico de la especie



*Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts (Lamiaceae). *Univerdisas Politécnica Salesiana*, 1–93. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/18437/1/UPS-QT14376.pdf>

Monte, J., Abreu, A. C., Borges, A., Simões, L. C., & Simões, M. (2014). Antimicrobial Activity of Selected Phytochemicals against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and Their Biofilms. *Pathogens*, 3(2), 473. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS3020473>

Morgado, P., Aguiar, A., & Correia, I. (2015). Asymmetric membranes as ideal wound dressings: An overview on production methods, structure, properties and performance relationship. *Journal of Membrane Science*, 490, 139–151. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.04.064>

Munteanu, I., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/IJMS22073380>

Murphy, C., & Brien, F. (2010). Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Cell Adhesion & Migration*, 4(3), 377. <https://doi.org/10.4161/CAM.4.3.11747>

Murphy, C., Haugh, M., & O'Brien, F. (2010). The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 31(3), 461–466. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2009.09.063>

N'guessan, B. B., Asiamah, A. D., Arthur, N. K., Frimpong-Manso, S., Amoateng, P., Amponsah, S. K., Kukuia, K. E., Sarkodie, J. A., Opuni, K. F. M., Asiedu-Gyekye, I. J., & Appiah-Opong, R. (2021). Ethanolic extract of *Nymphaea lotus* L. (Nymphaeaceae) leaves exhibits in vitro antioxidant, in vivo anti-inflammatory and cytotoxic activities on Jurkat and MCF-7 cancer cell lines. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12906-020-03195-W/FIGURES/6>

- Negut, I., Dorcioman, G., & Grumezescu, V. (2020). Scaffolds for Wound Healing Applications. *Polymers*, *12*(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/POLYM12092010>
- Neri, L., Faieta, M., Di Mattia, C., & Sacchetti, G. (2020). Antioxidant Activity in Frozen Plant Foods: Effect of Cryoprotectants, Freezing Process and Frozen Storage. *Foods* *2020*, *Vol. 9*, *Page 1886*, *9*(12), 1886. <https://doi.org/10.3390/FOODS9121886>
- Ngoua Meye, R., Sima, C., Ndong, J., Ndong, G., Ondo, J., Ovono, F., & Obame, L. (2019). Medicinal plants used in management of cancer and other related diseases in Woleu-Ntem province, Gabon. *European Journal of Integrative Medicine*, *29*, 100924. <https://doi.org/10.1016/J.EUJIM.2019.05.010>
- Nitti, P., Kunjalukkal, S., Cortazzi, S., & Stanca, E. (2021). Enhancing Bioactivity of Hydroxyapatite Scaffolds Using Fibrous Type I Collagen. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*, 631177. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.631177>
- Nocera, A. D., Comín, R., Salvatierra, N. A., & Cid, M. P. (2018). Development of 3D printed fibrillar collagen scaffold for tissue engineering. *Biomedical Microdevices*, *20*(2), 1–13. <https://doi.org/10.1007/S10544-018-0270-Z/FIGURES/6>
- Nokoorani, Y. D., Shamloo, A., Bahadoran, M., & Moravvej, H. (2021). Fabrication and characterization of scaffolds containing different amounts of allantoin for skin tissue engineering. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-021-95763-4>
- Nosrati, H., Aramideh Khoy, R., Nosrati, A., & Khodaei, M. (2021). Nanocomposite scaffolds for accelerating chronic wound healing by enhancing angiogenesis. *Journal of Nanobiotechnology* *2021 19:1*, *19*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/S12951-020-00755-7>
- Nurfriana, P., Widiyanti, P., & Rudyarjo, D. I. (2019). Effect of collagen-chitosan-glycerol composition in scaffold for gingival recession therapy. *Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering*, *40*, 101–108. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/JBBBE.40.101>

- Nurzyńska, R. (2023). Phenolic Compounds from New Natural Sources—Plant Genotype and Ontogenetic Variation. *Molecules*, 28(4). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28041731>
- Offeddu, G. S., Ashworth, J. C., Cameron, R. E., & Oyen, M. L. (2016). Structural determinants of hydration, mechanics and fluid flow in freeze-dried collagen scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 41, 193–203. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2016.05.024>
- Osés, S. M., Pascual-Maté, A., de la Fuente, D., de Pablo, A., Fernández-Muiño, M. A., & Sancho, M. T. (2021). Comparison of methods to determine antibacterial activity of honeys against *Staphylococcus aureus*. *Https://Doi.Org/10.1016/j.Njas.2015.12.005*, 78, 29–33. <https://doi.org/10.1016/J.NJAS.2015.12.005>
- Perumal, R. K., Gopinath, A., Thangam, R., & Perumal, S. (2018). Collagen-silica bio-composite enriched with *Cynodon dactylon* extract for tissue repair and regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 92, 297–306. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2018.06.050>
- Petrova, M., Dimitrova, L., Dimitrova, M., Denev, P., Teneva, D., & Georgieva, A. (2023). Antitumor and Antioxidant Activities of In Vitro Cultivated and Wild-Growing *Clinopodium vulgare* L. *Plants*. *Plants 2023*, Vol. 12, Page 1591, 12(8), 1591. <https://doi.org/10.3390/PLANTS12081591>
- Pipattanawarothai, A., Suksai, C., Srisook, K., & Trakulsujaritchok, T. (2017). Non-cytotoxic hybrid bioscaffolds of chitosan-silica: Sol-gel synthesis, characterization and proposed application. *Carbohydrate Polymers*, 178, 190–199. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.09.047>
- Pui, C. L., Tang, M., Annor, A., & Ebersole, G. (2012). Effect of repetitive loading on the mechanical properties of biological scaffold materials. *Journal of the American College of Surgeons*, 215(2), 216–228. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2012.03.006>

- Radhika, S., Gobalakrishnan, M., Aranganathan, L., & Karthih, M. (2020). Fabrication and characterization of chitosan based collagen/ gelatin composite scaffolds from big eye snapper *Priacanthus hamrur* skin for antimicrobial and anti oxidant applications. *Materials Science and Engineering: C*, *107*, 110270. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.110270>
- Ramanathan, G., Singaravelu, S., & Muthukumar, T. (2017). Design and characterization of 3D hybrid collagen matrixes as a dermal substitute in skin tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, *72*, 359–370. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2016.11.095>
- Ramanathan, G., Singaravelu, S., Muthukumar, T., & Thyagarajan, S. (2017). Design and characterization of 3D hybrid collagen matrixes as a dermal substitute in skin tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, *72*, 359–370. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2016.11.095>
- Ramos Da Silva, L. R., Ferreira, O. O., Cruz, J. N., De Jesus Pereira Franco, C., Oliveira Dos Anjos, T., Cascaes, M. M., Almeida Da Costa, W., Helena De Aguiar Andrade, E., & Santana De Oliveira, M. (2021). Lamiaceae Essential Oils, Phytochemical Profile, Antioxidant, and Biological Activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6748052>
- Romani, R., Bedini, S., Salerno, G., Ascriczzi, R., Flamini, G., Echeverria, M. C., Farina, P., & Conti, B. (2019). Andean Flora as a Source of New Repellents against Insect Pests: Behavioral, Morphological and Electrophysiological Studies on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Insects 2019*, Vol. 10, Page 171, 10(6), 171. <https://doi.org/10.3390/INSECTS10060171>
- Rubio, I., Bernáldez, J., Moreno, A., Vilanova, C., Juárez, P., Licea, A., & Castro, A. (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>
- Ruiz, M. (2020). Guía de Determinación de la actividad antioxidante. *Universidad Simón*

*Bolivar, 1(1), 1–7.*

- Salati, M., Khazai, J., Tahmuri, A., Samadi, A., Taghizadeh, A., Taghizadeh, M., Zarrintaj, P., Ramsey, J., Habibzadeh, S., Seidi, F., Saeb, M., & Mozafari, M. (2020). Agarose-Based Biomaterials: Opportunities and Challenges in Cartilage Tissue Engineering. *Polymers, 12(5)*. <https://doi.org/10.3390/POLYM12051150>
- Saltos, M. B. V., Puente, B. F. N., Malafronte, N., & Braca, A. (2014). Phenolic compounds from *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts (Lamiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society, 25(11)*, 2121–2124. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140181>
- Samrot, A., Sathiyasree, M., Rahim, S., Renitta, R., Kasipandian, K., Krithika, S., Rajalakshmi, D., Shobana, N., Dhiva, S., Abirami, S., Visvanathan, S., Mohanty, B., Sabesan, G., & Chinni, S. (2023). Scaffold Using Chitosan, Agarose, Cellulose, Dextran and Protein for Tissue Engineering—A Review. *Polymers 2023, Vol. 15, Page 1525, 15(6)*, 1525. <https://doi.org/10.3390/POLYM15061525>
- Santos, V., Marques, N., Maia, P., Lima, M., Barbosa, F., & Galba, M. (2020). Seafood Waste as Attractive Source of Chitin and Chitosan Production and Their Applications. *International Journal of Molecular Sciences, 21(12)*, 1–17. <https://doi.org/10.3390/IJMS21124290>
- Sarauz, L. (2021). Conocimiento ancestral de plantas medicinales en la comunidad de Sahuangal, parroquia Pacto, Pichincha, Ecuador. *Revista Vive, 4(10)*, 72–85. <https://doi.org/10.33996/REVISTAVIVE.V4I10.77>
- Sarikurkcu, C., Ozer, M. S., Tepe, B., Dilek, E., & Ceylan, O. (2015). Phenolic composition, antioxidant and enzyme inhibitory activities of acetone, methanol and water extracts of *Clinopodium vulgare* L. subsp. *vulgare* L. *Industrial Crops and Products, 76*, 961–966. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2015.08.011>
- Satish, T., Vijaya, D., & Sampath, N. (2019). Preparation and characterization of biodegradable collagen – Chitosan scaffolds. *Materials Today: Proceedings, 19*, 2587–2590. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2019.10.091>

- Shaikh, J. R., & Patil, M. (2020). Qualitative tests for preliminary phytochemical screening: An overview. *International Journal of Chemical Studies*, 8(2), 603–608. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i2i.8834>
- Sharma, P., Kumar, P., Sharma, R., Bhatt, V. D., & Dhot, P. S. (2019). Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope. *Journal of Medicine and Life*, 12(3), 225. <https://doi.org/10.25122/JML-2019-0032>
- Sharma, T., Pandey, B., Shrestha, B. K., Koju, G. M., Thusa, R., & Karki, N. (2020). Phytochemical Screening of Medicinal Plants and Study of the Effect of Phytoconstituents in Seed Germination. *Tribhuvan University Journal*, 35(2), 1–11. <https://doi.org/10.3126/tuj.v35i2.36183>
- Siddeeg, A., AlKehayez, N. M., & Abu-Hiamed, H. A. (2021). Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(3), 1633. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.11.064>
- Singaravelu, S., Ramanathan, G., Raja, M. D., Nagiah, N., Padmapriya, P., Kaveri, K., & Sivagnanam, U. T. (2016). Biomimetic interconnected porous keratin-fibrin-gelatin 3D sponge for tissue engineering application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 810–819. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.021>
- Sithisarn, P., Supabphol, R., & Gritsanapan, W. (2006). Comparison of free radical scavenging activity of Siamese neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss var. *siamensis* Valetton) leaf extracts prepared by different methods of extraction. *Medical Principles and Practice: International Journal of the Kuwait University, Health Science Centre*, 15(3), 219–222. <https://doi.org/10.1159/000092185>
- Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Hubinger, M. D., & Roques, M. A. (2001). Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, 15(4–6), 423–432. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00061-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00061-3)
- Stanescu, P., Radu, I., Leu Alexa, R., & Hudita, A. (2021). Novel chitosan and bacterial cellulose biocomposites tailored with polymeric nanoparticles for modern wound

- dressing development. *Drug Delivery*, 28(1), 1932. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1977423>
- Stenhamre, H., Nannmark, U., Lindahl, A., & Brittberg, M. (2011). Influence of pore size on the redifferentiation potential of human articular chondrocytes in poly(urethane urea) scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5(7), 578–588. <https://doi.org/10.1002/TERM.350>
- Suamte, L., Tirkey, A., Barman, J., & Jayasekhar Babu, P. (2023). Various manufacturing methods and ideal properties of scaffolds for tissue engineering applications. *Smart Materials in Manufacturing*, 1, 100011. <https://doi.org/10.1016/J.SMMF.2022.100011>
- Sugawara, E., & Nikaido, H. (2014). Código de Ética de la Medicina Ancestral-Tradicional de las Nacionalidades y Pueblos del Ecuador. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(12), 7250–7257. [https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2020/12/codigo\\_de\\_etica\\_revison\\_final\\_23\\_12\\_2020-pdf.pdf](https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2020/12/codigo_de_etica_revison_final_23_12_2020-pdf.pdf)
- Sukpaita, T., Chirachanchai, S., Pimkhaokham, A., & Ampornaramveth, R. (2021). Chitosan-Based Scaffold for Mineralized Tissues Regeneration. *Marine Drugs*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/MD19100551>
- Sultana, N. (2018). Mechanical and biological properties of scaffold materials. *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds: Materials, Technologies, and Applications*, 1–21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100979-6.00001-X>
- Sultankulov, B., Berillo, D., Sultankulova, K., Tokay, T., & Saparov, A. (2019). Progress in the Development of Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Biomolecules*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/BIOM9090470>
- Sutar, T., Bangde, P., Dandekar, P., & Adivarekar, R. (2021). Herbal hemostatic biopolymeric dressings of alginate/pectin coated with Croton oblongifolius extract. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2(June 2020), 100025. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2020.100025>

- Tamburaci, S., Perpelek, M., Aydemir, S., & Baykara, B. (2023). Fabrication of Helix aspersa Extract Loaded Gradient Scaffold with an Integrated Architecture for Osteochondral Tissue Regeneration: Morphology, Structure, and In Vitro Bioactivity. *ACS Applied Bio Materials*, 6(4), 1504–1514. [https://doi.org/10.1021/ACSABM.2C01050/ASSET/IMAGES/LARGE/MT2C01050\\_0012.JPG](https://doi.org/10.1021/ACSABM.2C01050/ASSET/IMAGES/LARGE/MT2C01050_0012.JPG)
- Thongtham, N., Chai-in, P., Unger, O., Boonrunsiman, S., & Suwantong, O. (2020). Fabrication of chitosan/collagen/hydroxyapatite scaffolds with encapsulated Cissus quadrangularis extract. *Polymers for Advanced Technologies*, 31(7), 1496–1507. <https://doi.org/10.1002/pat.4879>
- Tian, Y., Wu, D., Wu, D., & Peng, C. (2022). Chitosan-Based Biomaterial Scaffolds for the Repair of Infected Bone Defects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2022.899760>
- Toriseva, M., & Kähäri, V. (2009). Proteinases in cutaneous wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 66(2), 203–224. <https://doi.org/10.1007/S00018-008-8388-4>
- Tseng, H. J., Tsou, T. L., Wang, H. J., & Hsu, S. hui. (2013). Characterization of chitosan-gelatin scaffolds for dermal tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7(1), 20–31. <https://doi.org/10.1002/TERM.492>
- Tubon, I., Bernardini, C., Antognoni, F., Mandrioli, R., Potente, G., Bertocchi, M., Vaca, G., Zannoni, A., Salaroli, R., & Forni, M. (2020). Clinopodium tomentosum (Kunth) Govaerts Leaf Extract Influences in vitro Cell Proliferation and Angiogenesis on Primary Cultures of Porcine Aortic Endothelial Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2984613>
- Tusevski, O., Kostovska, A., Iloska, A., Trajkovska, L., & Simic, S. (2014). Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. *Central European Journal of Biology*, 9(9), 888–900.
- Týskiewicz, K., Konkol, M., & Rój, E. (2018). The Application of Supercritical Fluid



- Extraction in Phenolic Compounds Isolation from Natural Plant Materials. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23(10). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23102625>
- Vázquez, A., Mejía, J., García, K., & Velázquez, G. (2022). Capacidad antioxidante: conceptos, métodos de cuantificación y su aplicación en la caracterización de frutos tropicales y productos derivados. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 9(1), 9–33. <https://doi.org/10.23850/24220582.4023>
- Veerasubramanian, P. K., Thangavel, P., Kannan, R., Chakraborty, S., & Ramachandran, B. (2018). An investigation of konjac glucomannan-keratin hydrogel scaffold loaded with Avena sativa extracts for diabetic wound healing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 165, 92–102. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2018.02.022>
- Vélez, J. (2019). “Evaluación in vivo de la actividad cicatrizante del extracto etanólico de *Clinopodium tomentosum* (Kunth) en lesiones inducidas en ratones (*Mus musculus*).”
- Vesvoranan, O., Anup, A., & Hixon, K. R. (2022). Current Concepts and Methods in Tissue Interface Scaffold Fabrication. *Biomimetics 2022, Vol. 7, Page 151*, 7(4), 151. <https://doi.org/10.3390/BIOMIMETICS7040151>
- Vladimir, S., Blazekovic, B., Kindl, M., Vlastic, J., & Brantner, A. (2014). Acetylcholinesterase Inhibitory, Antioxidant and Phytochemical Properties of Selected Medicinal Plants of the Lamiaceae Family. *Molecules 2014, Vol. 19, Pages 767-782*, 19(1), 767–782. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES19010767>
- Weber, M., Steinle, H., Golombek, S., & Hann, L. (2018). Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 395774. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2018.00099/BIBTEX>
- Wissing, T., Bonito, V., van Haften, E., Doeselaar, M. van, & Smits, A. (2019). Macrophage-Driven Biomaterial Degradation Depends on Scaffold Microarchitecture. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(APR).

<https://doi.org/10.3389/FBIOE.2019.00087>

- Xia, D., Chen, J., Zhang, Z., & Dong, M. (2022). Emerging polymeric biomaterials and manufacturing techniques in regenerative medicine. *Aggregate*, 3(5), e176. <https://doi.org/10.1002/AGT2.176>
- Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., & Zhou, Y. (2017). Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1). <https://doi.org/10.3390/IJMS18010096>
- Zaman, H. U., Islam, J. M. M., Khan, M. A., & Khan, R. A. (2011). Physico-mechanical properties of wound dressing material and its biomedical application. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(7), 1369–1375. <https://doi.org/10.1016/J.JMBBM.2011.05.007>
- Zargoosh, Z., Ghavam, M., Bacchetta, G., & Tavili, A. (2019). Effects of ecological factors on the antioxidant potential and total phenol content of *Scrophularia striata* Boiss. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-52605-8>
- Zarrintaj, P., Manouchehri, S., Ahmadi, Z., Saeb, M., Urbanska, A., Kaplan, D., & Mozafari, M. (2018). Agarose-based biomaterials for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 187, 66–84. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.01.060>
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13(1), 20. <https://doi.org/10.1186/S13020-018-0177-X>
- Zhang, Z., Feng, Y., & Wang, L. (2022). A review of preparation methods of porous skin tissue engineering scaffolds. *Materials Today Communications*, 32, 104109. <https://doi.org/10.1016/J.MTCOMM.2022.104109>
- Zhao, X., Hu, D. A., Wu, D., & Athiviraham, A. (2021). Applications of Biocompatible Scaffold Materials in Stem Cell-Based Cartilage Tissue Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 141.

<https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.603444/BIBTEX>

- Zhou, G., Zhu, J., Inverarity, C., Fang, Y., Zhang, Z., Ye, H., Cui, Z., Nguyen, L., Wan, H., & Dye, J. F. (2023). Fabrication of Fibrin/Polyvinyl Alcohol Scaffolds for Skin Tissue Engineering via Emulsion Templating. *Polymers* 2023, Vol. 15, Page 1151, 15(5), 1151. <https://doi.org/10.3390/POLYM15051151>
- Zhu, Y. Di, Hong, J. Y., Bao, F. Da, Sun, Z. H., Luo, Y., Jiang, H., Xu, X. D., & Yang, J. S. (2018). Triterpenoid saponins from *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze and their biological activity. *Archives of Pharmacal Research*, 41(12), 1117–1130. <https://doi.org/10.1007/S12272-017-0943-9/TABLES/3>
- Zimina, A., Senatov, F., Choudhary, R., Kolesnikov, E., Anisimova, N., Kiselevskiy, M., Orlova, P., & Strukova, N. (2020). Biocompatibility and Physico-Chemical Properties of Highly Porous PLA/HA Scaffolds for Bone Reconstruction. *Polymers* 2020, Vol. 12, Page 2938, 12(12), 2938. <https://doi.org/10.3390/POLYM12122938>
- Zou, Y., Zhang, L., Yang, L., Zhu, F., Ding, M., Lin, F., Wang, Z., & Li, Y. (2018). “Click” chemistry in polymeric scaffolds: Bioactive materials for tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 273(January), 160–179. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.01.023>

## ANEXOS

### ANEXO A. Caracterización de extracto

**A**



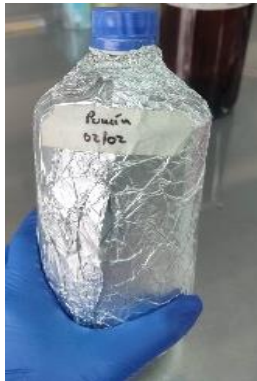
**B**



**Figura 17.** *Preparación del material vegetal.*

**A.** Preparación del material vegetal. **B.** Secado Pulverizado de la hoja de Pumín

**A**



**B**



**Figura 18.** *Extracción Hidroalcohólica*

**A.** Maceración en etanol al 70% **B.** filtración de compuestos sólidos

**A**



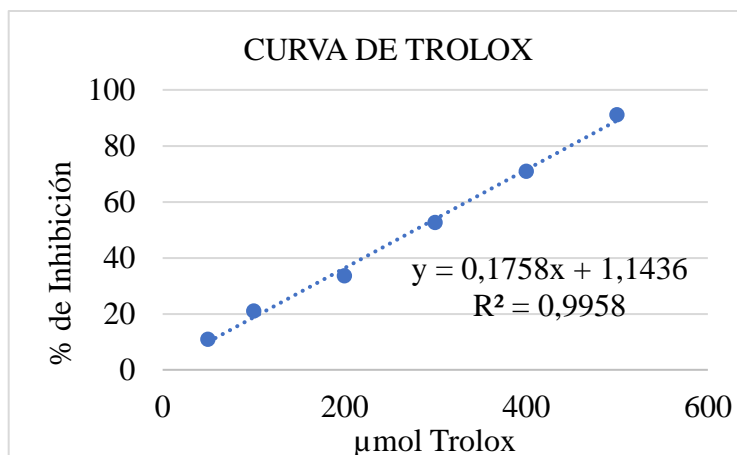
**B**



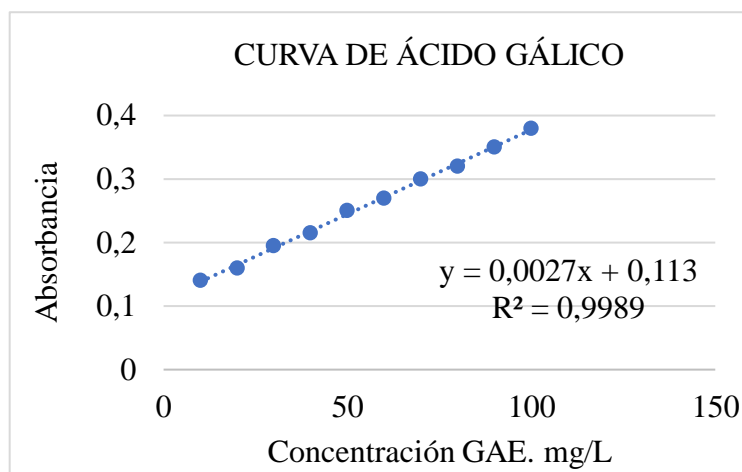
**Figura 19.** *Obtención del extracto de Pumín.*

**A.** Proceso de Rotoevaporación y recuperación del solvente. **B.** Extracto de Pumín en polvo

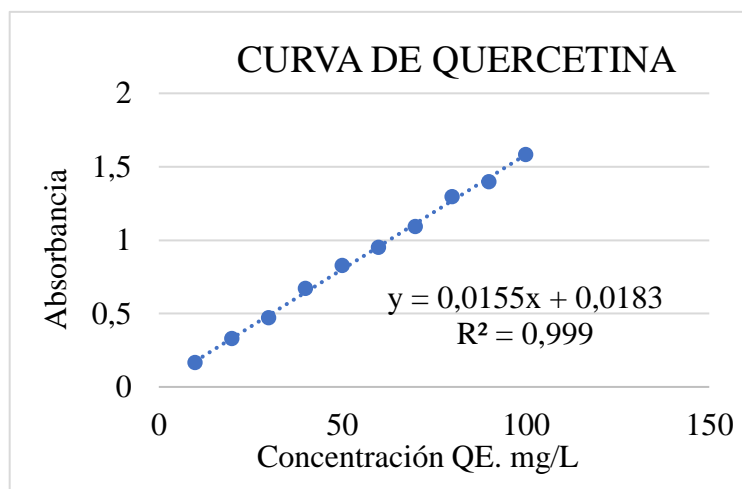
## ANEXO B. Curvas de calibración para la caracterización de los extractos



**Figura 20.** Curva de Trolox para la cuantificación de la capacidad antioxidante

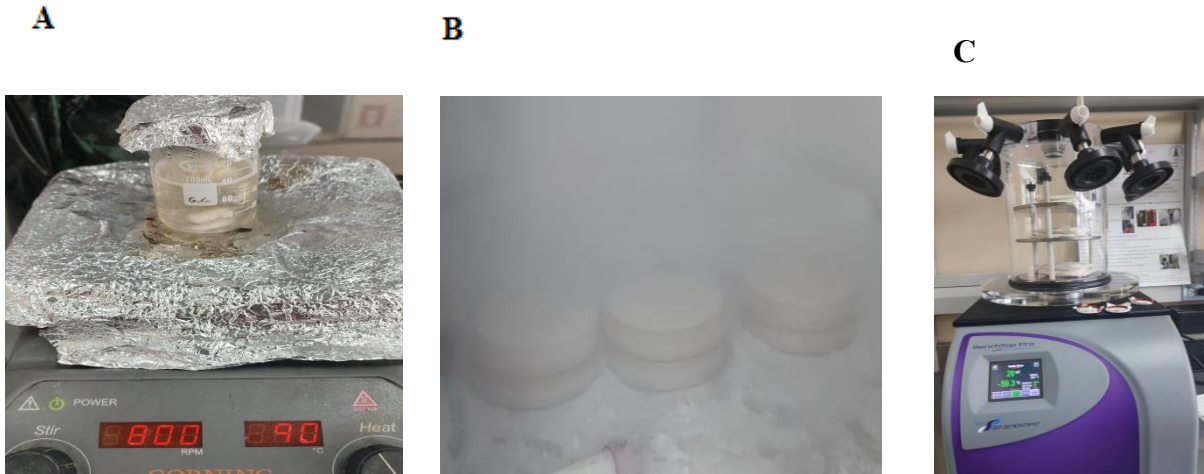


**Figura 21.** Curva de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales



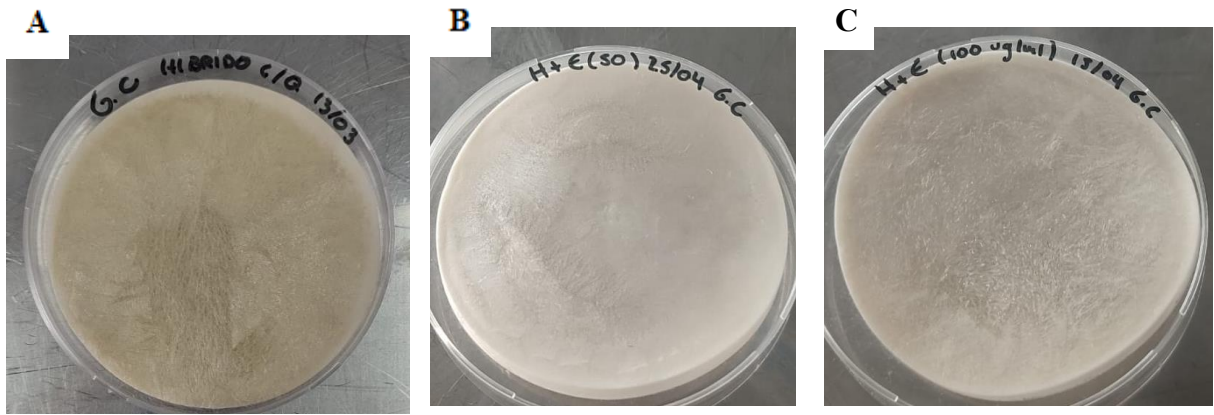
**Figura 22.** Curva de quercetina para la cuantificación de flavonoides totales.

## ANEXO C. Elaboración de ABs



**Figura 23.** *Elaboración de ABs*

A. preparación de la solución. B Almacenamiento en refrigeración 24 h y ultracongelación. C. liofilización



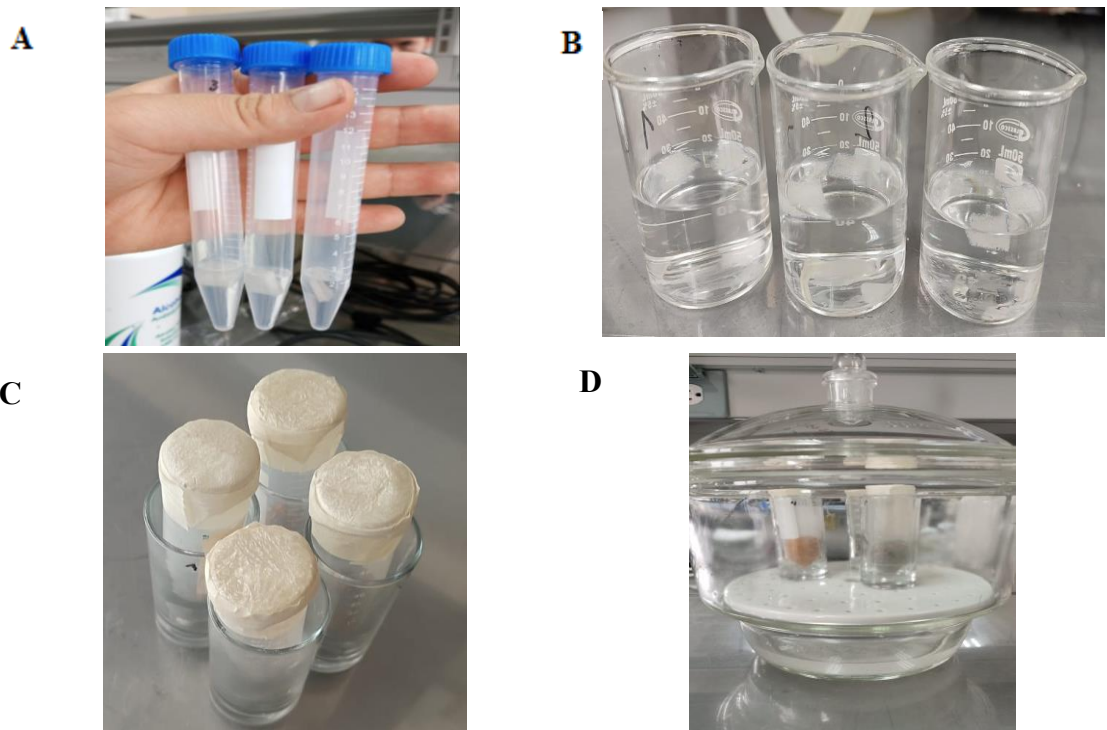
**Figura 24.** *Obtención de ABs*

A. ABs CQ. B. CQ+EECT 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  C. CQ+EECT a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$



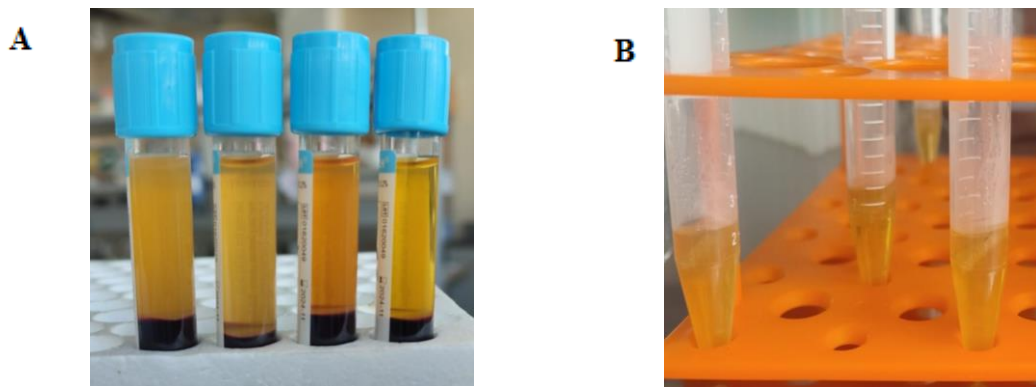
**Figura 25.** *Almacenamiento de ABs para su posterior uso.*

## ANEXO D. Evaluación de las propiedades de los ABs



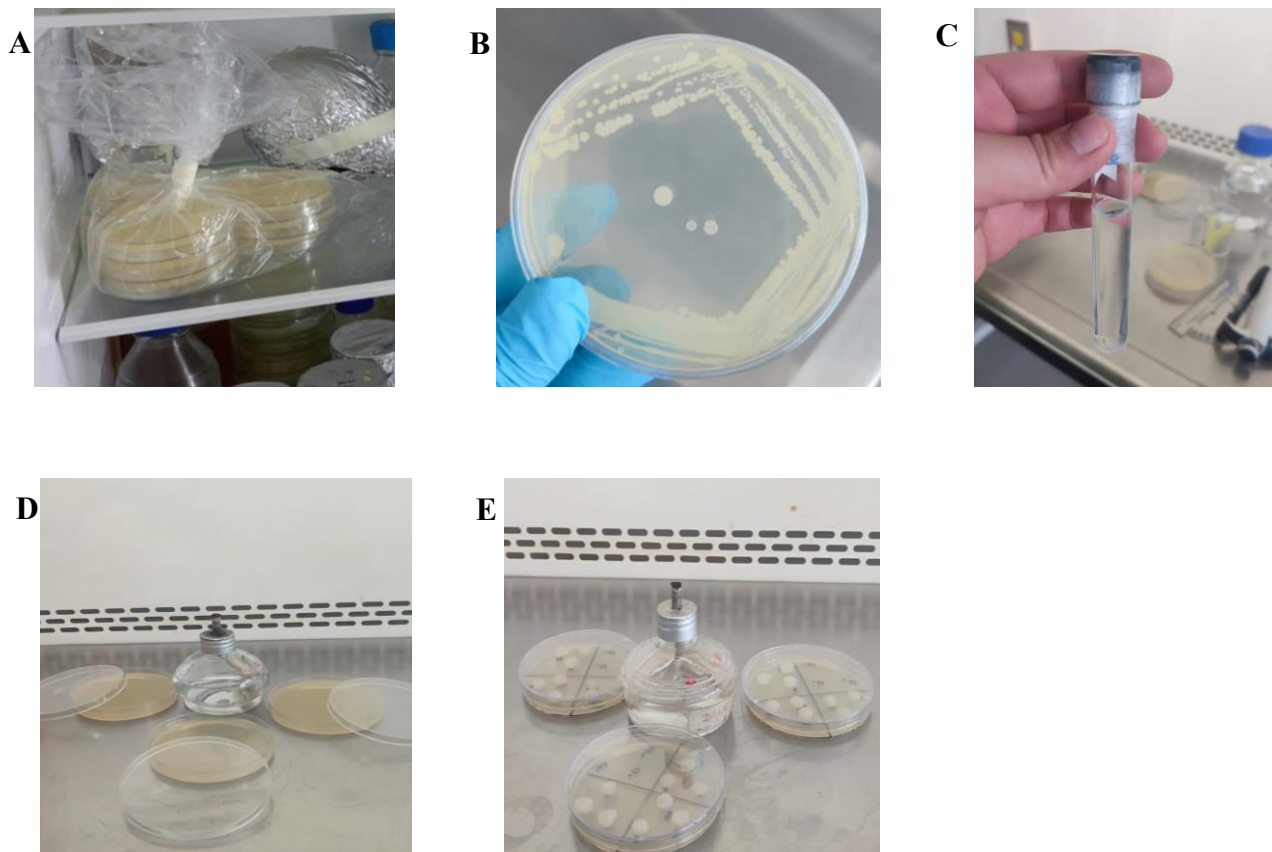
**Figura 25.** *Evaluación de las propiedades físicas*

A. Infiltración en etanol para la determinación del porcentaje de porosidad B. Capacidad de absorción de agua C-D: Permeabilidad de vapor de agua



**Figura 26.** *Prueba de biodegradabilidad.*

A. Obtención del plasma sanguíneo. B. Tubos falcón de 15 ml con Plasma y ABs en secciones de 1cm<sup>2</sup>.



**Figura 27. Actividad antimicrobiana.**

A. Almacenamiento del medio MH previamente preparado. Aislamiento de la cepa bacteriana C. Escala Mc Farland D. Aclimatación de las cajas petri E. Colocación de los ABs tras dispersar el agente microbiano F. Incubación

## ANEXO E. Tablas de las propiedades morfológicas, físicas y biológicas

**Tabla 7.** Pesos obtenidos para el cálculo de porosidad

Tiempo	CQ					
	R1	R2	R3	R4	R5	R6
<b>0 horas</b>	0,0199	0,0214	0,0184	0,0196	0,0171	0,0212
<b>24 Horas</b>	0,085	0,214	0,113	0,186	0,1118	0,187
<b>% Porosidad</b>	88,000	89,958	83,680	89,423	84,671	88,621
<b>Promedio</b>	87,392					



<b>DS</b>	2,599					
	<b>CQ+EECT (50 µg/mL)</b>					
<b>Tiempo</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>	<b>R6</b>
<b>0 horas</b>	0,0148	0,0139	0,0177	0,0198	0,0164	0,0145
<b>24 Horas</b>	0,1324	0,1488	0,164	0,1968	0,1571	0,1400
<b>% Porosidad</b>	88,792	90,631	89,172	89,900	89,528	89,614
<b>Promedio</b>	89,606					
<b>DS</b>	0,631					
	<b>CQ+EECT (100 µg/mL)</b>					
<b>Tiempo</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>	<b>R6</b>
<b>0 horas</b>	0,0164	0,0141	0,0169	0,0162	0,021	0,0142
<b>24 Horas</b>	0,1208	0,1216	0,1328	0,1342	0,1782	0,1138
<b>% Porosidad</b>	86,391	88,377	87,241	87,896	88,174	87,494
<b>Promedio</b>	87,595					
<b>DS</b>	0,724					

**Tabla 8.** Pesos obtenidos para el cálculo de la capacidad de absorción de agua

Tiempo	CQ						CQ+EECT (50 µg/ml)						CQ+EECT (100 µg/ml)					
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R1	R2	R3	R4	R5	R6
<b>0:00</b>	0,025	0,030	0,025	0,026	0,024	0,025	0,016	0,015	0,017	0,016	0,018	0,019	0,017	0,019	0,022	0,017	0,015	0,017
<b>0:30</b>	0,378	0,342	0,344	0,367	0,304	0,355	0,147	0,133	0,150	0,203	0,263	0,259	0,263	0,319	0,339	0,260	0,239	0,188
<b>1:00</b>	0,360	0,366	0,360	0,390	0,312	0,319	0,177	0,173	0,213	0,211	0,237	0,178	0,370	0,381	0,380	0,307	0,250	0,213
<b>1:30</b>	0,336	0,360	0,329	0,376	0,310	0,316	0,193	0,179	0,198	0,206	0,202	0,169	0,349	0,360	0,395	0,299	0,264	0,207
<b>2:00</b>	0,320	0,355	0,324	0,352	0,309	0,311	0,188	0,175	0,220	0,210	0,238	0,237	0,276	0,328	0,349	0,296	0,254	0,212
<b>2:30</b>	0,319	0,326	0,320	0,348	0,259	0,310	0,201	0,169	0,213	0,220	0,209	0,185	0,265	0,290	0,317	0,221	0,218	0,193
<b>3:00</b>	0,276	0,304	0,299	0,312	0,253	0,262	0,186	0,190	0,226	0,236	0,257	0,259	0,228	0,264	0,313	0,226	0,192	0,158
<b>3:30</b>	0,263	0,270	0,264	0,286	0,235	0,245	0,212	0,179	0,203	0,228	0,248	0,272	0,226	0,281	0,291	0,179	0,175	0,167
<b>4:00</b>	0,240	0,268	0,246	0,272	0,222	0,243	0,231	0,171	0,218	0,231	0,244	0,218	0,227	0,282	0,310	0,193	0,180	0,116
<b>4:30</b>	0,232	0,249	0,241	0,261	0,214	0,236	0,193	0,179	0,220	0,235	0,259	0,256	0,207	0,236	0,254	0,174	0,169	0,162
<b>5:00</b>	0,230	0,243	0,234	0,260	0,214	0,218	0,197	0,165	0,211	0,197	0,248	0,231	0,182	0,217	0,237	0,162	0,152	0,160
<b>5:30</b>	0,218	0,240	0,206	0,228	0,195	0,200	0,203	0,180	0,165	0,222	0,287	0,259	0,157	0,221	0,237	0,158	0,143	0,152
<b>6:00</b>	0,208	0,240	0,200	0,219	0,182	0,195	0,219	0,173	0,153	0,253	0,273	0,241	0,141	0,179	0,225	0,153	0,133	0,145

**Tabla 9.** Pesos obtenidos para el cálculo de la capacidad de absorción de agua para cada uno de los ABs

Tiempo	CQ					
	R1	R2	R3	R4	R5	R6
<b>0:00</b>	0	0	0	0	0	0
<b>0:30</b>	1430,364	1058,644	1263,889	1324,031	1151,852	1312,749
<b>1:00</b>	1355,466	1141,017	1328,175	1409,690	1185,185	1171,315
<b>1:30</b>	1259,514	1120,678	1204,762	1355,814	1175,720	1159,761
<b>2:00</b>	1193,927	1104,407	1184,921	1263,566	1169,547	1139,442
<b>2:30</b>	1189,474	1004,746	1168,254	1247,287	967,078	1136,653
<b>3:00</b>	1018,623	930,508	1086,508	1109,302	939,506	941,833
<b>3:30</b>	963,968	813,898	946,032	1007,364	867,490	875,697
<b>4:00</b>	871,255	807,797	876,984	952,326	813,580	866,135
<b>4:30</b>	838,866	745,085	854,365	912,791	781,481	841,833
<b>5:00</b>	831,174	722,373	829,365	907,364	779,012	769,721
<b>5:30</b>	781,781	714,576	718,651	782,558	700,412	696,016
<b>6:00</b>	740,081	711,864	693,651	748,837	646,914	674,900

Tiempo	CQ+EECT (50 µg/mL)					
	R1	R2	R3	R4	R4	R5
<b>0:00</b>						
<b>0:30</b>	793,293	767,320	793,452	1183,544	1335,519	1251,042
<b>1:00</b>	976,829	1033,333	1168,452	1234,810	1196,721	826,563
<b>1:30</b>	1077,439	1067,974	1078,571	1200,633	1004,372	782,292
<b>2:00</b>	1044,512	1046,405	1208,929	1228,481	1198,907	1134,375
<b>2:30</b>	1125,000	1001,961	1166,071	1293,671	1043,169	865,625
<b>3:00</b>	1031,098	1139,869	1244,048	1391,139	1306,557	1248,438
<b>3:30</b>	1191,463	1072,549	1106,548	1340,506	1252,459	1317,708
<b>4:00</b>	1308,537	1014,379	1198,810	1362,025	1235,519	1033,854
<b>4:30</b>	1073,780	1068,627	1210,714	1386,709	1312,568	1234,896
<b>5:00</b>	1098,171	978,431	1154,167	1146,203	1253,005	1103,125
<b>5:30</b>	1139,634	1078,431	881,548	1306,329	1468,306	1248,958

<b>6:00</b>	1237,195	1030,065	810,119	1498,101	1391,803	1155,208
<b>Tiempo</b>	<b>CQ+EECT (100 µg/mL)</b>					
<b>0:00</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>
<b>0:30</b>	0	0	0	0	0	0
<b>1:00</b>	1419,653	1553,368	1448,858	1437,278	1453,896	981,609
<b>1:30</b>	2036,416	1872,539	1634,703	1715,976	1521,429	1122,414
<b>2:00</b>	1915,607	1766,839	1704,566	1670,414	1616,883	1091,954
<b>2:30</b>	1495,376	1600,518	1491,781	1652,071	1547,403	1115,517
<b>3:00</b>	1428,902	1402,073	1345,662	1207,692	1314,286	1010,920
<b>3:30</b>	1219,075	1269,948	1330,594	1237,870	1147,403	809,770
<b>4:00</b>	1204,046	1354,922	1228,767	960,947	1036,364	856,897
<b>4:30</b>	1213,873	1362,694	1316,895	1043,787	1066,883	563,793
<b>5:00</b>	1094,566	1123,834	1057,534	931,953	1000,000	831,609
<b>5:30</b>	952,023	1025,907	982,648	856,213	883,766	817,241
<b>6:00</b>	806,936	1046,114	981,279	831,953	825,974	771,839

**Tabla 10.** Resultados de la capacidad de absorción de agua promedio

<b>Tiempo</b>	<b>CQ</b>	<b>CQ+EECT (50 µg/mL)</b>	<b>CQ+EECT (100 µg/mL)</b>
<b>0:00</b>	0	0	0
<b>0:30</b>	1256,922	1020,695	1382,444
<b>1:00</b>	1265,141	1072,785	1650,579
<b>1:30</b>	1212,708	1035,213	1627,711
<b>2:00</b>	1175,968	1143,602	1483,778
<b>2:30</b>	1118,915	1082,583	1284,922
<b>3:00</b>	1004,380	1226,858	1169,110
<b>3:30</b>	912,408	1213,539	1106,990
<b>4:00</b>	864,680	1192,187	1094,654
<b>4:30</b>	829,070	1214,549	1006,583
<b>5:00</b>	806,502	1122,184	919,633
<b>5:30</b>	732,332	1187,201	877,349

<b>6:00</b>	702,708	1187,082	795,497
-------------	---------	----------	---------

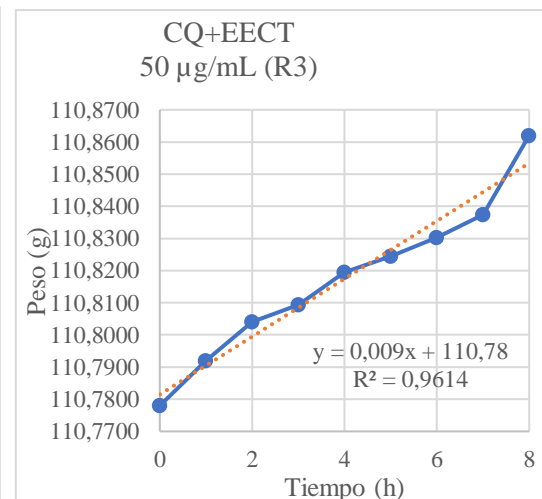
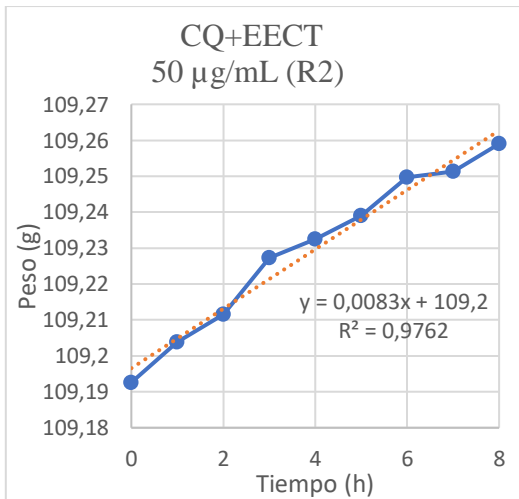
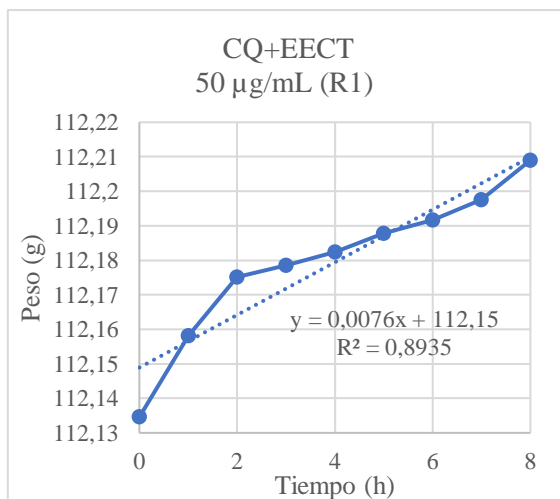
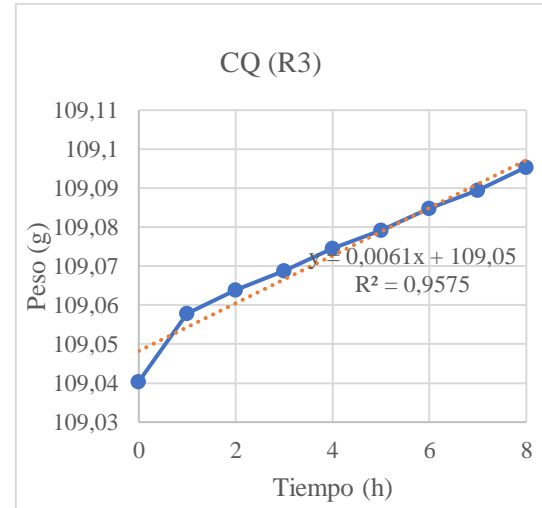
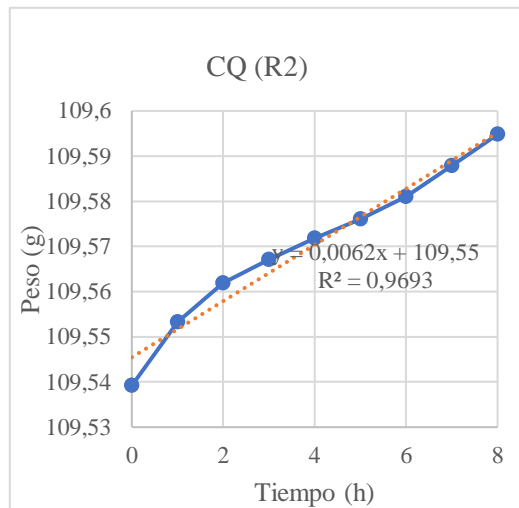
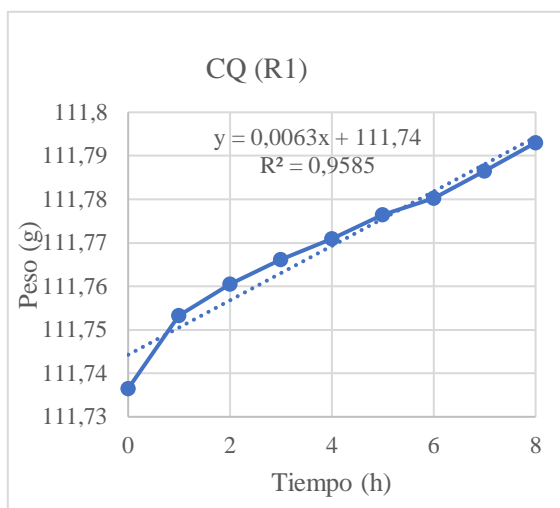
**Tabla 11.** Datos obtenidos de la prueba mecánica mediante la maquina Universal

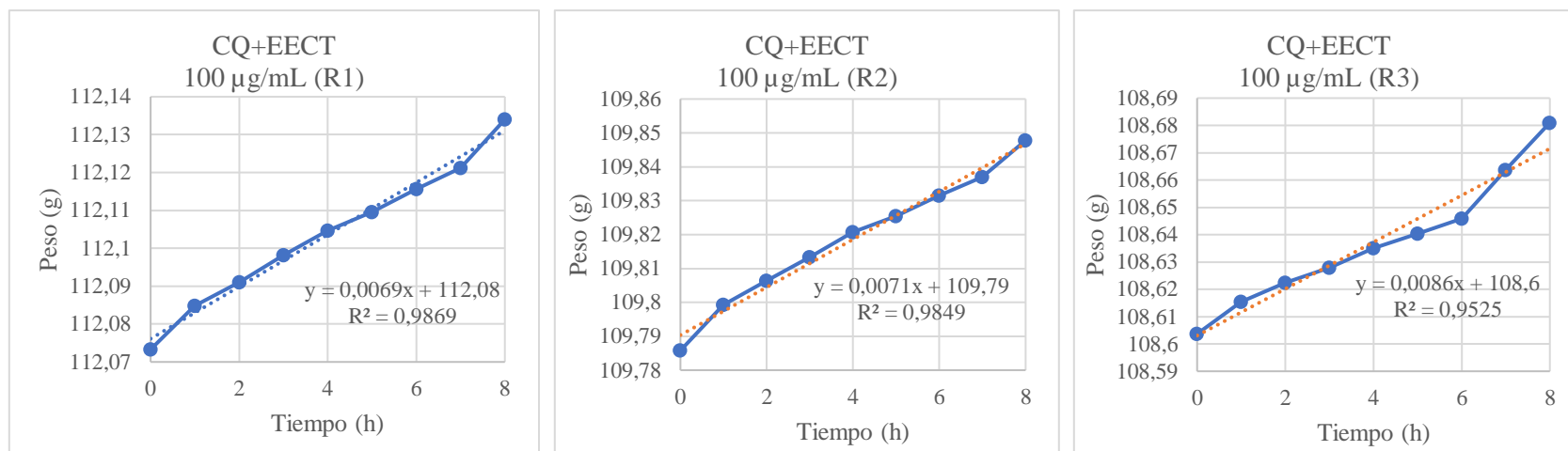
<b>Tipos de andamios</b>	<b>Réplicas</b>	<b>Max.Esfuerzo (MPa)</b>	<b>Rotura de desplazamiento (mm)</b>	<b>Rotura Esfuerzo (MPa)</b>	<b>Rotura Deformación (%)</b>
<b>H</b>	<b>R1</b>	0,11	1,72	0,80	4,63
	<b>R2</b>	0,08	1,99	0,16	5,26
	<b>R3</b>	0,21	2,84	0,12	7,81
	<b>PROMEDIO</b>	0,13	2,18	0,36	5,90
	<b>SD</b>	0,07	0,58	0,38	1,68
<b>H+E (50)</b>	<b>R1</b>	0,14	3,29	0,09	8,61
	<b>R2</b>	0,06	2,61	0,01	6,96
	<b>R3</b>	0,06	3,42	0,01	8,90
	<b>PROMEDIO</b>	0,09	3,11	0,04	8,16
	<b>SD</b>	0,05	0,44	0,04	1,05
<b>H+E (100)</b>	<b>R1</b>	0,03	0,46	0,34	1,30
	<b>R2</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
	<b>R3</b>	0,08	4,39	0,01	12,19
	<b>PROMEDIO</b>	<b>0,04</b>	<b>1,62</b>	<b>0,12</b>	<b>4,50</b>
	<b>SD</b>	0,04	2,41	0,20	6,70

**Tabla 12.** Datos obtenidos de la transferencia de por de agua (WVTR) y permeabilidad al vapor de agua (WVP) de los ABs

Réplicas Tiempo (h)	CQ			CQ+EECT (50µg/mL)			CQ+EECT (100µg/mL)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Peso (g) 0	111,7365	109,5392	109,0404	112,1346	109,1926	110,7780	112,0733	109,7858	108,6037
Peso (g) 1	111,7533	109,5533	109,0579	112,1582	109,2038	110,7920	112,0848	109,7993	108,6154
Peso (g) 2	111,7605	109,5619	109,0639	112,1752	109,2115	110,8041	112,0911	109,8064	108,6224
Peso (g) 3	111,7662	109,5671	109,0688	112,1785	109,2273	110,8093	112,0982	109,8133	108,6280
Peso (g) 4	111,7709	109,5718	109,0745	112,1824	109,2325	110,8195	112,1047	109,8207	108,6351
Peso (g) 5	111,7764	109,5761	109,0792	112,1878	109,239	110,8245	112,1096	109,8254	108,6404
Peso (g) 6	111,7803	109,5810	109,0848	112,1917	109,2497	110,8302	112,1156	109,8315	108,6458
Peso (g) 7	111,7865	109,5879	109,0895	112,1975	109,25132	110,8374	112,1212	109,8370	108,6637
Peso (g) 8	111,793	109,5948	109,0954	112,2090	109,259	110,862	112,134	109,8478	108,6810
<b>g/h</b>	0,0063	0,0062	0,0061	0,0076	0,0083	0,009	0,0069	0,0071	0,0086
<b>WVTR</b> <b>(g.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>)</b>	8,913	8,771	8,630	10,752	11,742	12,732	9,762	10,044	12,167
<b>WVTR Promedio</b>		8,771			11,742			10,657	
<b>SD</b>		0,141			0,990			1,314	
<b>WVTR (24H)</b>		210,509			281,810			255,780	
<b>SD</b>		3,395			23,767			31,548	
<b>WVP</b> <b>(g.mm.h<sup>-1</sup>. Pa<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>*10<sup>5</sup>)</b>	4,121	4,056	3,628	4,78	4,936	4,645	4,104	4,646	5,626
<b>WVP Promedio</b>		3,935			4,79			4,792	
<b>SD</b>		0,268			0,146			0,771	

**Anexo E.-2 Gráficas obtenidas a partir de las variaciones de pesos de los sistemas para el cálculo de la transferencia del vapor de agua (WVTR) y permeabilidad al vapor de agua (WVP) con tres réplicas para todos los ABs realizados**





**Tabla 13. Pesos obtenidos para el cálculo de biodegradabilidad**

Tiempo	CQ			CQ+EECT (50 µg/mL)			CQ+EECT (100 µg/mL)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b>Día 0</b>	0,0172	0,0154	0,0161	0,0151	0,016	0,0147	0,0153	0,0143	0,0143
<b>Día 2</b>	0,2044	0,2000	0,2565	0,1654	0,2667	0,2909	0,1778	0,1643	0,1717
<b>Día 4</b>	0,1872	0,1842	0,2313	0,1793	0,238	0,2251	0,2343	0,1849	0,2382
<b>Día 7</b>	0,1846	0,1812	0,2144	0,1179	0,2174	0,2056	0,2195	0,1239	0,1874
<b>Día 9</b>	0,1638	0,2237	0,2617	0,158	0,2635	0,1426	0,2600	0,1336	0,2028
<b>Día 11</b>	0,2221	0,1933	0,1372	0,1771	0,1705	0,1585	0,2330	0,1210	0,1550
<b>Día 14</b>	0,1675	0,1952	0,2216	0,1679	0,1697	0,145	0,2212	0,2015	0,1721
<b>Día 16</b>	0,057	0,1006	0,1456	0,1188	0,1173	0,1163	0,2010	0,1740	0,1624



**Día 18**      0,067      0,101      0,1201      0,1112      0,1017      0,0997      0,198      0,182      0,1546

---

**Tabla 14.** Resultados de la biodegradabilidad por réplicas y promedio

CQ				
Tiempo	R1	R2	R3	Promedio
<b>0</b>	0	0	0	0,000
<b>2</b>	1088,372	1198,701	1493,168	1260,080
<b>4</b>	988,372	1096,104	1336,646	1140,374
<b>7</b>	973,256	1076,623	1231,677	1093,852
<b>9</b>	852,326	1352,597	1525,466	1243,463
<b>11</b>	1191,279	1155,195	752,174	1032,883
<b>14</b>	873,837	1167,532	1276,398	1105,922
<b>16</b>	231,395	553,247	804,348	529,663
<b>18</b>	289,535	555,844	645,963	497,114

CQ+EECT (50 µg/mL)				
Tiempo	R1	R2	R3	Promedio
<b>0</b>	0	0	0	0
<b>2</b>	995,364	1566,875	1878,912	1480,384
<b>4</b>	1087,417	1387,500	1431,293	1302,070

<b>7</b>	680,795	1258,750	1298,639	1079,395
<b>9</b>	946,358	1546,875	870,068	1121,100
<b>11</b>	1072,848	965,625	978,231	1005,568
<b>14</b>	1011,921	960,625	886,395	952,980
<b>16</b>	686,755	633,125	691,156	670,345
<b>18</b>	636,424	535,625	578,231	583,427
<b>CQ+EECT (100 µg/mL)</b>				
<b>Tiempo</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>Promedio</b>
<b>0</b>	0	0	0	0
<b>2</b>	1062,092	1048,951	1100,699	1070,581
<b>4</b>	1431,373	1193,007	1565,734	1396,705
<b>7</b>	1334,641	766,434	1210,490	1103,855
<b>9</b>	1599,346	834,266	1318,182	1250,598
<b>11</b>	1422,876	746,154	983,916	1050,982
<b>14</b>	1345,752	1309,091	1103,497	1252,780
<b>16</b>	1213,725	1116,783	1035,664	1122,058
<b>18</b>	1194,118	1172,727	981,119	1115,988

ANEXO F.- Análisis de varianza  
**POROSIDAD**

**Tabla ANOVA**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	244,458	2	122,229	10,04	0,0017
Intra grupos	182,617	15	12,1745		
Total (Corr.)	427,075	17			

**Pruebas de Múltiple Rangos**

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Porosidad AH	6	80,6365	X
POROSIDAD AH+E100	6	87,5955	X
POROSIDAD AH+E50	6	89,0953	X

**CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE AGUA**

**Tabla ANOVA**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	259728,	2	129864,	0,96	0,3936
Intra grupos	4,88556E6	36	135710,		
Total (Corr.)	5,14529E6	38			

**Pruebas de Múltiple Rangos**

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
CQ	13	913,98	X
CQ+EECT(50)	13	1053,73	X
CQ+EECT(100)	13	1107,63	X

## PERMEABILIDAD

**Tabla ANOVA**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	13,5606	2	6,78032	7,45	0,0236
Intra grupos	5,45717	6	0,909528		
Total (Corr.)	19,0178	8			

### Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
CQ	3	8,77121	X
CQ+EECT (100)	3	10,6575	XX
CQ+EECT (50)	3	11,7421	X

## PRUEBAS MECÁNICAS

### Fuerza a la tracción

**Tabla ANOVA**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,0140222	2	0,00701111	2,50	0,1619
Intra grupos	0,0168	6	0,0028		
Total (Corr.)	0,0308222	8			

### Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
CQ+EECT (100)	3	0,0366667	X
CQ+EECT (50)	3	0,0866667	X
CQ	3	0,133333	X

## ALARGAMIENTO A LA ROTURA

**Tabla ANOVA**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	20,4575	2	10,2287	0,63	0,5647
Intra grupos	97,4867	6	16,2478		
Total (Corr.)	117,944	8			

### Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
CQ+EECT (100)	3	4,49667	X
CQ	3	5,9	X
CQ+EECT (50)	3	8,15667	X

## DESPLAZAMIENTO

**Tabla ANOVA**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	3,39376	2	1,69688	0,80	0,4915
Intra grupos	12,7046	6	2,11743		
Total (Corr.)	16,0984	8			

### Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
CQ+EECT (100)	3	1,61667	X
CQ	3	2,18333	X
CQ+EECT (50)	3	3,10667	X

## ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

### Halos de inhibición Extracto

**Tabla ANOVA**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	393,752	3	131,251	699,67	0,0000
Intra grupos	1,50071	8	0,187589		
Total (Corr.)	395,252	11			

**Pruebas de Múltiple Rangos**

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
CQ+EECT (50)	3	10,72	X
CQ+EECT(100)	3	12,5533	X
Vancomicina	3	17,0	X
Gentamicina	3	25,5567	X

### Halos de inhibición

**Tabla ANOVA**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	733,558	4	183,389	166,13	0,0000
Intra grupos	11,0389	10	1,10389		
Total (Corr.)	744,596	14			

**Pruebas de Múltiple Rangos**

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
CQ	3	5,77667	X
CQ+EECT (100)	3	10,1133	X
CQ+EECT (50)	3	10,61	X
vancomicina	3	17,0	X
Gentamicina	3	25,89	X

## Vancomicina

**Tabla ANOVA**                      **Porcentaje de inhibición**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1485,2	2	742,601	13,42	0,0061
Intra grupos	332,046	6	55,341		
Total (Corr.)	1817,25	8			

### Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
CQ	3	33,8433	X
CQ+EECT(100)	3	59,53	X
CQ+EECT(50)	3	62,4267	X

## Gentamicina

**Tabla ANOVA**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	640,236	2	320,118	12,67	0,0070
Intra grupos	151,583	6	25,2639		
Total (Corr.)	791,82	8			

### Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
CQ	3	22,2433	X
CQ+EECT (100)	3	39,09	X
CQ+EECT(50)	3	41,0233	X

ANEXO G.- Permisos

**Autorización del ministerio del ambiente, agua y transición ecológica**



GUILLERMO LASSO  
PRESIDENTE

**PRONUNCIAMIENTO FAVORABLE No. MAATE-ARSFC-2022-2760**

Srta. **CARRERA FONSECA GEOVANNA NOEMI,**

Una vez que la propuesta para Autorización de Recolección de Especímenes de la Diversidad Biológica Sin Fines Comerciales para Investigación Científica, ha sido analizada, el Ministerio del Ambiente y Agua en uso de las atribuciones que le confiere el Acuerdo Interministerial SENESCYT-MAE N°001 aprueba el Proyecto **Fabricación de andamios biológicos a partir de polímeros naturales recubiertos con extracto de Clinopodium tomentosum**, al haber cumplido con los parámetros técnicos, administrativos y legales, establecidas en la ley.

Por lo dispuesto, se solicita realizar el pago correspondiente en:

BANECUADOR

RUC MAATE: 1768192860001

CUENTA CTE. No. 3001480604 / SUB-LÍNEA: 190499

TIPOS DE SERVICIOS: Servicios de Áreas Protegidas y Vida Silvestre

En base a lo dispuesto en el Texto Unificado de la Legislación Ambiental Secundaria.

Atentamente,

LAGLA CHIMBA BYRON ADRIAN

**DIRECCIÓN DE BIODIVERSIDAD**

Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica

Dirección: Calle Madrid 1159 y Andalucía

Código postal: 170525 / Quito-Ecuador

Teléfono: +593-2 398 7600

www.ambiente.gob.ec





**COMITÉ DE BIOÉTICA PARA INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS CBISH-  
FCS-UTA**

FCS

INFORME DE EVALUACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

<b>DATOS DE LA INVESTIGACION</b>	
<b>Nombre del Proyecto de Investigación:</b>	“Elaboración de andamios biológicos a partir de polímeros naturales recubiertos con extracto de <i>Clinopodium tomentosum</i> (Kunth)”
<b>Nombre de la Institución a la que pertenece</b>	Universidad Técnica de Ambato
<b>Nombre de Investigador Principal:</b>	<b>Docente Tutor:</b> Dr. Irvin Ricardo Tubón Usca <b>Estudiante:</b> Geovanna Noemí Carrera Fonseca
<b>Fecha y lugar de la decisión:</b>	Ambato, 12 de Junio del 2023
<b>Nombre del CEISH evaluador:</b>	CBISH - UTA
<b>Fecha de registro de solicitud de aprobación de estudios observacionales o de intervención</b>	24 de Mayo del 2023

<b>TIPO DE EVALUACIÓN</b>			
<b>Proyecto de Investigación Observacional</b>		<b>Enmienda al Proyecto de investigación</b>	
<b>Proyecto de desarrollo</b>	x	<b>Enmienda al Proyecto de desarrollo</b>	
<b>Proyecto de intervención</b>		<b>Enmienda a proyecto de intervención</b>	
<b>Consentimiento informado</b>		<b>Enmienda a Consentimiento informado</b>	
<b>Ampliaciones o modificaciones adicionales</b>		<b>Reportes internacionales de seguridad</b>	
<b>Informe de eventos adversos</b>		<b>Informe de seguimiento</b>	
<b>Informe de futilidad</b>		<b>Informe final</b>	
<b>Cambios administrativos</b>			

**COMITÉ DE BIOÉTICA PARA INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS CBISH-  
FCS-UTA**

FCS

<b>ASPECTOS ÉTICOS</b>			
<b>PARÁMETRO</b>	<b>EVALUACIÓN</b>		<b>CRITERIO</b>
	<b>Adecuado</b>	<b>No adecuado</b>	
<b>Justificación del estudio</b>	X		
<b>Tipo de intervención en el estudio</b>	X		
<b>Participación voluntaria en el estudio</b>	X		
<b>Derecho a retirarse del estudio</b>	X		
<b>Responsabilidades del participante</b>	X		
<b>Responsabilidades del investigador</b>	X		
<b>Riesgos para los sujetos de la investigación</b>	X		
<b>Beneficios potenciales para los sujetos de la investigación</b>	X		
<b>Inclusión de poblaciones vulnerables</b>		NA	
<b>Criterios de inclusión y exclusión de participantes</b>	X		
<b>Protección de confidencialidad</b>	X		
<b>Consentimiento informado</b>	X		
<b>Manejo de muestras</b>	X		
<b>Seguro por daños por incapacidad o muerte</b>		NA	

### ASPECTOS METODOLÓGICOS

(Criterio de metodología usada en

estudio) La justificación responde a los siguientes aspectos de:

- **Conveniencia:** La investigación es de gran relevancia, ya que se enfoca tanto el uso de la ingeniería de tejidos como el enfoque de la medicina ancestral de nuestro país, al incluir el extracto de *Clinopodium tomentosum*. Además, esta investigación sirve para satisfacer dentro del estudio de la medicina regenerativa, a la demanda de accidentes y lesiones que afectan gravemente la piel. Órgano que es el causante en gran medida de la morbilidad general y como los beneficios terapéuticos de la planta se ven involucrados en las propiedades de los andamios, mismos que promueven la cicatrización en pacientes.
- **Relevancia social:** Está involucrada en la historia cultural de la medicina ancestral además de la historia científica de los últimos 30 años de la ingeniería de tejidos y su enfoque en los sustitutos dérmicos. Los beneficiados de este proyecto en la comunidad científica como conocimiento y apertura a más estudios que dentro y fuera del país en la medicina regenerativa
- **Implicaciones prácticas:** Todo lo antes expuesto ayudará a resolver y promover la cicatrización de heridas en el tejido epitelial. Tejido que es generalmente afectado ya sea por infecciones, así como en accidentes. Un problema real y transcendental en la medicina regenerativa donde no sólo la piel sino la reconstrucción del tejido total o parcial es importante.
- **Valor teórico:** Mediante esta investigación se aportará al conocimiento ya expuesto con extractos y andamios, pero destacando el conocimiento y medicina ancestral. Además, de estudios realizados en una planta que no es tan conocida ni dentro ni fuera del país por la comunidad científica.

Así también, la información generada del presente estudio puede servir para desarrollar métodos que se ajusten con mayor especificidad a los requerimientos y propiedades apropiadas al tejido del paciente que se desee regenerar, propiedades físicas, mecánicas y biológicas y como cada una influye dentro de la estabilidad.

Con base a todo lo anterior descrito no se registra observaciones por parte de mi persona, debido a que la metodología se encuentra claramente redactada y respaldada en bibliografía que van en coherencia conforme a los objetivos que se plantean para el desarrollo del proyecto de investigación.

### ASPECTOS METODOLÓGICOS

• **Utilidad metodológica:** La investigación aporta la suficiente cantidad de datos para crear nuevas incógnitas y con ellas nuevas variables. Si bien la biodegradabilidad mencionada en el tiempo es una de ellas, el registro de los pacientes y cómo influye el nivel plaquetario, o enzimas inmersas en el cuerpo para la biodegradabilidad. Son variables que pueden ayudar a crear un nuevo instrumento para recolectar o incluso analizar datos. Así también, la relación existente entre cada una de las variables como la porosidad respecto permeabilidad/ viabilidad y estabilidad del andamio y por ende la relación con las propiedades físicas y mecánicas son realmente importante para cada tejido al que se pretenda implantar. Con esto se puede decir; que si contribuyen a la definición de un concepto, variable o relación entre ellas. Cabe destacar que, para obtener mejoría en los resultados se deben realizar más de tres réplicas con la finalidad de determinar cual de ellas influye más y a qué tejido corresponde la implantación.

Se plantea realizar un ANOVA con las variables antes expuestas una media entre las variables y determinar el método en relación a los andamios con y sin extracto. Por otro lado, en cuanto a las muestras y número de réplicas se sugiere hacerlo por sextuplicado exceptuando algunas pruebas que conllevan más tiempo de estudio. En el caso de la evaluación de biodegradabilidad en plasma se realiza hacerlo por triplicado, pero con un número mayor de días para conseguir ver una estabilidad con el pasar de los mismos. Se considera un plasma estable cada dos días, pero la durabilidad de la prueba es tres semanas por lo que se plantea hacerlo por triplicado. Las fórmulas planteadas son aptas dentro del estudio además de servir como soporte a la investigación y lo que se pretende realizar. **Esto sugiere un plan de análisis de la información óptimo dentro de la investigación.**

Los recursos y materiales expuesto para esta investigación son aptos y aceptados para el desarrollo del proyecto. Los procedimientos y la descripción de estos se fundamentan con tiempos a excepción de la prueba en plasma que sólo está contemplada para una semana, razón por la se extiende mínimo a tres semanas.

Con lo expuesto en el apartado anterior se fundamenta de manera bibliográfica diversos aspectos de la metodología que se quieren probar en el proyecto. De tal forma, que no se denota ninguna inconsistencia en todos los datos e información que se encuentra presentada en dicho apartado.

**COMITÉ DE BIOÉTICA PARA INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS CBISH-  
FCS-UTA**

FCS

<b>ASPECTOS LEGALES</b>	
Dentro del marco de lo legal se cuenta con un permiso obtenido por parte del investigador y responsable que hace posible el uso de la planta ancestral, permiso que se encuentra adjunto al documento (anexo), así como la resolución de aprobación del proyecto por parte de la entidad pública que lo respalda.	

<b>RESOLUCIÓN</b>	
<b>Aprobado</b>	Una vez revisado y analizado el documento enfocado al proyecto de “Elaboración de andamios biológicos a partir de polímeros naturales recubiertos con extracto de <i>Clinopodium tomentosum</i> (Kunth)” procedo a dar por aprobado el permiso para que se comience con la ejecución del mismo, ya que cuenta con todos los requerimientos que el comité de bioética exige, así como los consentimientos informados para la etapa de donación de sangre.
<b>Condicionado</b>	
<b>No aprobado</b>	

**Atentamente:**



FORMAS ELECTRONICAS DE:  
LORENA DE LOS  
ANGELES NUNKE  
VILLACIS

Dra. Lorena Núñez  
REVISORA RESPONSABLE



FORMAS ELECTRONICAS DE:  
AIDA FABIOLA  
AGUILAR SALAZAR

Dra. Aida Aguilar  
PRESIDENTE DEL CEISH – UTA



FORMAS ELECTRONICAS DE:  
CARMEN PATRICIA  
VITERI ROBAYO

SECRETARIA DEL CEISH – UTA