



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA**  
**EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**



**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

---

**Tema:** Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de *Aloysia citrodora* (Cedrón) y *Prunus serotina* (Capulí) en Andamios biológicos

---

Informe final del Trabajo de Titulación, Opción Proyectos de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación “Screening fitoquímico de especies forestales maderables de bosques montanos de la provincia de Chimborazo” aprobado mediante Resolución Nro. UTA-CONIN-2022-0095-R.

**Autor:** Jonathan André Gavilanes Suárez

**Tutor:** PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

**Ambato – Ecuador**

**Febrero - 2024**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

### **CERTIFICA**

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, opción proyecto de investigación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autoriza la presentación de este Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el reglamento de titulación y Grados de la Facultad de Ciencias en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 15 de Enero del 2024

PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

**C. I. 1804256905**

**TUTOR**

## **AUTORÍA**

Yo, Jonathan André Gavilanes Suárez, manifiesto que los resultados obtenidos en el Informe Final del Trabajo de Titulación, opción proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo son absolutamente auténticos y personales a excepción de las citas bibliográficas.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jonathan André Gavilanes Suárez', is written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

Jonathan André Gavilanes Suárez

**C.I. 1804521712**

**AUTOR**

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del 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 Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Jonathan André Gavilanes Suárez

C.I. 1804521712

**AUTOR**

## APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, opción 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.

Por constancia firman

.....

Presidente de Tribunal

.....

PhD. Helena Maritza de la Torre Olvera

1309651998

.....

PhD. Mario Daniel García Solís

1103605471

Ambato, 02 de febrero de 2024

## DEDICATORIA

*A todos los que creyeron en mí.*

*A todos los que me brindaron su apoyo*

*Al pequeño curioso que algún día fui*

*A mi familia*

*A mis amigos inquebrantables*

*A mis docentes por formar lo aquí plasmado*

*Lo logramos*

## AGRADECIMIENTO

*A los que me brindaron su apoyo a pesar de todo*

*A mis 3 madres, María, Tannia y Wilma, por nunca dejarme solo*

*A mis compañeras de vida*

*A Jorge y Luisda, por estar ahí para conversar*

*A Puchis, por apoyarme siempre*

*A mis tíos por siempre brindarme cariño y aliento*

*A Oscar, Daya, Ali, Alex, Samy, Erick, porque siempre supieron apoyarme en los momentos más difíciles de la Universidad. Sin ustedes esto no sería posible.*

*A la Jaramillo, a pesar de estar con quien no debe, pero por tantos años de amistad y ayuda durante este camino. Que la vida nos permita seguir siendo amigos por siempre.*

*A Carito por la aventura en la construcción de andamios*

*A May, Chris, Chucho, Karen, por las enseñanzas desde la experiencia de los andariegos.*

*A Mishu, por el eterno apoyo en este proceso (confiamos 🙌) y por el ácido gálico*

*A mis docentes en general, por estar dispuestos a siempre enseñarme y el apoyo brindado durante mi proceso de enseñanza*

Jonathan A. Gavilanes

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

<b>PORTADA</b> .....	i
<b>APROBACIÓN DEL TUTOR</b> .....	ii
<b>AUTORÍA</b> .....	iii
<b>DERECHOS DE AUTOR</b> .....	iv
<b>APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO</b> .....	v
<b>DEDICATORIA</b> .....	vi
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	vii
<b>ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS</b> .....	viii
<b>ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>ÍNDICE GENERAL DE TABLAS</b> .....	xii
<b>GLOSARIO</b> .....	xiv
<b>RESUMEN EJECUTIVO</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>CAPÍTULO I.-MARCO TEÓRICO</b> .....	1
1.1.    Antecedentes investigativos .....	1
1.2.    Objetivos .....	17
<b>CAPÍTULO II. METODOLOGÍA</b> .....	18
<b>2.1.</b> Materiales .....	18
2.1.2.    Reactivos .....	18
2.1.3.    Material fungible.....	19



2.2. Métodos .....	19
2.2.1. Obtención de extractos de <i>P. serotina</i> y <i>A. citrodora</i> para la determinación de su actividad antioxidante. ....	19
2.2.2. Construcción de andamios biológicos con extractos de <i>P. serotina</i> y <i>A.</i> <i>citrodora</i> para la comparación de su actividad antioxidante con extractos puros.....	22
2.2.3. Determinación de la influencia de la adición de extractos de <i>P. serotina</i> y <i>A. citrodora</i> en las características morfológicas y físicas de los andamios elaborados .....	24
<b>CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>26</b>
3.1. Análisis de resultados .....	26
3.1.1. Obtención de extractos de <i>A. citrodora</i> y <i>P. serotina</i> para la determinación de su actividad antioxidante.....	26
3.1.1.1. Caracterización y obtención de los extractos.....	26
3.1.1.2. Determinación del contenido de fenoles y flavonoides en los extractos de <i>P. serotina</i> y <i>A. citrodora</i> .....	27
3.1.1.3. Análisis de la capacidad antioxidante .....	29
3.1.2. Construcción de andamios biológicos con extractos de <i>P. serotina</i> y <i>A.</i> <i>citrodora</i> para la comparación de su actividad antioxidante con extractos puros. .....	35
3.1.2.1. Elaboración de ABs .....	35
3.1.2.2. Actividad antioxidante en andamios biológicos .....	36
3.1.2.3 Inhibición de radicales libres por andamios biológicos.....	38

3.1.3. Determinación de la influencia de la adición de extractos de <i>P. serotina</i> y <i>A. citrodora</i> en las características morfológicas y físicas de los andamios elaborados .....	40
3.1.3.1. Pruebas mecánicas realizadas en ABs .....	40
3.1.3.2. Tasa de transmisión de vapor de agua y Permeabilidad al vapor de agua en ABs.....	43
3.1.3.3. Evaluación morfológica de los ABs .....	45
<b>CAPITULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>49</b>
4.1. Conclusiones .....	49
4.2. Recomendaciones .....	50
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>68</b>

## ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Estructura del colágeno .....	8
<b>Figura 2.</b>	Estructura del quitosano .....	9
<b>Figura 3.</b>	Reacción del radical DPPH neutralizada .....	15
<b>Figura 4.</b>	Inhibición de radicales libres por parte de combinaciones de extractos .....	34
<b>Figura 5.</b>	Espectro infrarrojo de andamios biológicos y extracto incorporado ...	37
<b>Figura 6.</b>	Inhibición de radicales libres por parte de ABs .....	39
<b>Figura 7.</b>	Tasa de transmisión de vapor de agua en ABs.....	43
<b>Figura 8.</b>	Permeabilidad al vapor de agua para ABs .....	44
<b>Figura 9.</b>	Imágenes de la superficie de los ABs .....	46
<b>Figura 10.</b>	Evaluación morfológica de los ABs.....	47
<b>Figura 11.</b>	Proceso de extracción de compuestos bioactivos.....	69
<b>Figura 12.</b>	Curva de calibración de Trolox para cuantificar la capacidad antioxidante .....	70
<b>Figura 13.</b>	Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales presentes .....	70
<b>Figura 14.</b>	Curva de calibración de quercetina para la cuantificación de flavonoides totales presentes .....	71
<b>Figura 15.</b>	Elaboración de andamios biológicos.....	72
<b>Figura 16.</b>	Evaluación de las propiedades físicas y morfológicas de los ABs .....	73
<b>Figura 17.</b>	Resultado del análisis de la prueba estadística Kruskal-Wallis .....	82

## ÍNDICE GENERAL DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Descripción taxonómica del cedrón .....	10
<b>Tabla 2.</b>	Descripción taxonómica del capulí .....	12
<b>Tabla 3.</b>	Contenido de fenoles y flavonoides totales para extractos de <i>P. serotina</i> y <i>A. citrodora</i> .....	28
<b>Tabla 4.</b>	Actividad antioxidante de extractos puros .....	31
<b>Tabla 5.</b>	Concentraciones de las combinaciones realizadas .....	32
<b>Tabla 6.</b>	Concentraciones de biopolímeros para la elaboración de andamios....	35
<b>Tabla 7.</b>	Propiedades mecánicas de los ABs .....	42
<b>Tabla 8.</b>	Datos obtenidos de las pruebas mecánicas realizada por la máquina universal .....	74
<b>Tabla 9.</b>	Datos obtenidos del ensayo de permeabilidad al vapor de agua.....	74
<b>Tabla 10.</b>	Tabla ANOVA y prueba de rangos múltiples para la resistencia a la tracción .....	76
<b>Tabla 11.</b>	Tabla ANOVA y prueba de rangos múltiples para el alargamiento a la rotura .....	77
<b>Tabla 12.</b>	Tabla ANOVA y prueba de rangos múltiples para la distancia a la rotura .....	78
<b>Tabla 13.</b>	Tabla ANOVA y prueba de rangos múltiples para la tasa de transmisión de vapor de agua.....	79
<b>Tabla 14.</b>	Tabla ANOVA y comparación de rangos múltiples para la WVP.....	80
<b>Tabla 15.</b>	Tabla ANOVA y comparación de rangos múltiples para la actividad antioxidante de ABs .....	81
<b>Tabla 16.</b>	Prueba de comparaciones múltiples de Wilcoxon .....	82

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo A.</b>	Permiso de recolección de material vegetal sin fines de lucro.....	68
<b>Anexo B.</b>	Extracción de compuestos bioactivos .....	69
<b>Anexo C.</b>	Curvas de calibración.....	70
<b>Anexo D.</b>	Elaboración de andamios biológicos.....	72
<b>Anexo E.</b>	Evaluación de las propiedades físicas y morfológicas de los Abs .....	73
<b>Anexo F.</b>	Tablas de las propiedades físicas y morfológicas .....	74
<b>Anexo G.</b>	Pruebas estadísticas realizadas .....	76
<b>Anexo H.</b>	Resolución UTA CONIN.....	83

## GLOSARIO

**AB:** Andamio biológico

**ABs:** Andamios biológicos

**CI:** Cardiopatía isquémica

**IT:** Ingeniería de tejidos

**iPSC:** Células madre pluripotentes inducidas

**ROS:** Especies reactivas de Oxígeno

**SEM:** Microscopía electrónica de barrido

**FT-IR:** Espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier

**PBS:** Tampón fosfato sódico

## RESUMEN EJECUTIVO

La cardiopatía isquémica (CI) es una enfermedad causada por la obstrucción del flujo sanguíneo, debido a factores como el estrés oxidativo por especies reactivas de oxígeno (ROS). En ciertos casos se requiere trasplantes de tejido por lo que la ingeniería de tejidos (IT) plantea posibles alternativas para su tratamiento, como la aplicación de andamios biológicos (ABs) con antioxidantes. Este estudio se enfocó en la evaluación de la actividad antioxidante de extractos de *Aloysia citrodora* (cedrón) y *Prunus serotina* (capulí) en ABs.

Se obtuvieron extractos por maceración y se cuantificó el contenido de fenoles y flavonoides. Mediante la inhibición de DPPH se calculó su actividad antioxidante y se realizó una combinación de extractos. Se incorporó la mejor combinación de extractos en la elaboración de ABs. Para comprobar la actividad antioxidante en el AB se realizó FT-IR además de una prueba con DPPH. También se evaluaron las propiedades morfológicas y físicas mediante SEM, pruebas mecánicas y permeabilidad.

Los porcentajes de rendimiento en la obtención de extractos fueron de 11.34 para el cedrón y 12.32 para el capulí. La combinación de extractos en una relación 7:3 para capulí:cedrón presentó un incremento en el porcentaje de inhibición de radicales libres frente a los extractos puros. La adición del extracto en ABs incrementó el porcentaje de inhibición hasta 70.17. Su incorporación en ABs permiten reducir la presencia de ROS. Esto demuestra que el AB con extracto tiene potencial de ser aplicado en la IT para el desarrollo de tejido endotelial y combatir la CI.

**Palabras clave:** andamios biológicos, cardiopatía isquémica, antioxidantes, cedrón, capulí, ROS.

## ABSTRACT

Ischemic heart disease (IHD) is a disease caused by obstruction of blood flow, due to factors such as oxidative stress due to reactive oxygen species (ROS). In certain cases, tissue transplants are required, so tissue engineering (TE) proposes possible alternatives for their treatment, such as the application of biological scaffolds (BSs) with antioxidants. This study focused on the evaluation of the antioxidant activity of extracts of *Aloysia citrodora* (lemon verbena) and *Prunus serotina* (capulí) in BSs.

Extracts were obtained by maceration and the content of phenols and flavonoids was quantified. By inhibiting DPPH, its antioxidant activity was calculated and a combination of extracts was made. The best combination of extracts was incorporated in the preparation of BSs. To check the antioxidant activity in BS, FT-IR was performed in addition to a DPPH test. Morphological and physical properties were also evaluated by SEM, mechanical tests and permeability.

The yield percentages in obtaining extracts were 11.34 for lemon verbena and 12.32 for capulí. The combination of extracts in a 7:3 ratio for capulí:lemon verbena presented an increase in the percentage of inhibition of free radicals compared to pure extracts. The addition of the extract in ABs increased the inhibition percentage to 70.17. Its incorporation into BSs allows the presence of ROS to be reduced. This shows that BS with extract has the potential to be applied in TE for the development of endothelial tissue and combat IHD.

**Key words:** biological scaffolds, ischemic heart disease, antioxidants, lemon verbena, capulí, ROS.



## CAPÍTULO I.-MARCO TEÓRICO

### 1.1.Antecedentes investigativos

#### 1.1.1. Especies Reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), son moléculas altamente reactivas debido a electrones no apareados, lo que genera inestabilidad, al reaccionar con biomoléculas presentes en el medio en el que se encuentran. Existen tres principales ROS: el anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) Y el radical hidroxilo ( $OH$ ) siendo este el más inestable y, por lo tanto, el que presenta mayor toxicidad. Además de otros compuestos menores concentraciones como radicales lipídicos, el ácido hipocloroso o peroxinitrito (Kibel et al., 2020).

Bajo condiciones normales, las ROS actúan como moléculas de señalización, las cuales regulan condiciones de elongación y contracción de tejidos vasculares (Moris et al., 2017). Del mismo modo, representan un sistema de defensa primario frente a la posible proliferación de patógenos. Dichos radicales también actúan como reguladores intracelulares, principalmente en el metabolismo de proteínas o en las vías de reparación del ADN (Kaczmarek-Szczepańska et al., 2023). Sin embargo, la concentración de ROS en el microambiente puede incrementar debido a factores como el crecimiento y proliferación celular o condiciones de estrés. Esto genera un desbalance ocasionando daños en general debido al estrés oxidativo (Wahyuni et al., 2021).

De forma directa, se pueden ver afectados procesos metabólicos de interés, como la replicación del ADN al generar modificaciones en sus bases nitrogenadas, impedir actividad proteica por inhibición, desnaturalización o alteración conformacional y afectar de forma directa a la célula por la peroxidación lipídica de la pared celular (Echeverria Molina et al., 2021).

### **1.1.2. Efecto de ROS en enfermedades vasculares**

Las ROS se encuentran de forma natural en el cuerpo humano, pero se mantienen niveles controlados debido a su función principal de mantener el sistema de señalización redox encargados de regular factores como el crecimiento, migración celular, apoptosis, diferenciación o expresión genética. Existen diversos factores externos que dan paso a una sobreproducción de ROS como la obesidad, tabaquismo, sedentarismo o predisposición genética, dando paso al estrés oxidativo (Arjmand et al., 2021).

El estrés oxidativo se da cuando la capacidad antioxidante innata es superada por las altas concentraciones de ROS. A nivel cardiovascular, se interrumpen diversas vías de comunicación y transporte, como la cadena de transporte de electrones de las mitocondrias, la acción de las NADPH oxidasas o las sintasas de óxido nítrico, siendo fundamental en el metabolismo celular. Esto da paso a diversos problemas cardiovasculares como fibrosis miocárdica, insuficiencia cardíaca, infarto del miocardio, diabetes mellitus o cardiopatía isquémica (Baheiraei et al., 2014).

#### **1.1.2.1. Contribución de las ROS en la cardiopatía Isquémica**

La cardiomiopatía isquémica (CI) es una enfermedad cardiovascular en donde se restringe el paso de la sangre desde la arteria coronaria hacia el miocardio (Oppedisano et al., 2020). Esto se debe a procesos como la sobreproducción de colágeno por parte del endotelio, pero principalmente por una acumulación de lípidos y células inflamatorias como linfocitos (Strauch & Robbins, 2023).

Cabe mencionar que, en la cardiopatía isquémica, se ha demostrado que las ROS pueden ser producidos por todas las capas vasculares, en especial el endotelio, lo cual favorece la inflamación y acumulación de lípidos agravando la isquemia (Kibel et al., 2020). La principal vía que da lugar a la disfunción endotelial es la degradación de óxido nítrico por estrés oxidativo. Este compuesto posee actividad citoprotectora y vasodilatadora, siendo fundamental para combatir la isquemia. El primer paso de este

estrés presente es la expresión de características protrombóticas y proinflamatorias en las células del tejido endotelial al inhibir la incorporación de plaquetas y neutrófilos a zonas afectadas (Stapleton et al., 2020).

Del mismo modo, el factor nuclear kappa beta (NF kb) llega a ser decisivo ya que regula el proceso de crecimiento celular e inflamación. Este es susceptible a una sobre activación, ya que las ROS dañan el inhibidor que posee (ikb) lo cual genera una respuesta inflamatoria excesiva, agravando la isquemia (Hsiao et al., 2013). Además, debido a este tipo de complicaciones la insuficiencia cardíaca puede llegar a ser fatal, ya que se generan arritmias o hipercontracturas del corazón (Kim et al., 2022).

#### **1.1.2.2. Importancia de la IT en la Cardiopatía Isquémica**

La elevada tasa de mortalidad asociada a la CI es alarmante dentro de la comunidad médica y científica, los tratamientos convencionales están basados en el uso de medicamentos como la aspirina y nitroglicerina, llegando hasta intervenciones quirúrgicas, las cuales pueden ser bastante invasivas (Arjmand et al., 2021), el avance tecnológico ha permitido que existan terapias donde se prime el uso de células, sin embargo, sus resultados clínicos son bastante desfavorables por sí solos, la problemática está relacionada con la supervivencia celular, la probabilidad de injerto, así como la cantidad de células capaces de reparar el tejido, es decir, hay falencias destacables dentro del proceso de administración celular (Madonna et al., 2019)

Para dar solución a esta problemática la ingeniería de tejidos destaca sobre resto de tratamientos cuyo enfoque puede ser clasificado de dos maneras: el uso de sistemas sin andamio donde se busca principalmente el reemplazo del tejido fibroso del miocardio a través de una lámina de células (Hsiao et al., 2013) y el uso de una matriz o andamio que reemplace o reproduzca la función de la matriz celular biológica.

Esto último se fundamenta en la combinación de células y un biomaterial polimérico (natural o sintético) de tal manera que se produzca un ambiente adecuado para la proliferación celular antes de ser administrado en el área afectada disminuyendo

considerablemente los problemas de supervivencia celular (Madonna et al., 2019), suponiendo así una alternativa altamente viable dentro de la reparación del tejido enfermo sobre todo en el caso de la insuficiencia cardíaca postinfarto.

### **1.1.3. Ingeniería de tejidos aplicada a CI**

La ingeniería de tejidos (IT) es una rama de la bioingeniería y uno de sus enfoques es el desarrollo de nuevos biomateriales que funcionan como un soporte para el desarrollo celular, lo que permite generar nuevos tejidos, o a su vez regenerar tejidos dañados (NIBIB, 2021). Los soportes o andamios añadidos al cultivo celular permiten un desarrollo correcto al mantener las condiciones adecuadas acorde al tipo de tejido que se busca recrear (van der Valk et al., 2023). Debido a esto se pueden añadir factores de crecimiento e indicadores para generar reacciones en específico en las células, con el fin de obtener una respuesta en específico como la producción de metabolitos o la diferenciación en base a un tejido requerido (Snyder & Jana, 2023).

Dentro de la ingeniería de tejidos, es indispensable mantener las condiciones adecuadas para el correcto desarrollo celular. Una de las principales condiciones es la generación de ROS debido al metabolismo celular propio (Xiong et al., 2022). El estrés oxidativo da continuidad a la fase inflamatoria e impide una correcta proliferación celular. Este desbalance generado, impide que se presenten de forma natural las vías antioxidantes para combatir el estrés oxidativo, lo que da lugar a otras vías de señalización causando los daños celulares graves (Guan et al., 2020).

Debido a esto, la adición de compuestos con actividad antioxidante representa una ventaja en la ingeniería de tejidos (Chasara et al., 2023). La creación de parches o andamios biológicos con actividad antioxidante permite mantener en control posibles complicaciones a la hora de realizar cultivo de tejidos, como la contaminación por patógenos o la diferenciación de tejido hacia células específicas.

### **1.1.3.1. Componentes necesarios para la ingeniería de tejidos**

#### **1.1.3.1.1. Células**

La célula es la unidad principal para la ingeniería de tejidos, ya que a partir de esta surgen los tejidos y posteriormente los órganos y sistemas. Debido a esto, el origen de estas es un punto clave al no tener las mismas necesidades ni funciones fisiológicas en función del tejido que se busca desarrollar (Chandra et al., 2020). Así, se tienen células autólogas, alogénicas, provenientes de progenitores, células adultas unipotentes, células madre multipotentes o células madre pluripotentes inducidas (iPSC por sus siglas en inglés) .

Las células obtenidas se cultivan en estructuras añadidas externamente, de forma principal como soportes tridimensionales llamados andamios, en donde se imita una matriz extracelular y se busca su desarrollo mediante su acoplamiento (Irawan et al., 2018). Esto permite la formación de nuevos tejidos al lograr una diferenciación hacia células especializadas (Khodabandeh et al., 2022).

#### **1.1.3.1.2. Medios de cultivo y Factores de Crecimiento**

##### **Medios de cultivo**

El cultivo de tejidos ha ido avanzando conforme las necesidades se lo han pedido, es así como en un inicio se utilizaban fluidos corporales, hasta desarrollar los primeros medios de cultivo como el medio esencial mínimo de Eagle. Sin embargo, la modificación de este medio se realizó conforme la aplicación de nuevos linajes de células, incorporando o eliminando componentes necesarios hasta llegar al denominado “medio completo”, en donde se han incorporado todos los componentes necesarios para garantizar el desarrollo y proliferación celular, tales como vitaminas, fuente de carbono, nitrógeno, factores de crecimiento etc (Chandra et al., 2020).

## **Factores de crecimiento en IT**

Los factores de crecimiento (GF) son complejos proteicos que permiten un desarrollo celular adecuado, ya que intervienen en procesos como proliferación, diferenciación, muerte y migración celular (Tonelli et al., 2017). Estos pueden ser de origen paracrino, es decir, de células adyacentes, o autocrino, de la misma célula. Dentro de la IT, los GF pueden ser aplicados de forma directa, mediante liberación controlada o lograr la producción autocrina por las células presentes (Ren et al., 2020).

Los GF aplicados para el desarrollo tisular varía en función del tejido, como el EGF aplicado en tejido epitelial, VEGF utilizado para el crecimiento endotelial vascular, o multipropósito como los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento transformantes beta (TGF-  $\beta$ ) utilizados principalmente para desarrollo de órganos especializados o tejido óseo (Saravanan et al., 2016).

### **1.1.3.1.3. Andamios biológicos**

Una de las principales alternativas modernas es la aplicación de andamios biológicos (AB), elaborados a base de biopolímeros (Guan et al., 2020). Los AB se han convertido en una alternativa novedosa para el tratamiento de diversas patologías que afectan a diversos tejidos. Esto, ya que permite que tanto una recuperación del tejido afectado, la promoción de nuevo tejido en zonas isquémicas afectadas o la generación de tejido mediante técnicas de laboratorio (Kopecki, 2021).

Para dar lugar a la recuperación de los tejidos que han sido afectados, los AB brindan una superficie de soporte en la cual las células son capaces de proliferar (Mihai et al., 2019). Adicional a esto, la propia estructura permite que existan otros factores importantes como es la difusión de nutrientes y la migración celular (Saeedi et al., 2020). Con esta base, los AB deben imitar de la mejor forma posible la matriz extracelular, por lo que, de forma común son elaborados con polímeros naturales de los cuales dependerán las características finales que tenga el AB (Winkler et al., 2020).

#### **1.1.3.1.3.1.Biopolímeros**

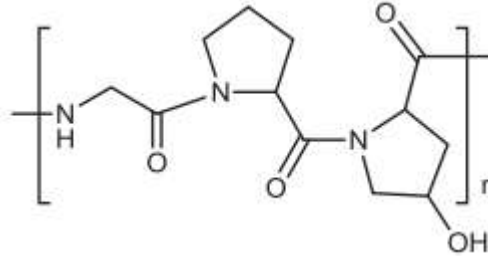
Conforme la Sociedad Europea de Biomateriales, un biomaterial es un compuesto capaz de interactuar de forma benéfica con sistemas biológicos, con el fin de evaluar, tratar o reemplazar tejidos u órganos. Si bien existen diversos biomateriales aplicados en la IT, se destacan dos grupos principales, siendo de origen natural o sintético. Estos, de forma común, poseen estructuras de carbono como nanomateriales o biocerámicas (Guan et al., 2020)

Para su aplicación, deben cumplir ciertas características fundamentales como la compatibilidad con el sistema biológico que se está utilizando, además de la biodegradación, resistencia mecánica y la formación de estructuras adecuadas para la proliferación celular (Garcia et al., 2021). Si bien tanto los compuestos naturales como sintéticos cumplen con las características, estas varían entre sí, siendo los biopolímeros sintéticos más asimilables y biodegradables en contra de los biopolímeros naturales, los cuales presentan características más rígidas y relacionadas con la estructura que forman (Echeverria Molina et al., 2021). Esto permite que una combinación de estos compuestos genere microestructuras más adecuadas para el acoplamiento celular y el desarrollo del tejido. Debido a esto, los biopolímeros más utilizados son el colágeno, a modo de matriz extracelular, y el quitosano permitiendo mejorar las características estructurales en el andamio biológico.

#### **1.1.3.1.3.2.Colágeno**

El colágeno es el principal componente de la matriz extracelular, y al ser la proteína más abundante en el organismo es el biopolímero más utilizado en ingeniería de tejidos (Irawan et al., 2018). El colágeno utilizado en IT son de los tipos I y II, ya que poseen características similares, como la biodegradabilidad, compatibilidad adecuada con células, y cierta capacidad antimicrobiana. Su principal función biológica es estructural, ya que brinda propiedades mecánicas adecuadas para la elaboración del AB; principalmente con respecto a las fuerzas y tensiones aplicadas por lo que el

entrecruzamiento formado da lugar a estructuras estables (Kaczmarek & Sionkowska, 2018).



**Figura 1** Estructura del colágeno

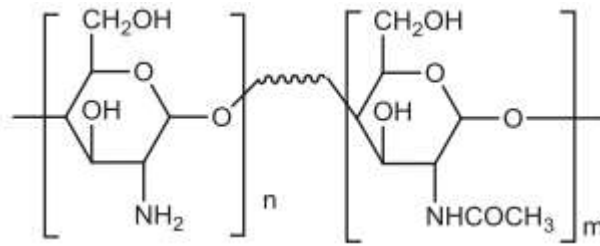
Se presenta la estructura química del colágeno. La molécula base se presenta como la unión de glicina, prolina e hidroxiprolina de izquierda a derecha. Ilustración adaptada (Zou et al., 2018)

#### 1.1.3.1.3.3. Quitosano

Otro biopolímero de gran interés es el quitosano, siendo utilizado en biomedicina e ingeniería de tejidos (Kou et al., 2021). Su biodegradabilidad se garantiza por la acción de la lisozima, degradando el biopolímero hasta polisacáridos de fácil absorción (Aaliya et al., 2021). Asimismo, tiene efectos cicatrizantes, antiinflamatorios y es altamente compatible con otros biomateriales como el colágeno (Islam et al., 2020). Al igual que el colágeno, este presenta una alta biocompatibilidad y biodegradabilidad, siendo óptimo para su combinación con otros polímeros.

Su estructura se basa en un amino polisacárido lineal, y al ser polimerizado tienen unidades acetiladas aleatoriamente (Abdullah et al., 2016). Cada una de las unidades posee 2 grupos hidroxilo y un grupo amino, siendo capaces de formar enlaces de hidrogeno con otras fibrillas de quitosano y con otros biopolímeros. Además, estos mismos grupos proveen actividad antioxidante, pero en menor medida debido al fuerte enlace formado por el grupo alcohol primario (Rodrigues et al., 2020).





**Figura 2** Estructura del quitosano

Se presenta la estructura química del quitosano. Monómero desacetilado y acetilado se encuentran representados como  $n$  y  $m$  respectivamente. Ilustración adaptada (Zou et al., 2018)

### 1.1.3.2. Importancia de antioxidantes en la IT aplicados a CI

Estudios realizados por Kaczmarek-Szczepańska et al. (2023), afirman que la adición de antioxidantes en Andamios Biológicos (AB) presentan un avance novedoso para el desarrollo de ingeniería de tejidos (Saravanan et al., 2016). Esto permitirá mejorar el proceso de regeneración tisular al permitir un control de las ROS y que los biopolímeros que componen al AB se degraden de una forma controlada, brindando así el soporte necesario para la proliferación celular (Rubio-Elizalde et al., 2019).

Además de esto, compuestos como los polifenoles han demostrado disminuir los tiempos de cicatrización, permitiendo la reticulación del colágeno e incrementando las propiedades mecánicas y térmicas que posee el andamio (Song et al., 2020). La adición de triterpenos, fenoles y polifenoles permite mantener un tamaño de poro correcto para que el proceso de proliferación celular sea el adecuado (Jin et al., 2013; Zheng et al., 2021).

La mejora de estas características permite que la incorporación de extractos de plantas medicinales en ABs se convierta en una alternativa frente a posibles tratamientos convencionales (Kapałczyńska et al., 2016). Tanto *P. serotina* como *A. citrodora* poseen actividad antioxidante, siendo un punto clave para su incorporación en los ABs (Jaradat et al., 2021a; Telichowska et al., 2020a)

#### 1.1.4. Plantas medicinales como fuente de antioxidantes naturales

##### 1.1.4.1. *Aloysia citrodora*

Otra especie de interés es el cedrón (*A. citrodora*), utilizada ampliamente por sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes desde la antigüedad. Su producción se da entre 800 y 2.800 m.s.n.m. En Ecuador, se ubica en toda la región Sierra, teniendo mayor producción en zonas con climas cálidos (Fernández, et al., 2019). Su descripción taxonómica viene descrita a continuación

**Tabla 1.** *Descripción taxonómica del cedrón*

<b>Dominio</b>	Eucaryota
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Filo</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Dicotyledoneae
<b>Orden</b>	Lamiales
<b>Familia</b>	Verbenaceae
<b>Género</b>	<i>Aloysia</i>
<b>Especie</b>	<i>citrodora</i>

*Nota: Adaptado de (Iglesias & Pichucho, 2021)*

Esta especie es considerada un arbusto perteneciente a la familia Verbenaceae, originaria de Centro y Sudamérica es utilizada de forma ornamental y medicinal. Sus tallos presentan estrías longitudinales y llegan a tener una altura máxima de 3 m (Jaradat et al., 2021b). Sus hojas presentan rugosidad ligera con dentado leve en los bordes. Las inflorescencias, en forma de panícula se encuentran en los extremos de los tallos y ramas principales, con tonalidades blanquecinas y azuladas (Bahramsoltani et al., 2018).

Esta planta posee principalmente triterpenos, catequinas, saponinas, felones, quinonas, benzoquinonas y flavonoides (Adeli et al., 2021). Estos compuestos brindan propiedades antioxidantes, siendo capaz de combatir el estrés oxidativo (Tammar et al., 2021). *A. citrodora* es usada de forma común ya que posee actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, *Proteus vulgaris* y *C. albicans* (Jaradat et al., 2021).

#### **1.1.4.2. *Prunus serotina***

El Capulí (*P. serotina*) es una especie originaria de América del Norte, adaptada y comercializada por Centroamérica y Sudamérica (Carrasco et al., 2022). En Ecuador, se ha adaptado a los valles interandinos con alturas que oscilan entre 1.200 y 3.500 m.s.n.m., en donde las provincias con mayor producción son Tungurahua, Cotopaxi, Pichincha e Imbabura. Su adaptación y distribución por la zona interandina se da debido al suelo arenoso de la zona (Fernández, et al., 2019).

El capulí es un árbol de la familia Rosaceae, utilizado de forma comercial por su madera de gran dureza. Puede tener una altura máxima de 10 metros en ejemplares completamente desarrollados. Su tronco es irregular y las hojas poseen un borde liso llegando hasta 12 cm de longitud (Telichowska, Kobus-Cisowska, et al., 2020). Su descripción taxonómica se presenta a continuación:

**Tabla 2.** *Descripción taxonómica del capulí*

<b>Dominio:</b>	Eucaryota
<b>Reino:</b>	Plantae
<b>Filo:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Orden:</b>	Rosales
<b>Familia:</b>	Rosaceae
<b>Género:</b>	<i>Prunus</i>
<b>Especie:</b>	<i>serotina</i>

*Nota: Adaptado de (Chisaguano, 2012)*

Esta especie posee compuestos bioactivos entre los que destacan las antocianinas, fenoles, tocoferoles, flavonoides y terpenos (Brozdowski, et al., 2021a). Uno de los más representativos es el uvaol, al ser este un terpeno que mejora el funcionamiento de fibroblastos y células endoteliales, acelerando el proceso de cicatrización de heridas (Telichowska, et al., 2020a).

Dispone también de ácido ursólico, un triterpeno con características antiinflamatorias, ya que inhibe la vía de la ciclooxigenasa, la 5-lipoxigenasa y la elastasa presentes en los leucocitos (Brozdowski, et al., 2021a). Del mismo modo, tienen propiedades antimicrobianas frente a *Staphylococcus aureus*, *Microsporum lenosum* y *Candida albicans* con una concentración inhibitoria mínima de 250 µg/mL. El ácido ursólico también es capaz de fortalecer el colágeno cutáneo, brindando así una mejora en las características del tejido afectado (Brozdowski, et al., 2021b).

### **1.1.5. Métodos de extracción de compuestos bioactivos de plantas**

Existen diversos métodos de extracción, los cuales varían en función de los componentes de interés que se buscan. Entre los principales factores se encuentran la temperatura de operación y tiempos de aplicación (Q.-W. Zhang et al., 2018).

Dentro de los métodos convencionales se encuentran la maceración, infusión o extracción por soxhlet, utilizando solventes y lapsos largos. Por otro lado, los métodos convencionales implican mayor eficiencia o selectividad, pero implican procesos complejos y mayores costos de operación (Valdez et al., 2022).

#### **1.1.5.1.Extracción Soxhlet**

Este método se basa en el contacto directo de la muestra con el solvente utilizado para la extracción. Presenta ventajas frente a otros métodos, como el contacto múltiple con el disolvente y un lapso prolongado de exposición (López-Bascón & Luque de Castro, 2020). Además, suele tener más afinidad con los solutos tanto por el movimiento como por la temperatura de funcionamiento. Si bien es uno de los métodos con mayor rendimiento, no es utilizado de forma frecuente en compuestos con actividad biológica debido a que se trabaja a temperaturas cercanas a la de la ebullición del solvente (Fagbemi et al., 2021).

#### **1.1.5.2.Maceración**

Este es un proceso de larga duración, en donde se busca extraer los compuestos afines al solvente utilizado. Estos solventes varían, siendo de matriz simple, en donde se utiliza solo un tipo de solvente, como de matriz compuesta al utilizar una mezcla de estos. En una extracción hidroalcohólica se obtienen compuestos tanto hidrofílicos como hidrófobos (Bitwell et al., 2023).

Sin embargo, es necesario realizar un procedimiento posterior para eliminar el solvente utilizado, ya que podría interferir en los análisis. Además, el contenido de humedad

llega a ser relativamente alto, por lo que los solutos extraídos podrían degradarse por diversos factores (Carrillo & Díaz, 2020). Uno de los procesos más eficientes es la rotoevaporación, en donde se disminuye la presión del sistema para así aportar menos energía en forma de calor, y evaporar los solventes. Tal es el caso del etanol, en donde de forma común se evapora a los 78°C llegando a afectar a los compuestos fenólicos; pero al llegar a 130 HPa la temperatura de evaporación disminuye hasta los 50°C, temperatura a la cual no se afectan dichos compuestos (Ganguly et al., 2020).

### **1.1.5.3. Infusión**

Esta técnica permite una extracción rápida de los compuestos de interés, y al igual que la maceración es posible utilizar diversos solventes para realizar la extracción. A pesar de ser de corta duración en comparación con la maceración, utiliza temperaturas más altas por lo que los compuestos extraídos son susceptibles a la degradación (Abubakar & Haque, 2020). Del mismo modo, los porcentajes de rendimiento son menores a comparación de los métodos antes citados, debido tanto a la degradación de los solutos como a la propia evaporación y arrastre de compuestos por la temperatura utilizada (Panzl et al., 2022).

### **1.1.5.4. Fluido supercrítico**

La extracción por fluido supercrítico es ampliamente utilizada, principalmente en la industria en procesos como el descafeinado. Al pasar un fluido supercrítico a través de una matriz, es capaz de arrastrar los analitos de interés en función del solvente utilizado (Osorio, 2020). Si bien es posible realizar un proceso dinámico, a nivel de laboratorio no es factible su uso ya que presenta complicaciones por el costo de operación y el propio solvente utilizado (Palaric et al., 2023).

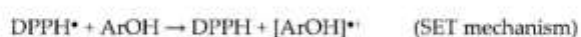
### **1.1.6. Evaluación de la actividad antioxidante en ABs.**

La capacidad antioxidante puede ser evaluada *in vitro*, usando distintos métodos de detección. Es común, el uso simultáneo de diferentes métodos de ensayo, con el fin de

obtener resultados objetivos (Munteanu & Apetrei, 2021). Entre los ensayos utilizados de forma común para ABs se encuentran el 1,1-difenil-1-2-picrilhidrazilo (DPPH) y el 2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (Chaves et al., 2020)

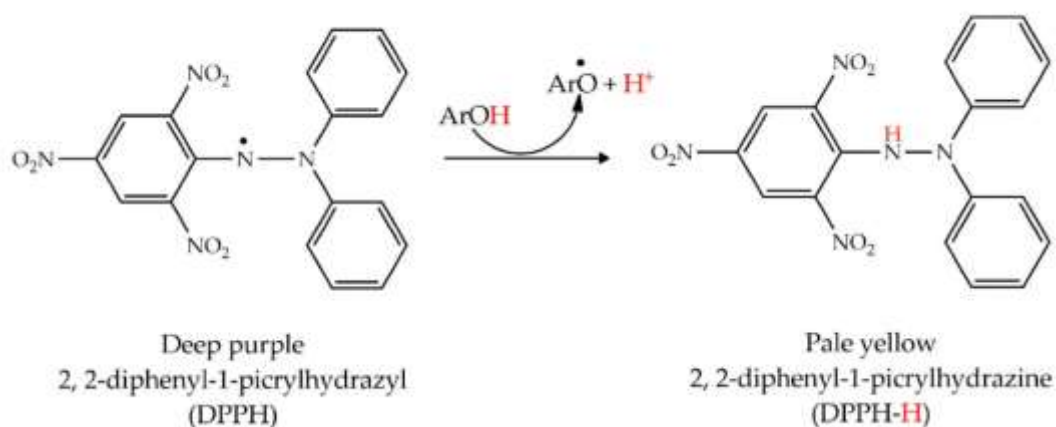
El ensayo por DPPH da lugar a la cuantificación de compuestos con actividad antioxidante debido a su neutralización. Esto se da por la aceptación de un protón cedido por compuestos bioactivos. Esta es una reacción colorimétrica, la cual inicia como violeta oscuro en su estado natural, y al neutralizarse torna en amarillo pálido, medible a 515 nm mediante un espectrofotómetro UV-vis (Baliyan et al., 2022)

Chemical reactions:



where ArOH: phenolic AO

Mechanism of reaction: HAT



**Figura 3** Reacción del radical DPPH neutralizada

La reacción de DPPH se ve representada por el cambio de color de violeta causado por el radical libre debido a la carga presente en el nitrógeno central hacia un amarillo pálido al incorporarse el átomo de hidrógeno. Adaptado de (Bibi Sadeer et al., 2020)

Debido al tiempo de incubación y radicales utilizados, estos ensayos presentan una mayor sensibilidad, y permiten conocer resultados más exactos. Si bien existen otros

métodos como La Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC por sus siglas en inglés) o el Poder Antioxidante Reductor del Hierro (FRAP), estos intervienen de forma directa con su estructura, por lo que son métodos menos fiables al tener una intervención previa (Unalan et al., 2021).



## 1.2.Objetivos

### 1.2.1. Objetivo General

- Evaluar la actividad antioxidante de extractos de *Aloysia citrodora* (cedrón) y *Prunus serotina* (capulí) en andamios biológicos

### 1.2.2. Objetivos Específicos

- Obtener extractos de *A. citrodora* y *P. serotina* para la determinación de su actividad antioxidante.
- Construir andamios biológicos con extractos de *P. serotina* y *A. citrodora* para la comparación de su actividad antioxidante con extractos puros.
- Determinar la influencia de la adición de extractos de *P. serotina* y *A. citrodora* en las características morfológicas y físicas de los andamios elaborados.

## **CAPÍTULO II. METODOLOGÍA**

### **2.1. Materiales**

#### **2.1.1. Equipos de laboratorio**

- Deshidratador por convección
- Plancha de agitación
- Espectrofotómetro UV-VIS
- Rotoevaporador
- Vortex
- Balanza Analítica
- Refrigerador
- Liofilizador
- Ultracongelador

#### **2.1.2. Reactivos**

- Etanol 70%
- Ácido Gálico
- Solución de carbonato de sodio 7% (p/v)
- Solución de cloruro de aluminio 2% (p/v)
- Solución de quercetina
- Solución madre DPPH
- Metanol
- Solución madre Trolox
- Ácido Acético
- Colageno
- Quitosano
- Agarosa
- PBS

### **2.1.3. Material fungible**

- Probeta (10 mL, 50 mL, 100 mL)
- Vasos de precipitación ( 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL)
- Frascos ámbar (1000 mL)
- Tubos de ensayo (5 mL)
- Balón de aforo (100 mL)
- Micropipetas (10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)
- Placas de 96 posillos
- Tubos eppendorf (15 mL)
- Microtubos (1,5 mL)
- Embudo Buchner
- Matraz Kitasato
- Gradilla para tubos 15mL
- Gradilla para microtubos

## **2.2. Métodos**

### **2.2.1. Obtención de extractos de *P. serotina* y *A. citrodora* para la determinación de su actividad antioxidante.**

#### **2.2.1.1. Recolección del material vegetal**

Una vez obtenido el permiso del Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (Anexo 1), se recolectaron hojas de *A. citrodora* (Cedrón) y *P. serotina* (Capulí) de las coordenadas 1°17'34.0"S 78°38'34.8"W perteneciente a la parroquia de Huachi Grande del cantón Ambato de la provincia de Tungurahua. Las muestras fueron hojas completas. El material vegetal se colocó en bolsas ziploc, mismas que fueron trasladadas y almacenadas 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, siguiendo las directrices dadas por Royal Botanic Gardens Sydney (2005).

### **2.2.1.2. Preparación del material vegetal**

Las hojas en buen estado se desinfectaron con una mezcla de hipoclorito de sodio al 5% en agua destilada durante 5 minutos y se enjuagaron con abundante agua. Posteriormente, se secaron en una estufa a 50° C durante 4 días hasta que se encuentren totalmente secas. Se trituraron las hojas hasta obtener un pulverizado y se almacenaron en bolsas ziploc.

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

Para la extracción de las hojas de *A. citrodora* y *P. serotina*, se implementó el método descrito por (Das et al., 2020) con ciertas modificaciones: se pesaron 100 g de la muestra triturada y se mezclaron con 500 mL de etanol al 70% durante 48 h con períodos cortos de agitación. Luego se realizó una nueva maceración por 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, el extracto se filtró a través del papel filtro y, por último, con un rotoevaporador se evaporó al vacío a 40°C hasta lograr la evaporación completa del etanol. El extracto obtenido se almacenó a 4°C hasta su posterior análisis.

### **2.2.1.4. Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos puros**

Para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos en el punto 6.1.3., se realizó 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  $\mu$ M, para ello se pesó 5,9 mg de DPPH, los cuales se disolvieron en 100 mL de una solución metanol-agua (80:20). La solución obtenida se agitó durante 30 - 40 min para garantizar la disolución completa del DPPH. Así también, se utilizó como estándar una solución madre de Trolox a 500  $\mu$ M para generar una curva de calibración, para ello se disolvió 0,0125 g de Trolox en 100 mL de una solución metanol-agua (80:20) y se agitó. A partir de la

solución madre del Trolox se prepararon diluciones hasta llegar a concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{M}$ . 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  $\mu\text{L}$  de solución metanol-agua 80:20 (diluyente del DPPH) + 20  $\mu\text{L}$  agua destilada

**Control:** 180  $\mu\text{L}$  de la solución DPPH + 20  $\mu\text{L}$  agua destilada

**Extracto:** 180  $\mu\text{L}$  de la solución DPPH + 20  $\mu\text{L}$  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 ecuación (1):

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

En donde:

$A_m$ : Absorbancia de la muestra

$A_b$ : Absorbancia del blanco

$A_c$ : Absorbancia del control

#### **2.2.1.5. Combinación de extractos para determinar la mayor capacidad antioxidante**

Una vez determinada la capacidad antioxidante de los extractos puros, se realizaron combinaciones de estos con el fin de determinar si estas generan una mayor actividad

antioxidante frente a los extractos puros obtenidos en el punto 2.2.1.4. Para ello se establecieron combinaciones, siguiendo la metodología propuesta por (Gao et al., 2022) con ciertas modificaciones.

En primer lugar, se estableció una concentración máxima de los dos extractos. Partiendo del extracto de cedrón, se disminuyó su concentración, y a su vez se incrementó la concentración del extracto de capulí, obteniendo 9 combinaciones y dos controles al medir los extractos puros. La mejor combinación se determinó mediante un análisis de Kruskal - Wallis, determinando la combinación con el mayor porcentaje de inhibición de radicales libres utilizando un programa estadístico especializado.

En base a los resultados obtenidos, se seleccionó la combinación con mayor porcentaje de inhibición para la elaboración de andamios y la evaluación de sus propiedades físicas y mecánicas.

## **2.2.2. Construcción de andamios biológicos con extractos de *P. serotina* y *A. citrodora* para la comparación de su actividad antioxidante con extractos puros**

### **2.2.2.1. Obtención de quitosano y colágeno**

El colágeno que se utilizó para la elaboración de los andamios será de tipo 1 y 2 mismo que 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 se obtuvo de manera comercial, la marca utilizada fue Chemsavers con un grado de des acetilación de 90% y bajo peso molecular.

Para la elaboración de los andamios biológicos se siguió la metodología descrita por (Martínez et al., 2015) y (Offeddu et al., 2016) con algunas modificaciones:

### **2.2.2.2. Preparación de andamios biológicos**

#### **2.2.2.2.1. Preparación de andamio control**

Se inició preparando una solución de colágeno y quitosano al 1%, en ácido acético 0.05M. Adicionalmente, se utilizó agarosa al 0.5% disuelta en PBS como agente reticulizante. La solución fue agitada a 80°C hasta la completa disolución de los biopolímeros. Una vez preparada la solución, esta se colocó en placas Petri de 10 cm. para su enfriamiento hasta temperatura ambiente. Posteriormente, se mantuvieron en ultracongelación a -75°C durante 24 horas. Finalmente se liofilizaron a -50°C durante 24 horas para su almacenamiento posterior en un desecador.

#### **2.2.2.2.2. Preparación de andamios con extractos**

La preparación de andamios se realizó de la manera ya descrita en el punto 2.2.2.1., adicionando el extracto cuando termine la disolución de los biopolímeros. La concentración de extracto añadida fue determinada en el punto 2.2.1.5.

#### **2.2.2.2.3. Determinación de actividad antioxidante por espectroscopía infrarroja por la transformada de Fourier (FT-IR)**

Para determinar la presencia de compuestos con actividad antioxidante de los andamios formados, se utilizó el espectroscopio infrarrojo (FR-IT) ubicado en el laboratorio de Canje de Deuda de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. Para esto, se siguió la metodología descrita por(Gieroba et al., 2021).

Con los andamios formados, se obtuvieron secciones circulares de 1cm de diámetro, los cuales fueron pulverizados para el ingreso de la muestra. Se utilizó el programa Spectra Analysis a un rango de 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ . para determinar los grupos funcionales de compuestos que poseen actividad antioxidante presentes en el andamio biológico (Krysa et al., 2022; Unalan et al., 2021).

#### **2.2.2.2.4. Determinación de la actividad antioxidante en ABs por inhibición de radicales libres.**

Para la determinación de la actividad antioxidante en los andamios formados, se siguió la metodología planteada por (Unalan et al., 2021) con ciertas modificaciones. En primer lugar, se realizó una incubación del andamio con la solución de metanol:agua durante 1 hora. Posteriormente, el andamio se sumergió en una solución con DPPH y se incubó durante 40 minutos sin luz a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación, se retiró el sobrenadante y se colocó en placa de 96 posillos para medir en el espectrofotómetro a 515 nm. Se determinó el porcentaje de inhibición de DPPH mediante la ecuación (1) descrita en el punto 2.2.1.4.

#### **2.2.3. Determinación de la influencia de la adición de extractos de *P. serotina* y *A. citrodora* en las características morfológicas y físicas de los andamios elaborados**

##### **2.2.3.1. Evaluación morfológica**

Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se obtuvieron imágenes a distintas ampliaciones de la superficie de los andamios para analizar su porosidad a mayor detalle. Esto se realizó con un tratamiento primario al esparcir un pulverizado con oro para disipar las cargas estáticas. Posteriormente se fijó en un soporte de aluminio para introducirlo al microscopio electrónico de barrido (Z. Zhang et al., 2022)

##### **2.2.3.2. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)**

La prueba de permeabilidad al vapor de agua se realizó para analizar la capacidad del material para el transporte de metabolitos y sustancias dentro del andamio (Alves et al., 2022). Las muestras se colocaron en la parte superior de un desecador, encima de un depósito de agua destilada estéril existente en la parte inferior. Durante 8 h, todas las piezas fueron expuestas a vapor de agua saturado en condiciones ambientales. Las muestras se colocaron en la parte superior de un matraz que contenía gel de sílice seco



en su interior. Los andamios bloquearon la entrada de vapor de agua al interior del matraz y se pesaron cada hora durante 8 h (Sobral et al., 2001).

$$WVP = \frac{WVTR * e}{P_0(RH_1 - RH_2)} \quad (2)$$

Para determinar la permeabilidad del vapor de agua mediante la formula (2) se utilizó una ecuación en la que constan: tasa de transmisión de vapor de agua (*WVTR*), el espesor medio de la cubierta (*e*), la presión de saturación a 25°C (*P<sub>o</sub>*) y la diferencia entre la humedad relativa del gel de sílice y la solución de NaCl (*RH<sub>1</sub> - RH<sub>2</sub>*). El espesor (*e*) se midió utilizando un calibre convencional de 0,01 mm y promediado los valores obtenidos en 8 ubicaciones diferentes de cada andamio biológico.

### 2.2.3.3. Evaluación mecánica

Las propiedades mecánicas de los andamios fueron evaluadas con el fin de determinar los cambios de las propiedades mecánicas del andamio con la adición de los extractos (Kalva et al., 2023). Para esto se evaluaron la resistencia a la tracción (TS), alargamiento a la rotura (EB) como también el módulo elástico (EM), se tomaron las medidas de acuerdo con las condiciones ASTM D 882–88 (Instron Universal Testing).

Se recortaron segmentos de andamios convencionales y andamios con extracto de *A. citrodora* (Cedrón) y *P. serotina* (Capulí) con medidas 2 cm x 9 cm. Los andamios tuvieron un acondicionamiento previo con 50 % de humedad relativa (HR) a temperatura ambiente durante 48h. La velocidad de la cruceta se fijó en 12,5 mm/min y se promediaron juntas al menos 5 réplicas de cada muestra (Ramanathan et al., 2017).

## CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Análisis de resultados

#### 3.1.1. Obtención de extractos de *A. citrodora* y *P. serotina* para la determinación de su actividad antioxidante

##### 3.1.1.1. Caracterización y obtención de los extractos

Existen diferentes factores que influyen en el porcentaje de rendimiento de obtención del extracto, como la técnica utilizada, el solvente aplicado y las condiciones de extracción. Dentro de estas técnicas es necesario tener en cuenta la duración del proceso y la naturaleza de los compuestos frente a una fuente de calor (Abubakar & Haque, 2020). El solvente utilizado depende de la especie vegetal que se utiliza, la matriz vegetal y la naturaleza de los metabolitos (Q.-W. Zhang et al., 2018). En esta investigación el extracto se obtuvo empleando la técnica de maceración hidroalcohólica al 70%, esto debido a la presencia de compuestos termolábiles como alcaloides y flavonoides en las muestras los cuales presentan propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Al utilizar esta técnica, se logra mantener la actividad biológica de estos compuestos, al evitar la degradación por altas temperaturas (K. Chen et al., 2023).

Se obtuvieron extractos de cedrón y capulí. El rendimiento de la extracción de las hojas de Cedrón fue de 11,34 % que en comparación con estudios realizados por Gkalpinos y sus colaboradores en 2023 fueron similares, ya que se obtuvo rendimientos de 11,66 % (Gkalpinos et al., 2023). En la investigación mencionada, al igual que en este proyecto de investigación, se empleó etanol como solvente debido a la compatibilidad con los metabolitos, la temperatura de recuperación del solvente y los niveles bajos de toxicidad que presenta (Abubakar & Haque, 2020) El tiempo de maceración empleado fue de 8 días, aplicando un cambio de solvente a la mitad del proceso. Esto permite extraer en mayor nivel los metabolitos de interés como fenoles y flavonoides de la

matriz vegetal, al no desechar el soluto en la primera corrida. Esto, en conjunto con una agitación moderada, permite obtener extractos con mayor actividad biológica.

Para la eliminación del solvente se utilizó un rotoevaporador, el cual disminuye la presión del sistema por lo que es necesario menor temperatura para la evaporación del solvente. En este caso, al llegar a una presión de 80hPa apenas se emplean 40°C para la evaporación del solvente utilizado, sin llegar a afectar a los componentes del extracto o su arrastre hacia el solvente recuperado por una evaporación acelerada al incrementar la temperatura (Osorio, 2020).

Por otra parte, el rendimiento obtenido en el extracto de capulí fue de 12.42%, siendo similar a los valores obtenidos por Karabegovic y sus colaboradores en 2014 (Karabegović et al., 2014). Para el caso de especies pertenecientes al género *Prunus* existe un incremento del rendimiento llegando hasta un 21.3% obtenido por la técnica de infusión. Al utilizar otros métodos de extracción como Soxhlet se puede llegar a incrementar el rendimiento hasta un 40% aproximadamente, sin embargo, al utilizar temperaturas mayores a los 65°C como es el caso de las técnicas mencionadas, compuestos volátiles o termosensibles como fenoles y flavonoides se degradan, por lo cual su actividad biológica disminuye considerablemente (Panzl et al., 2022).

### **3.1.1.2. Determinación del contenido de fenoles y flavonoides en los extractos de *P. serotina* y *A. citrodora***

Los metabolitos secundarios con actividad biológica son de gran interés, principalmente por los beneficios que aportan a la salud humana. Dentro de estos compuestos destacan los grupos de fenoles y flavonoides, principalmente por su uso en enfermedades relacionadas a la salud cardiovascular, salud nutricional y enfermedades neurodegenerativas (Suárez Cunza et al., 2021). Estos metabolitos son compuestos aromáticos producidos de forma natural por especies vegetales, los cuales presentan características bioactivas como actividad antioxidante, cicatrizante, antiinflamatoria, etc. El contenido tanto de fenoles y flavonoides obtenidos en los extractos se presentan en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Contenido de fenoles y flavonoides totales para extractos de *P. serotina* y *A. citrodora*

<b>Especie</b>	<b>Fenoles totales mgEAG/g PS</b>	<b>Flavonoides totales mgEQ/g PS</b>
<i>A. Citrodora</i>	48.425±3.912	24.181±3.142
<i>P. serotina</i>	93.145±4.918	30.725±1.973

Elaboración propia

El contenido de fenoles se cuantificó mediante el método de Folin-Ciocalteu para cada uno de los extractos vegetales utilizados, expresado en mg Equivalentes de Ácido Gálico por gramo de peso seco (mgEAG/g PS). Para *P. serotina* (Capulí) se obtuvo un total de 93.145±4.918 mg EAG/g PS, llegando a valores mayores a los reportados por Telichowska y colaboradores en 2020 con 37.39 mg EAG/g PS (Telichowska, Kobus-Cisowska, et al., 2020). En el estudio mencionado, la recuperación del solvente se realizó por precipitación de sólidos, con lo que el solvente puede arrastrar parte de los fenoles que estén presentes aun en la fase líquida disminuyendo así su concentración final en el extracto.

Por otra parte, para *A. citrodora* (Cedrón) se obtuvo una concentración de fenoles de 48.425±3.912 mg EAG/g PS. Rojas y sus colaboradores reportaron en 2022, reportó una concentración de 102.13 mg EAG/g PS para la misma especie, en donde se observa un incremento frente al valor obtenido (Rojas et al., 2022). De igual forma, Rashid, y sus colaboradores reportaron un contenido de 117.13 mg EAG/g PS para maceración con etanol puro, pero apenas 66.6 mg EAG/g PS para una maceración con agua (Rashid et al., 2022). La disminución drástica de la concentración de fenoles totales puede estar asociado al método de obtención, ya que, si bien se realizaron

maceraciones, en los estudios mencionados utilizan HPLC y LC-MS respectivamente para la purificación del extracto, a diferencia de la recuperación por evaporación utilizada en este estudio.

Para el contenido de flavonoides, se utilizó el método del cloruro de aluminio, expresado en mg Equivalentes de Quercetina por gramo de peso seco (mgEQ/g PS). Para *P. serotina* se obtuvo un total de  $30.725 \pm 1.973$  mgEQ/g PS. Estos valores son similares a los obtenidos por El-Hawary, y sus colaboradores en 2020 para diversas especies pertenecientes al género *Prunus sp.*, en donde las concentraciones varían entre 28.653 y 39.770 mgEQ/g PS al utilizar como solvente una solución etanol:agua en una relación 80:20 (El-Hawary et al., 2020). El incremento o disminución de la concentración de flavonoides puede variar conforme la especie, pero, además, está relacionada con la solubilidad y asimilación de ciertos flavonoides con el etanol utilizado para la maceración.

Finalmente, los flavonoides totales de *A. citrodora* llegan hasta  $24.181 \pm 3.142$  mgEQ/g PS. Este valor es superior al reportado por Cheurfa & Allem en 2016 en su estudio de la misma especie, ya que llegan a un máximo de 6.810 mgEQ/g PS (Cheurfa & Allem, 2016). La obtención del extracto se da mediante maceración hidroalcohólica, pero la relación agua:etanol es de 50:50, por lo que compuestos más afines al etanol pueden no recuperarse de forma adecuada. De igual forma, al implementar un mayor tiempo de maceración, es posible obtener mayor cantidad de flavonoides.

### **3.1.1.3. Análisis de la capacidad antioxidante**

Especies vegetales producen compuestos con capacidad antioxidante de forma natural siendo fenoles y flavonoides los principales responsables de esta característica. Esto se da por su estructura química, ya que, al estar formados por anillos bencénicos, grupos hidroxilo se mantienen en sus extremos siendo capaces de neutralizar radicales libres (Y. M. Chen et al., 2014) La producción de moléculas con capacidad antioxidante se da debido a las condiciones adversas que posee su entorno, como radiación ultravioleta excesiva, lesiones e infecciones por microorganismos. En esos

casos se producen ROS que afectan a la fisiología vegetal debido al estrés oxidativo, por lo que fenoles y flavonoides combaten este tipo de afecciones (Lee et al., 2021).

En el caso de la ingeniería de tejidos, la presencia o ausencia de ROS influye en la diferenciación de células en función del tejido que se busca obtener. Una producción excesiva de ROS da lugar a la formación de tejido adiposo, ideal para zonas más externas como en la piel. Además, es probable que se generen complicaciones a concentraciones excesivas, por la posible presencia de contaminantes biológicos (Orapiriyakul et al., 2020). Del mismo modo, una concentración alta de estas moléculas impide una proliferación adecuada de células, debido a la peroxidación lipídica que daña las paredes celulares, además del estrés oxidativo capaz de afectar a biomoléculas de interés encargadas del metabolismo celular (Dubois-Deruy et al., 2020).

La actividad antioxidante presente en los extractos vegetales se determinó utilizando el método de radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). Este método colorimétrico se basa en la neutralización de radicales DPPH que en su forma activa presentan una coloración violeta intensa, y al neutralizarse, la solución se torna hacia una tonalidad amarilla pálida (Bibi Sadeer et al., 2020). En la **Tabla 4** se presenta la actividad antioxidante expresada como porcentaje de inhibición del radical libre DPPH por parte de los extractos de *P. serotina* y *A. citrodora* calculados mediante la ecuación 1.

Los compuestos con actividad antioxidante presentan una naturaleza y estructura química variada, por lo que se expresan de forma común en Equivalentes de Trolox. El trolox, es un compuesto químico derivado de la vitamina E, utilizado como compuesto estándar debido a su actividad antioxidante reconocida y sensible frente al DPPH (Bibi Sadeer et al., 2020). Por otra parte, el ácido gálico uno de los compuestos fenólicos con mayor actividad antioxidante encontrado en plantas (Kumar et al., 2020). Los tres grupos hidroxilo presentes en su estructura permiten una inhibición adecuada de radicales libres, además de estar presente tanto en el cedrón como en el capulí. Esto

permite su incorporación como control positivo en el estudio para la verificación de los radiales libres neutralizados.

**Tabla 4.** *Actividad antioxidante de extractos puros*

<b>Extracto</b>	<b>% Inhibición del radical DPPH</b>	<b>μmol Eq Trolox / L</b>
<i>P. serotina</i>	80.28±1.42	411.92±5.15
<i>A. citrodora</i>	71.82±1.97	384.07±4.46
Ácido gálico*	95.95±0.78	463.83±2.06

\* Ácido gálico utilizado como control positivo para evidenciar la reducción del radical libre DPPH. Elaboración propia

La actividad inhibitoria de radicales libres presente en los extractos puros, fue de 80.28±1.42 % para *P. serotina*, correspondiente a 411.92±5.15 μmol Eq de Trolox /L. Este es un valor inferior en comparación con los 568.45±22.47 μmol Eq de Trolox /L reportado por Gallardo y sus colaboradores en 2021 al evaluar la actividad antioxidante de la cascara del fruto del capulí mediante el radical DPPH. En el estudio mencionado existe una mayor concentración de antocianinas, lo que incrementa la concentración de compuestos equivalentes de Trolox para actividad antioxidante (Gallardo-Rivera et al., 2021).

*A. citrodora* presentó una inhibición de radicales libres de 71.82±1.97% equivalentes a 384.07±4.46 μmol Eq de Trolox /L. Este valor es superior a los 290.23±11.05 μmol Eq de Trolox /L reportados por Gkalpinos, y sus colaboradores en 2023. Esta diferencia puede estar relacionada con el solvente utilizado por este autor ya que utilizó metanol puro para la obtención del extracto, y al no tener otro solvente como agua se llegan a perder ciertos compuestos más afines a este solvente. Además de aplicar un proceso acelerado por baño ultrasónico durante una hora para la obtención de

metabolitos, en donde debido al corto tiempo de contacto soluto/solvente se llegan a perder compuestos de interés como fenoles y flavonoides (Gkalpinos et al., 2023). Se utilizó ácido gálico como control positivo para verificar la validez del radical DPPH utilizado llegando hasta un  $95.95\pm 0.78\%$ .

Una vez cuantificada la actividad antioxidante de los extractos puros, se realizaron combinaciones entre sí para evaluar la mejora de esta característica, denotada en la **Figura 4**. La combinación de extractos presenta ventajas para la actividad antioxidante que poseen en conjunto, debido a la *sinergia antioxidante*. Esto consiste en que compuestos presentes en uno de los extractos utilizados pueden regenerar los grupos hidroxilo que ya han cedido sus protones hacia las ROS. Este tipo de efecto varía en función de las concentraciones utilizadas, así como de la naturaleza de los extractos, por lo que, no siempre se hará presente en combinaciones (Munguía et al., 2022).

Con el fin de abarcar diversas concentraciones, las combinaciones se realizaron mediante una prueba de balotaje, en donde varían las concentraciones de ambos extractos puros operando durante todo el rango de concentraciones sin llegar a la concentración máxima, que es el extracto puro, observado en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** *Concentraciones de las combinaciones realizadas*

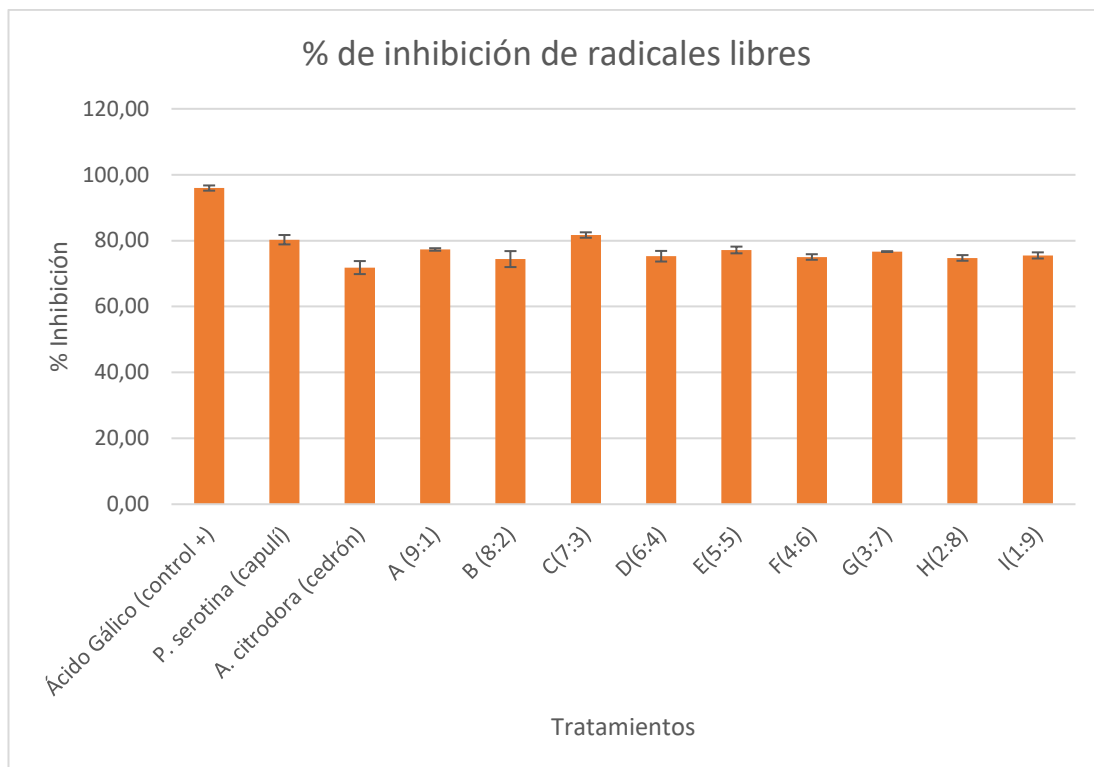
Combinación	Contenido de extracto de <i>P. serotina</i> (mg/mL)	Contenido de extracto de <i>A. citrodora</i> (mg/mL)
A (9:1)	9	1
B (8:2)	8	2
C (7:3)	7	3
D (6:4)	6	4
E (5:5)	5	5
F (4:6)	4	6
G (3:7)	3	7
H (2:8)	2	8



Combinación	Contenido de extracto de <i>P. serotina</i> (mg/mL)	Contenido de extracto de <i>A. citrodora</i> (mg/mL)
I (1:9)	1	9
Extracto puro de <i>P. serotina</i>	10	0
Extracto puro de <i>A. citrodora</i>	0	10

Concentraciones utilizadas para las combinaciones medidos en la actividad antioxidante. La concentración final es 10 mg/mL tanto para cada combinación como para los extractos puros. Elaboración propia.

En base del análisis de la actividad antioxidante de las combinaciones planteadas en la **Tabla 5**, se determinó que la mejor combinación fue la denotada como C (relación capulí:cedrón en 7:3) con una inhibición del  $82\pm 0.2\%$  (**Figura 4**), presentando una diferencia significativa con el resto de las combinaciones (**Anexo G**), seguida por la combinación A (relación 9:1) con  $77\pm 0.4\%$  de inhibición y la combinación E (relación 5:5) con  $77\pm 0.3\%$  de inhibición debido a la baja desviación estándar que poseen estos valores. Estos datos fueron obtenidos tras realizar una primera prueba de normalidad, y al no seguir parámetros normales se realizó la prueba de Kruskal – Wallis equivalente a una prueba ANOVA para datos no paramétricos. Se determinó que la combinación C es la mejor por una prueba de comparación múltiple de Wilcoxon, al determinar los valores cercanos a 1 (**Anexo G, Tabla 17**).



**Figura 4** Inhibición de radicales libres por parte de combinaciones de extractos

Las combinaciones se presentan en la relación Capulí:Cedrón expresada en mg/mL de cada uno de los extractos utilizado en cada tratamiento. El ácido gálico fue utilizado como control positivo y se mantienen los valores de los extractos puros para evidenciar la variación al combinarlos. Elaboración propia. La concentración final de cada tratamiento, incluidos los extractos puros y el control positivo fue de 10 mg/mL.

La obtención de extractos permite recuperar en gran medida compuestos como fenoles y flavonoides, para el aprovechamiento de su actividad antioxidante frente a radicales libres. Los extractos de *P. serotina* y *A. citrodora* poseen dicha actividad, y al combinar sus extractos en una relación de 7:3 respectivamente esta se incrementa debido a la *sinergia antioxidante*, obteniendo una actividad antioxidante mayor a la de los extractos puros. Este resultado permite su incorporación en el proceso de elaboración de ABs, con el fin de combatir las ROS causantes de la CI.

### 3.1.2. Construcción de andamios biológicos con extractos de *P. serotina* y *A. citrodora* para la comparación de su actividad antioxidante con extractos puros.

#### 3.1.2.1. Elaboración de ABs

El proceso de elaboración de ABs es un factor clave para su posible futura aplicación, ya que la estructura interna que se forma varía acorde las condiciones de fabricación y los biopolímeros utilizados (Kniebs et al., 2020). Tanto el colágeno como el quitosano proveen características adecuadas para la fabricación de ABs, por la biodegradabilidad y biocompatibilidad que presentan. Además, la incorporación de agarosa como agente reticulizante facilita el proceso de entrecruzamiento entre los biopolímeros, al formar paredes y estructuras más estables (Samrot et al., 2023). Debido a esto, la liofilización es uno de los procesos mas utilizados, ya que no interfiere con la estructura formada por los biopolímeros y permite la obtención de las llamadas *esponjas* por sus características morfológicas (Agarwal et al., 2021).

Las concentraciones de biopolímeros se adicionaron según lo señalado en la **Tabla 6**, ya que permiten una fácil manipulación de los ABs. Se prepararon soluciones con un volumen final de 30 mL para su vertido en cajas Petri de 10 cm hasta la solidificación a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó un tratamiento de ultracongelación durante 24h previo a la liofilización de 24h.

**Tabla 6.** Concentraciones de biopolímeros para la elaboración de andamios

Biopolímero	Concentracion (%)
Colágeno	1
Quitosano	1
Agarosa	0.5

La formación del AB control y el AB con extracto se realiza con las mismas concentraciones de biopolímeros. La incorporación del extracto se realizó al finalizar

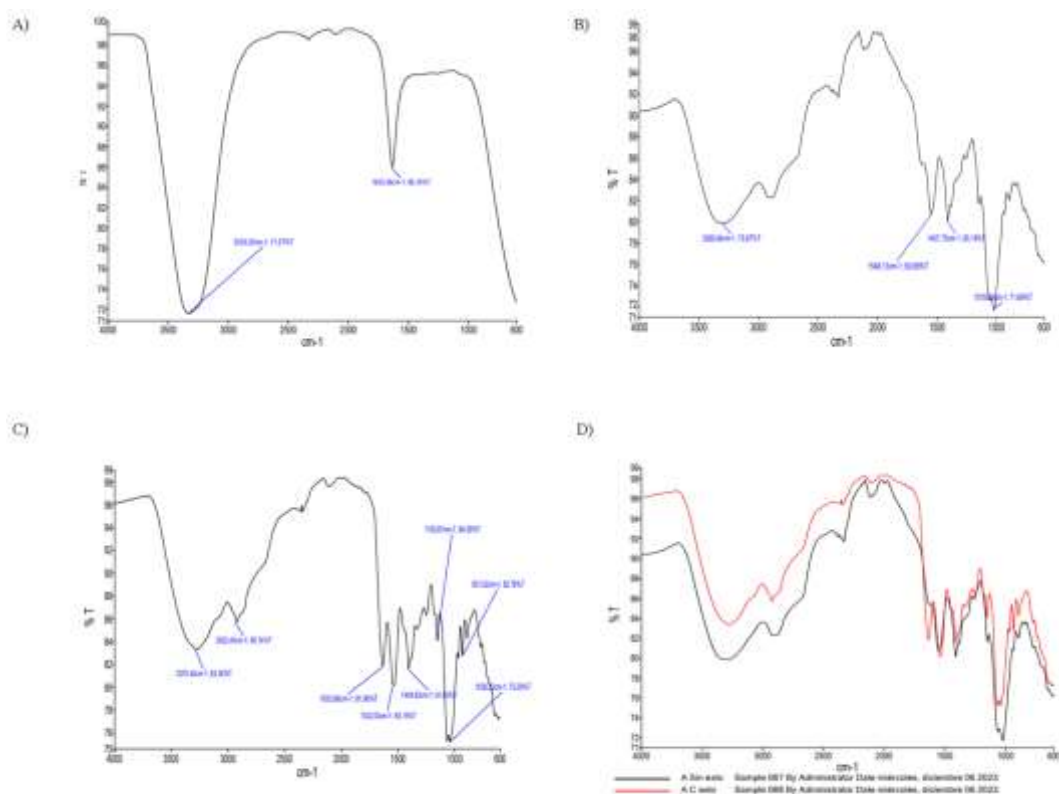
la homogenización de los biopolímeros, ya que se realiza esto en altas temperaturas por lo que los compuestos bioactivos podrían degradarse.

### **3.1.2.2. Actividad antioxidante en andamios biológicos**

Las ROS son cruciales para la IT, ya que una sobreproducción da lugar a la presencia de lípidos o tejidos relacionados, lo que perjudica a una producción exitosa de tejidos u órganos (Lee et al., 2021). Debido a esto es necesario involucrar compuestos como actividad antioxidante obtenidos de extractos vegetales (Agarwal et al., 2021).

Una forma rápida de comprobar si los andamios biológicos poseen esta actividad es mediante el uso de espectroscopía infrarroja por la transformada de Fourier (FT-IR). La FT-IR es una técnica en donde se identifican grupos funcionales específicos, al generar un espectro según la interacción que estos tengan con el haz de luz infrarroja que emite el equipo (Pharmawati & Putu, 2020). En la presente investigación se utilizó esta técnica ya que por medio de ella es posible determinar la presencia de compuestos bioactivos como fenoles y flavonoides por los grupos bencénicos e hidroxilo que poseen (Telichowska, Kobus-cisowska, et al., 2020).

Compuestos como fenoles y flavonoides presentan diversos grupos hidroxilo en su composición química, con esto son capaces de liberar este protón para inhibir los radicales libres en forma de ROS. Por lo que mediante FT-IR es posible detectar la presencia de estos grupos en la muestra (Pharmawati & Putu, 2020). La presencia de actividad antioxidante en estos andamios permite que sean una alternativa al tratamiento de la CI, ya que permitiría reducir el estrés oxidativo generado por las ROS, además de prevenir la peroxidación lipídica, y no interferir con el factor nuclear kappa-beta (NF- $\kappa$ B) responsable de la respuesta inflamatoria. (Tyagi et al., 2021).



**Figura 5** Espectro infrarrojo de andamios biológicos y extracto incorporado

A) Espectro infrarrojo del extracto combinado de Capulí y Cedrón en relación 7:3. Se denotan 2 picos principales a  $3333.02$  y  $1633.36\text{ cm}^{-1}$  B Espectro del AB control. C) Espectro obtenido del AB con extracto añadido. Presentan más grupos funcionales de interés relacionados con la estructura de los polímeros utilizados y similares a los obtenidos en el extracto añadido. D) comparación del AB control (negro) con el AB con extracto (rojo). Se observan picos de grupos funcionales en el AB con extracto, sin estar presentes en el AB control. Elaboración propia.

La presencia de flavonoides viene denotada por las frecuencias a las cuales vibran al realizar en análisis de FT-IR. Los principales valores se destacan en frecuencias cercanas a  $1630$  y  $1370\text{ cm}^{-1}$  como se denota en el espectro de la combinación de extractos utilizada, demostrada en la **Figura 5A**. Al analizar el espectro de la figura 5A, el pico presentado en  $1633.36\text{ cm}^{-1}$  destaca la presencia de flavonoides y aminoácidos presentes (Kumar et al., 2020). En las **Figuras 5A y 5C** (espectro del AB con extracto incorporado) se denota un pico pronunciado a los  $3300\text{ cm}^{-1}$ . Este grupo pertenece a grupos hidroxilo y aminas, siendo los principales responsables de la

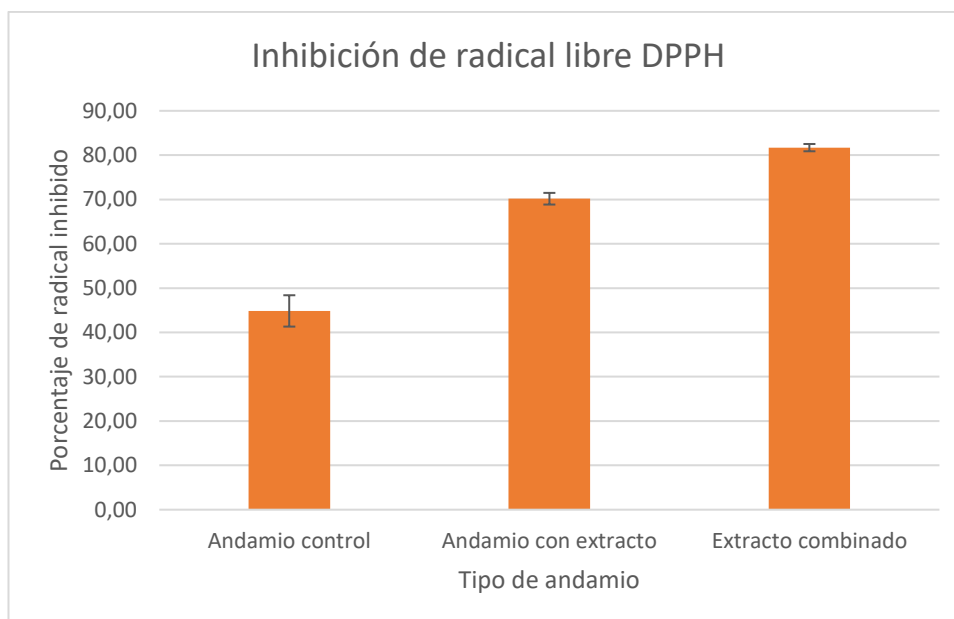
actividad antioxidante debido a la deprotonación y posterior neutralización de radicales libres (Telichowska, Kobus-cisowska, et al., 2020).

En el espectro comparativo entre el AB control y el AB con extracto (**Figura 5D**) se observa un pico a los  $1633.66\text{ cm}^{-1}$  perteneciente al AB que posee el extracto (corrida roja) el cual no está presente en el AB control (corrida negra). Este pico demuestra la presencia de grupos aromáticos pertenecientes a fenoles y flavonoides por una vibración de flexión simétrica (Patle et al., 2020). El pico existente en  $1520\text{ cm}^{-1}$  corresponde a los flavonoides y otros grupos aromáticos presentes. También se denotan en vibraciones cercanas a  $1630\text{ cm}^{-1}$  en donde reaccionan flavonoides y aminoácidos (Aquino et al., 2021).

En base a los resultados obtenidos se demuestra que luego del proceso de fabricación los andamios que contienen el extracto mantienen los compuestos antioxidantes determinados en los extractos puros. Esto permitiría que los compuestos fenólicos sean administrados de forma controlada en el medio cuando se incorporen células, lo que permitiría que el entorno del crecimiento no se vea invadido de ROS (Oppedisano et al., 2020). Del mismo modo, su incorporación en ABs a diferencia de una aplicación directa permite eliminar factores como citotoxicidad en concentraciones elevadas, la asimilación acelerada de estos compuestos por el tejido circundante, o daño celular debido a la degradación de la membrana plasmática u otros orgánulos celulares (Agarwal et al., 2021).

### **3.1.2.3 Inhibición de radicales libres por andamios biológicos**

Una vez determinada la presencia de compuestos con actividad antioxidante en los ABS, se evaluó el nivel de inhibición de radicales libres mediante el ensayo del radical DPPH. Dada la naturaleza y estructura de los ABs, fue necesaria una incubación previa en la solución metanol:agua en una relación 80:20 con el fin de hidratar los ABs. Esto permite que las muestras no absorban la solución que contiene el radical, y se genere un sobrenadante el cual permite medir el porcentaje de inhibición. Los resultados de este ensayo se muestran en la **Figura 6**.



**Figura 6** Inhibición de radicales libres por parte de ABs

Se utilizó el extracto obtenido con mayor actividad antioxidante para su incorporación en el AB (Extracto combinado). El AB control presenta una inhibición de radicales DPPH de  $44.85 \pm 3.53\%$ , mientras que el AB con extracto presentó una inhibición de  $70.17 \pm 1.31\%$ . Elaboración propia.

Como se muestra en la **Figura 6**, el andamio control presenta una inhibición del  $44.85 \pm 3.53\%$  de radicales libres presentes. Este es un porcentaje relativamente bajo, pero se da por la estructura química que presenta el quitosano con el que está formado, al tener grupos hidroxilo unidos a su estructura pero que no son capaces de ceder el átomo de hidrógeno presente. Este es un porcentaje inferior al reportado por Hao y sus colaboradores en 2021 en donde se reportaron valores de inhibición de radicales libres de hasta el 58.5%; sin embargo, este ensayo fue realizado para soluciones puras de quitosano y no para ABs de quitosano (Hao et al., 2021).

La actividad antioxidante del AB que posee el extracto es mayor en comparación con el AB control, en donde su inhibición llega hasta  $70.17 \pm 1.31\%$  (**Figura 6**). Sin embargo, no llega a tener el mismo valor de inhibición que el extracto puro ( $82 \pm 0.2\%$ ). Conforme lo reportado por Lee y sus colaboradores en 2021, es posible que esta disminución se deba por la concentración de extracto utilizada en la elaboración del

AB, la cual llega a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para evitar posibles daños por toxicidad, pero se logra mantener la actividad antioxidante en concentraciones adecuadas (Lee et al., 2021; Sthijns et al., 2018)

La incorporación de extractos vegetales permite incrementar la actividad antioxidante en los ABs, siendo favorable como un posible tratamiento frente a la CI. Adicional a la actividad antioxidante también es necesario determinar cómo la adición de la combinación de extractos influye en las características físicas y morfológicas de los ABs

### **3.1.3. Determinación de la influencia de la adición de extractos de *P. serotina* y *A. citrodora* en las características morfológicas y físicas de los andamios elaborados**

#### **3.1.3.1. Pruebas mecánicas realizadas en ABs**

Además de la actividad antioxidante, los ABs deben imitar las características físicas que posee el tejido que se planea desarrollar. Estas se enfocan en imitar la estructura original, además de ser compatible con la fisiología y anatomía correspondiente (Gieroba et al., 2021). Dentro de las tres principales características físicas que se estudian en la elaboración de los ABs se encuentran la resistencia a la tracción, el alargamiento a la rotura y la rotura al desplazamiento. Estos parámetros son indicadores del movimiento que es capaz de soportar el andamio con el fin de evaluar su estabilidad estructural y durabilidad (Mihai et al., 2019)

La resistencia a la tracción, permite conocer cuál es la fuerza necesaria para que el andamio sufra una deformación permanente, destacando valores altos para andamios con mayor resistencia y fuerza. ABs con valores altos son óptimos para su aplicación en el desarrollo de tejidos con durezas altas, como la regeneración ósea o cartilaginosa (Suamte et al., 2023). Esto conlleva al desarrollo de estructuras con menor resistencia para su aplicación en la CI, debido a los movimientos cardiacos y dilatación arterial. Para el AB con extracto se obtuvo  $0.2216 \pm 0.0439$  MPa, un incremento significativo frente a los  $0.1385 \pm 0.0940$  MPa, resistencia que presentó el AB control (**Tabla 7**).



Han sido reportados valores de resistencia a la tracción para andamios biológicos cercanos a 0.90 Mpa, pertenecientes únicamente a estructuras elaboradas con colágeno en una concentración de 4mg/mL (Perumal et al., 2018). Si bien es un incremento considerable en comparación con los valores obtenidos, la combinación de biopolímeros y el método de elaboración reducen su resistencia a la tracción, debido principalmente a la estructura interna formada y la interacción entre materiales, por los puentes de hidrogeno formados por la estructura química del quitosano.

El alargamiento a la rotura permite conocer cuál es la capacidad del material para sufrir deformaciones por estiramiento antes de generar fallos estructurales, lo cual es un índice de flexibilidad de este (Ramanathan et al., 2017). Dentro de la IT, el manejo adecuado de este valor es una pieza clave, en función del tipo de tejido que se quiere desarrollar. Específicamente para la CI, son necesarios ABs que presenten una mayor flexibilidad para soportar el estrés de los movimientos cardiacos continuos.

Los valores obtenidos llegan hasta un 3.7% máximo, para el andamio control, y hasta un 3.005% para el andamio que contiene le extracto (**Tabla 7**). Si bien no es un cambio realmente significativo (Anexo G), esta reducción puede deberse principalmente al engrosamiento de paredes formadas por biopolímeros, en donde por liofilización llegan a un estado de “sobresecado” reduciendo la flexibilidad del andamio biológico (Silvestro et al., 2021) Del mismo modo, no permiten que las paredes internas formadas se entrecrucen de forma adecuada.

Por otra parte, la rotura de desplazamiento se define como la deformación máxima sufrida previo a una rotura estructural del andamio biológico. Es un factor clave para tener en cuenta cuanto el tejido que se está desarrollando es constantemente sometido a tensiones continuas como puede ser el caso de la piel (Shehada et al., 2023). La adición de extractos no interfiere con la rotura al desplazamiento presentada por los ABs, teniendo  $1.1602 \pm 0.1931$  mm y  $1.1466 \pm 0.3081$  mm para los AB control y con extracto respectivamente (**Tabla 7**). Para el desarrollo de tejido endotelial aplicado para CI, los ABs no deben presentar una rigidez alta, ya que debido a la función que cumple, estructuras rígidas interferirían con las funciones normales del tejido.

Cuando se obtienen valores inferiores a 1.00 la estructura puede sufrir de fracturas prematuras, además de impedir un correcto desarrollo celular y tisular, ya que es susceptible a las condiciones del entorno (Liao et al., 2023) Por otra parte, en valores altos el AB posee una menor resistencia mecánica pero más flexibilidad, lo cual aplicado a estructuras en constante movimiento resulta perjudicial para el tejido, al ser más susceptible a una pérdida de adhesión por falta del soporte aplicado.

**Tabla 7.** *Propiedades mecánicas de los ABs*

<b>Tipo de andamio</b>	<b>Resistencia a la tracción (MPa)</b>	<b>Alargamiento a la rotura (%)</b>	<b>Rotura de desplazamiento (mm)</b>
Andamio control	0.1385±0.0940 <sup>a</sup>	3.0003±0.1303 <sup>c</sup>	1.1602±0.1931 <sup>d</sup>
Andamio con extracto	0.2216±0.0439 <sup>b</sup>	2.8104±0.7548 <sup>c</sup>	1.1466±0.3081 <sup>d</sup>

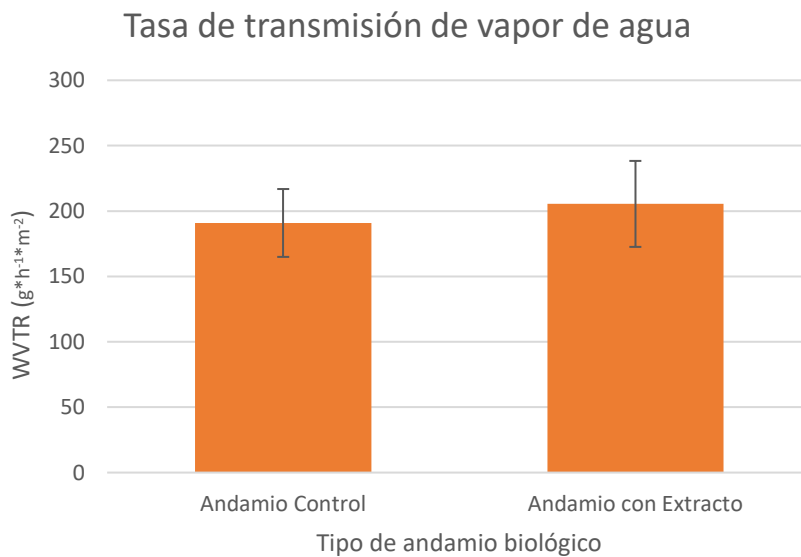
*Nota: Elaboración propia. Se presentan los valores promedio obtenido para cada una de las pruebas realizadas. Análisis estadístico elaborado por individual en cada prueba en donde se muestran diferencias significativas solo para la Resistencia a la tracción.*

Las pruebas mecánicas constituyen un punto clave de análisis para la viabilidad de los ABs previo a ensayos con células, en donde es posible observar en primera instancia cual será el comportamiento de estos en una posible aplicación futura (Shehada et al., 2023). Para el caso de la CI, andamios con una distancia a la rotura muy corta impedirán el funcionamiento correcto del tejido, al igual con un porcentaje bajo de alargamiento a la rotura. Por otra parte, la adición de extractos vegetales ha permitido un incremento en la resistencia a la tracción, posiblemente causado por la interacción

entre los biopolímeros y los componentes de estos extractos por reacciones directas o interacciones como puentes de hidrogeno.

### 3.1.3.2. Tasa de transmisión de vapor de agua y Permeabilidad al vapor de agua en Abs

La tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR) permite cuantificar cuanto vapor de agua pasa por la superficie de un material en un intervalo de tiempo determinado. Para esto es necesario tener en cuenta las condiciones de temperatura y humedad a la que es sometido el AB. Este valor debe ser adecuado con el fin de brindar un ambiente óptimo para el cultivo celular, ya que está relacionado con el intercambio gaseoso celular y la movilización de metabolitos para las células presentes en el cultivo de tejidos.

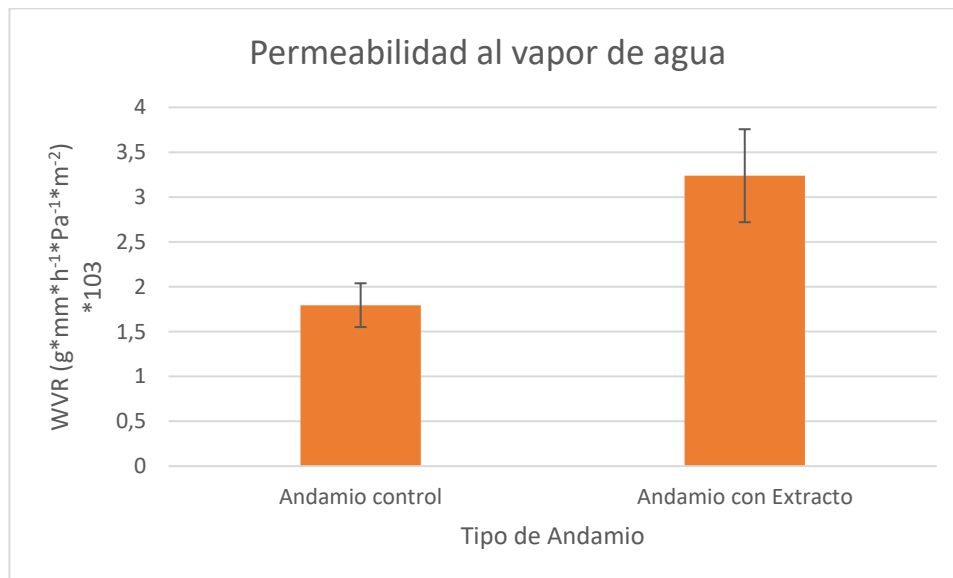


**Figura 7** Tasa de transmisión de vapor de agua en ABs

La tasa de transmisión de vapor de agua para el AB control obtenida es de  $190.891 \pm 25.951 \text{ g} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ , mientras que para el AB con extracto es de  $205.478 \pm 21.880 \text{ g} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  Elaboración propia

Para el andamio control se tuvo una WVTR promedio de  $190.891 \pm 25.951 \text{ g}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ , mientras que el andamio que posee el extracto tiene  $205.478 \pm 21.880 \text{ g}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ . Si bien existe una diferencia, esta no es significativa entre los andamios formados (Anexo G)(Sukriti et al., 2014). Esta tasa de transmisión se debe a la estructura química del quitosano, ya que es capaz de retener agua por su naturaleza hidrofílica, en donde estudios realizados por Cazón y sus colaboradores en 2022 han reportado valores de hasta  $250 \text{ g}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ . Si bien el colágeno posee una naturaleza similar, las estructuras internas que forma no dan paso a una retención tan elevada de agua, con valores superiores, siendo más aptos para su aplicación en IT (Cazón et al., 2022).

Por otra parte, la permeabilidad al vapor de agua (WVR) indica como se transmite el vapor de agua a través de la estructura interna del AB. Es por esto por lo que implica el uso de la WVTR en conjunto con el espesor del material y las condiciones de presión y humedad a las que se realizó el ensayo. Valores más altos implican una movilidad mayor, que en el campo de la IT corresponde al transporte de nutrientes, desechos, excusados y gases producidos por las células (Khodabandeh et al., 2022).



**Figura 8** Permeabilidad al vapor de agua para ABs

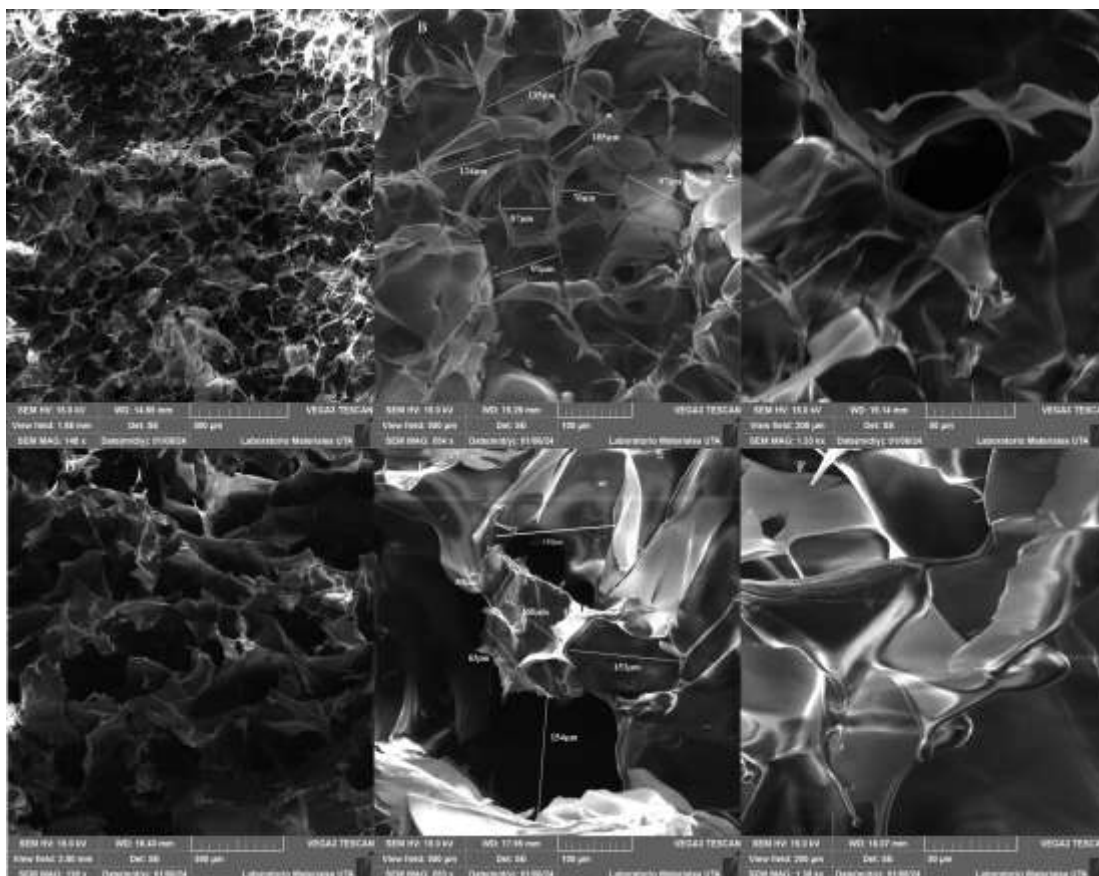
Se presentan los valores obtenidos para la WVR en los andamios elaborados con su desviación estándar el AB control presenta una permeabilidad de  $1.795 \pm 0.244 \text{ g} \cdot \text{mm} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot 10^{-3}$  y el AB con extracto  $3.238 \pm 0.518 \text{ g} \cdot \text{mm} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot 10^{-3}$ . Elaboración propia.

En el andamio control se obtuvo una WVR de  $1.795 \pm 0.244 \text{ g} \cdot \text{mm} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot 10^{-3}$ , a diferencia del andamio al cual se incorporó el extracto con un valor de  $3.238 \pm 0.518 \text{ g} \cdot \text{mm} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot 10^{-3}$ . Aquí se presenta una diferencia significativa entre los dos valores (Anexo G), influenciado por la adición del extracto, ya que los compuestos presentes, principalmente fenoles, influyen en la conformación de paredes internas al formar puentes de hidrogeno con el quitosano presente en la estructura (Martínez et al., 2015; Zou et al., 2018). Esto conlleva a paredes internas con mayor separación, lo cual facilita la movilidad del vapor de agua a través de la estructura interna del AB. En el andamio control, las estructuras internas tienen una menor separación, al no tener compuestos adicionales, las moléculas de quitosano forman puentes de hidrogeno entre sí, lo cual disminuye la distancia entre paredes internas.

### 3.1.3.3. Evaluación morfológica de los ABs

El tamaño y disposición de los poros presentes en los AB es un punto clave para una aplicación adecuada en la IT, ya que con esto se garantiza tanto la viabilidad celular dentro del andamio al permitir el alojamiento y proliferación de las células, como el paso de nutrientes, gases y el transporte de desechos. Esto está íntimamente relacionado con parámetros como la permeabilidad y las características mecánicas que presentan estos ABs.

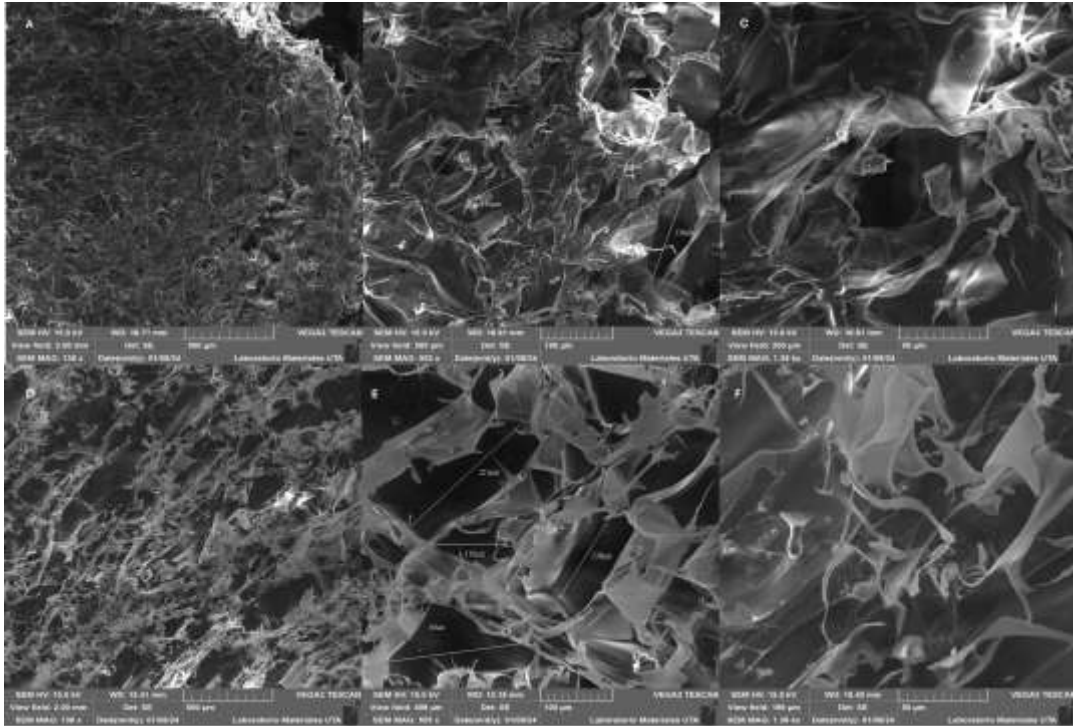
La **Figura 9** presenta la superficie de los andamios formados El andamio control se muestra en las **Figuras 9 A, B y C**. La superficie de este AB presenta estructuras ordenadas pero irregulares con formas rugosas. Por otra parte, el AB con extracto incorporado tiene una superficie más desordenada e irregular con poros de mayor tamaño, corroborando lo obtenido en el ensayo de permeabilidad al vapor de agua.



**Figura 9** Imágenes de la superficie de los ABs

Observaciones morfológicas de la superficie de los ABs mediante SEM. AB control (A,B,C) y AB con extracto incorporado (D,E,F) a MAG de 140x (Figuras A y D), 553x (Figuras B y E) y 1.33kx (Figuras C y F). Elaboración propia.

Las **Figuras 10 A, B y C** corresponden al corte transversal del AB control, en donde es evidenciable la alta porosidad que presenta como en su superficie. En la figura 10B es posible determinar los tamaños de poro presentes al estar dispuestos de forma más ordenada que el andamio con extracto (**Figura 10E**), con un tamaño promedio de poro de  $54.92\mu\text{m}$ , pero con valores que oscilan entre  $40$  y  $135\mu\text{m}$ . En cuanto al AB con extracto, la figura 10E permitió medir el tamaño del poro, con valores de entre  $47$  y  $220\mu\text{m}$  y un promedio de  $83.52\mu\text{m}$ . En base a esto, la adición de extractos vegetales sí influye en morfología y porosidad de los ABs.



**Figura 10** Evaluación morfológica de los ABs

Observaciones morfológicas y medición de poros presentes en los ABs mediante SEM. AB control (A,B,C) y AB con extracto incorporado (D,E,F) a MAG de 138x (Figuras A y D), 555x (Figuras B y E) y 1.38kx (Figuras F y E). Elaboración propia.

El control del tamaño de poro es fundamental para la aplicación de un AB en la ingeniería de tejidos, por lo que es fundamental considerar tanto una macroestructura, como la formada en la superficie con poros de mayor tamaño, como la estructura interna con poros de menor tamaño y mayor superficie de soporte (Khodabandeh et al., 2022; Kirillova et al., 2021). Células endoteliales llegan a un promedio de longitud de 25  $\mu\text{m}$ , por lo que es necesario poros de mayor tamaño entre 80 y 180  $\mu\text{m}$ , para facilitar el ingreso y alojamiento celular. Además, debido a la densidad celular que produce este tipo de tejidos y la morfología plana de la célula es recomendable una superficie lisa para el desarrollo tisular (Collins et al., 2021).

La adición de extractos vegetales en la fabricación de ABs influye de forma directa en sus características físicas y morfológicas, como en el incremento de la resistencia a la tracción, lo que da lugar a ABs con una resistencia adecuada a los movimientos

naturales del tejido, la mejora de la permeabilidad permitiendo un mejor intercambio de nutrientes y expulsión de desechos y la morfología, en donde se tienen poros más grandes pero menos ordenados.



## CAPITULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1. Conclusiones

- Se obtuvieron los extractos vegetales mediante maceración hidroalcohólica. El rendimiento fue de 11.34% y 12.32% para el cedrón y capulí respectivamente. Estos extractos presentan concentraciones relevantes de fenoles y flavonoides, principales responsables de la actividad antioxidante. Los extractos puros fueron capaces de inhibir radicales libres hasta un 80.28% para el capulí y 71.82% para el cedrón. La combinación de estos extractos en una proporción de 7:3 para capulí:cedrón presenta un efecto sinérgico incrementando la actividad antioxidante presente llegando hasta un 82%.
- Se elaboraron ABs de dos tipos mediante liofilización, AB control que contiene solo biopolímeros, y AB con biopolímeros y extracto en la relación 7:3. Se incorporó la mejor combinación de extractos en el proceso y se demostró que se mantienen a presencia de compuestos antioxidantes en el andamio. Esta incorporación permite que el AB con extracto sea capaz de inhibir el 70.17% de radicales libres. Sin embargo, no se mantiene el 82% de inhibición de la combinación de extracto puro (7:3) utilizado, debido a la concentración final del extracto en el AB.
- La incorporación del extracto influyó de forma directa en las características físicas y morfológicas de los ABs. Los ABs con extracto poseen una morfología más irregular, con poros más grandes (83.52  $\mu\text{m}$ ) y menos ordenados frente a los AB control (54.92 $\mu\text{m}$ ). Esto viene relacionado directamente con la permeabilidad, al tener poros más grandes facilita el paso del vapor de agua por la estructura. De igual forma, la resistencia a la tracción es señal de paredes más gruesas, con estructuras más separadas que permiten una resistencia mayor. Estos dos últimos parámetros también fueron superiores en el andamio con extracto (0.2216 $\pm$ 0.0439 MPa), comparado con el andamio control (0.1385 $\pm$ 0.0940 MPa).

- Finalmente, se ha demostrado que la incorporación de extractos de origen vegetal de *P. serotina* y *A. citrodora* en ABs permiten reducir la presencia de radicales libres, que en altas concentraciones podrían ser perjudiciales para la CI, al causar estrés oxidativo, la peroxidación lipídica o degradación de membranas celulares. Adicionalmente, se demostró que la adición de extractos influye en las características físicas y morfológica de los andamios. Esto demuestra que el AB con extracto tiene potencial de ser aplicado en la IT para el desarrollo de tejido endotelial y combatir la CI.

#### **4.2. Recomendaciones**

- En el proceso de extracción, es recomendable tener en cuenta la naturaleza de los compuestos bioactivos, para utilizar un solvente con polaridad adecuada y tener mejores rendimientos. Asimismo, para la obtención del extracto, es necesario conocer las condiciones adecuadas de trabajo, principalmente la temperatura ya que ciertos fenoles y flavonoides pueden degradarse infiriendo en los valores totales.
- Tomar en consideración el estadio de la planta, debido a las estaciones de producción del capulí. Así también, la zona de obtención del cedrón ya que en zonas cálidas es capaz de producir metabolitos como fenoles y flavonoides en mayor nivel.
- Se recomienda mantener las mismas condiciones para el proceso de liofilización, como tiempo de ultracongelación previa, carga introducida en el equipo de liofilización, tiempo de trabajo del equipo y papel filtro utilizado, ya que se podría llegar a condiciones de sobresecado, o de forma contraria, mantener humedad en el AB.
- Evaluar los AB con ensayos de viabilidad celular para determinar si la incorporación de extracto interfiere con el crecimiento celular.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aaliya, B., Sunooj, K. V., & Lackner, M. (2021). Biopolymer composites: a review. *International Journal of Biobased Plastics*, 3(1), 40–84. <https://doi.org/10.1080/24759651.2021.1881214>
- Abdullah, J., Manan, F., Nadziera, N., Abd, I., Azah, N., & Ahmad, I. (2016). IMMOBILIZATION OF TYROSINASE IN NANOCRYSTALLINE CELLULOSE/CHITOSAN COMPOSITE FILM FOR AMPEROMETRIC DETECTION OF PHENOL. *Malaysian Journal of Analytical Science*, 20(5), 978–985. <https://doi.org/10.17576/mjas-2016-2005-02>
- Abubakar, A., & Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 12(1), 1. [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_175\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19)
- Adeli, A., Shamloofar, M., & Akrami, R. (2021). Dietary effect of Lemon Verbena ( *Aloysia triphylla* ) extract on growth performance, some haematological, biochemical, and non-specific immunity and stocking density challenge of rainbow trout juveniles ( *Oncorhynchus mykiss* ). *Journal of Applied Animal Research*, 49(1), 382–390. <https://doi.org/10.1080/09712119.2021.1990069>
- 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>
- Alves, M. C. M. A., Nascimento, M. F., de Almeida, B. M., Alves, M. M. A., Lima-Verde, I. B., Costa, D. S., Araújo, D. C. M., de Paula, M. N., Mello, J. C. P. de, Cano, A., Severino, P., Albuquerque-Júnior, R. L. C. de, Souto, E. B., & Cardoso, J. C. (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>

- Aquino, F. R., Reyes, R. F., Quiñones, J. G. R., García, W. S., Mota, M. E. S., & Reyes, H. H. E. (2021). DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR CONDENSED TANNIN EXTRACTS OBTAINED FROM THE BARK OF FOUR TREE SPECIES USING HPLC. *Wood Research*, 66(2), 171–182. <https://doi.org/10.37763/wr.1336-4561/66.2.171182>
- Arjmand, B., Abedi, M., Arabi, M., Alavi-Moghadam, S., Rezaei-Tavirani, M., Hadavandkhani, M., Tayanloo-Beik, A., Kordi, R., Roudsari, P. P., & Larijani, B. (2021). Regenerative Medicine for the Treatment of Ischemic Heart Disease; Status and Future Perspectives. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.704903>
- Baheiraei, N., Yeganeh, H., Ai, J., Gharibi, R., Azami, M., & Faghihi, F. (2014). Synthesis, characterization and antioxidant activity of a novel electroactive and biodegradable polyurethane for cardiac tissue engineering application. *Materials Science and Engineering: C*, 44, 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.07.061>
- Bahramsoltani, R., Rostamiasrabadi, P., Shahpiri, Z., Marques, A. M., Rahimi, R., & Farzaei, M. H. (2018). *Aloysia citrodora* Paláu (Lemon verbena): A review of phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 222, 34–51. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.021>
- Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R. P., & Chang, C.-M. (2022). Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules*, 27(4), 1326. <https://doi.org/10.3390/molecules27041326>
- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>

- Bitwell, C., Indra, S. Sen, Luke, C., & Kakoma, M. K. (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>
- 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>
- Brozdowski, J., Waliszewska, B., Gacnik, S., Hudina, M., Veberic, R., & Mikulic-Petkovsek, M. (2021). Phenolic composition of leaf and flower extracts of black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.). *Annals of Forest Science*, *78*(3). <https://doi.org/10.1007/s13595-021-01089-6>
- Brozdowski, J., Waliszewska, B., Loffler, J., Hudina, M., Veberic, R., & Mikulic-Petkovsek, M. (2021). Composition of phenolic compounds, cyanogenic glycosides, organic acids and sugars in fruits of black cherry (*Prunus serotina* ehrh.). *Forests*, *12*(6). <https://doi.org/10.3390/f12060762>
- Carrasco, J., Caballero, V., Lema, F., & Acosta, Á. (2022). Production and commercialization of capulí (*Prunus serotina* subsp. capulí) a case study in rural areas of the centrl Andres of Ecuador. *Dominio de Las Ciencias*, *8*(2), 920–937.
- Carrillo, C., & Díaz, R. (2020). Actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de las hojas de dos variedades de *Mangifera indica* L. *Revista Ciencia Unemi*, *13*(32), 69–77.
- 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>

- Chandra, P. K., Soker, S., & Atala, A. (2020). Tissue engineering: current status and future perspectives. In *Principles of Tissue Engineering* (pp. 1–35). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818422-6.00004-6>
- Chasara, R. S., Ajayi, T. O., Leshilo, D. M., Poka, M. S., & Witika, B. A. (2023). Exploring novel strategies to improve anti-tumour efficiency: The potential for targeting reactive oxygen species. *Heliyon*, 9(9), e19896. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19896>
- Chaves, N., Santiago, A., & Alías, J. C. (2020). Quantification of the antioxidant activity of plant extracts: Analysis of sensitivity and hierarchization based on the method used. *Antioxidants*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/antiox9010076>
- Chen, K., Li, Y., Li, Y., Tan, Y., Liu, Y., Pan, W., & Tan, G. (2023). Stimuli-responsive electrospun nanofibers for drug delivery, cancer therapy, wound dressing, and tissue engineering. In *Journal of Nanobiotechnology* (Vol. 21, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-01987-z>
- Chen, Y. M., Liu, Z. Q., Feng, Z. H., Xu, F., & Liu, J. K. (2014). Adhesive protein-free synthetic hydrogels for retinal pigment epithelium cell culture with low ROS level. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(7), 2258–2267. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34904>
- Cheurfa, M., & Allem, R. (2016). Évaluation de l'activité anti-oxydante de différents extraits des feuilles d'Aloysia triphylla (L'Hérit.) d'Algérie in vitro. *Phytothérapie*, 14(3), 181–187. <https://doi.org/10.1007/s10298-015-0969-4>
- Chisaguano, L. (2012). *Eavluación de la aplicación de tres productos inductores de brotación en capulí (Prunus serotina), comunidad Quilaló*. Universidad Técnica de Cotopaxi.
- 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). <https://doi.org/10.1002/adfm.202010609>

- 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>
- Dubois-Deruy, E., Peugnet, V., Turkieh, A., & Pinet, F. (2020). Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants*, 9(9), 864. <https://doi.org/10.3390/antiox9090864>
- Echeverria Molina, M. I., Malollari, K. G., & Komvopoulos, K. (2021). Design Challenges in Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.617141>
- El-Hawary, S., Mousa, O., El-Fitiany, R., & El Gedaily, R. (2020). Cytotoxic, antimicrobial activities, and phytochemical investigation of three peach cultivars and acerola leaves. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*, 9(2), 221. [https://doi.org/10.4103/jrpts.JRPTPS\\_88\\_19](https://doi.org/10.4103/jrpts.JRPTPS_88_19)
- Fagbemi, K. O., Aina, D. A., & Olajuyigbe, O. O. (2021). Soxhlet Extraction versus Hydrodistillation Using the Clevenger Apparatus: A Comparative Study on the Extraction of a Volatile Compound from *Tamarindus indica* Seeds. *The Scientific World Journal*, 2021, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2021/5961586>
- Fernández-Cusimamani, E., Espinel-Jara, V., Gordillo-Alarcón, S., Castillo-Andrade, R., Žiarovská, J., Zepeda-Del Valle, J. M., & Lara-Reimers, E. A. (2019). ESTUDIO ETNOBOTÁNICO DE PLANTAS MEDICINALES UTILIZADAS EN TRES CANTONES DE LA PROVINCIA IMBABURA, ECUADOR ETHNOBOTANICAL STUDY OF MEDICINAL PLANTS USED IN THREE DISTRICTS OF IMBABURA PROVINCE, ECUADOR. In *Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia* (Vol. 53). [www.ipni.org](http://www.ipni.org)
- Gallardo-Rivera, C. T., Lu, A., Treviño-Garza, M. Z., García-Márquez, E., Amaya-Guerra, C., Aguilera, C., & Báez-González, J. G. (2021). Valorization of Almond

(*Prunus serotina*) by Obtaining Bioactive Compounds. *Frontiers in Nutrition*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.663953>

Ganguly, P., Sengupta, S., Das, P., & Bhowal, A. (2020). Synthesis of Cellulose from Peanut Shell Waste and Its Use in Bioethanol Production. In *Bioresource Utilization and Bioprocess* (pp. 81–91). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1607-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1607-8_10)

Gao, A. X., Xia, T. C.-X., Mak, M. S.-H., Zhu, K. Y., Dong, T. T.-X., & Tsim, K. W.-K. (2022). A Herbal Mixture of Sesami Semen Nigrum and Longan Arillus Induces Neurite Outgrowth in Cultured Neurons and Shows Anti-Depression in Chronic Mild Stress-Induced Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2022/8809546>

Garcia, C. F., Marangon, C. A., Massimino, L. C., Klingbeil, M. F. G., Martins, V. C. A., & Plepis, A. M. de G. (2021). Development of collagen/nanohydroxyapatite scaffolds containing plant extract intended for bone regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 123, 111955. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111955>

Gieroba, B., Przekora, A., Kalisz, G., Kazimierczak, P., Song, C. L., Wojcik, M., Ginalska, G., Kazarian, S. G., & Sroka-Bartnicka, A. (2021). Collagen maturity and mineralization in mesenchymal stem cells cultured on the hydroxyapatite-based bone scaffold analyzed by ATR-FTIR spectroscopic imaging. *Materials Science and Engineering: C*, 119, 111634. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111634>

Gkalpinos, V. K., Anagnostou, V. A., Mitropoulou, G., Kompoura, V., Karapantzou, I., Fasoulis, C. K., Vasdekis, E. P., Kourkoutas, Y., & Tzakos, A. G. (2023). Aloysia citrodora Extracts Cultivated in Greece as Antioxidants and Potent Regulators of Food Microbiota. *Applied Sciences*, 13(6), 3663. <https://doi.org/10.3390/app13063663>



- Guan, N., Liu, Z., Zhao, Y., Li, Q., & Wang, Y. (2020). Engineered biomaterial strategies for controlling growth factors in tissue engineering. *Drug Delivery*, 27(1), 1438–1451. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1831104>
- Hao, W., Li, K., Ma, Y., Li, R., Xing, R., Yu, H., & Li, P. (2021). Preparation and Antioxidant Activity of Chitosan Dimers with Different Sequences. *Marine Drugs*, 19(7), 366. <https://doi.org/10.3390/md19070366>
- Hsiao, L.-C., Carr, C., Chang, K.-C., Lin, S.-Z., & Clarke, K. (2013). Stem Cell-Based Therapy for Ischemic Heart Disease. *Cell Transplantation*, 22(4), 663–675. <https://doi.org/10.3727/096368912X655109>
- Iglesias, D., & Pichucho, P. (2021). *Desarrollo de un microencapsulado de cedrón (Aloysia citrodora) mediante secado por aspersión*. Universidad técnica de Cotopazi.
- 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), 673–697. <https://doi.org/10.1007/s13770-018-0135-9>
- Islam, Md. M., Shahruzzaman, Md., Biswas, S., Nurus Sakib, Md., & Rashid, T. U. (2020). Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications-A review. *Bioactive Materials*, 5(1), 164–183. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.01.012>
- Jaradat, N., Hawash, M., Abualhasan, M. N., Qadi, M., Ghanim, M., Massarwy, E., Ammar, S. A., Zmero, N., Arar, M., Hussein, F., Issa, L., Mousa, A., & Zarour, A. (2021a). Spectral characterization, antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, and cyclooxygenase inhibitory activities of *Aloysia citrodora* essential oils collected from two Palestinian regions. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03314-1>
- Jaradat, N., Hawash, M., Abualhasan, M. N., Qadi, M., Ghanim, M., Massarwy, E., Ammar, S. A., Zmero, N., Arar, M., Hussein, F., Issa, L., Mousa, A., & Zarour, A. (2021b). Spectral characterization, antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, and

cyclooxygenase inhibitory activities of *Aloysia citriodora* essential oils collected from two Palestinian regions. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03314-1>

Jin, G., Prabhakaran, M. P., Kai, D., Annamalai, S. K., Arunachalam, K. D., & Ramakrishna, S. (2013). Tissue engineered plant extracts as nanofibrous wound dressing. *Biomaterials*, 34(3), 724–734. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.026>

Kaczmarek, B., & Sionkowska, A. (2018). Chitosan/collagen blends with inorganic and organic additive-A review. *Advances in Polymer Technology*, 37(6), 2367–2376. <https://doi.org/10.1002/adv.21912>

Kaczmarek-Szczepańska, B., Polkowska, I., Małek, M., Kluczyński, J., Paździor-Czapula, K., Wekwejt, M., Michno, A., Ronowska, A., Pałubicka, A., Nowicka, B., & Otrocka-Domagała, I. (2023). The characterization of collagen-based scaffolds modified with phenolic acids for tissue engineering application. *Scientific Reports*, 13(1), 9966. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37161-6>

Kalva, S. N., Dalvi, Y. B., P, N. K., Varghese, R., Ahammed, I., Augustine, R., & Hasan, A. (2023). Air-jet spun PHBV/PCL blend tissue engineering scaffolds exhibit improved mechanical properties and cell proliferation. *Results in Materials*, 19, 100415. <https://doi.org/10.1016/j.rinma.2023.100415>

Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2016). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>

Karabegović, I. T., Stojičević, S. S., Veličković, D. T., Todorović, Z. B., Nikolić, N. Č., & Lazić, M. L. (2014). The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. *Industrial Crops and Products*, 54, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.047>

- Khodabandeh, Z., Tanideh, N., Aslani, F. S., Jamhiri, I., Zare, S., Alizadeh, N., Safari, A., Farshidfar, N., Dara, M., & Zarei, M. (2022). A comparative in vitro and in vivo study on bone tissue engineering potential of the collagen/nano-hydroxyapatite scaffolds loaded with ginger extract and curcumin. *Materials Today Communications*, 31, 103339. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103339>
- Kibel, A., Lukinac, A. M., Dambic, V., Juric, I., & Selthofer-Relatic, K. (2020). Oxidative Stress in Ischemic Heart Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–30. <https://doi.org/10.1155/2020/6627144>
- Kim, S. T., Helmers, M. R., Iyengar, A., Han, J. J., Patrick, W. L., Weingarten, N., Herbst, D. A., & Atluri, P. (2022). Interaction between donor obesity and prolonged donor ischemic time in heart transplantation. *Journal of Cardiology*, 80(4), 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2022.06.013>
- Kirillova, A., Yeazel, T. R., Asheghali, D., Petersen, S. R., Dort, S., Gall, K., & Becker, M. L. (2021). Fabrication of Biomedical Scaffolds Using Biodegradable Polymers. *Chemical Reviews*, 121(18), 11238–11304. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01200>
- Kniebs, C., Kreimendahl, F., Köpf, M., Fischer, H., Jockenhoevel, S., & Thiebes, A. L. (2020). Influence of Different Cell Types and Sources on Pre-Vascularisation in Fibrin and Agarose–Collagen Gels. *Organogenesis*, 16(1), 14–26. <https://doi.org/10.1080/15476278.2019.1697597>
- Kopecki, Z. (2021). Development of next-generation antimicrobial hydrogel dressing to combat burn wound infection. *Bioscience Reports*, 41(2). <https://doi.org/10.1042/BSR20203404>
- Kou, S. (Gabriel), Peters, L. M., & Mucalo, M. R. (2021). Chitosan: A review of sources and preparation methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.005>

- Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., & Zdunek, A. (2022). FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – A review. *Food Chemistry*, 393, 133430. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133430>
- Kumar, Y., Kumar, V., & Sangeeta. (2020). Comparative antioxidant capacity of plant leaves and herbs with their antioxidative potential in meat system under accelerated oxidation conditions. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(6), 3250–3262. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00571-5>
- Lee, S., Lee, J., Byun, H., Kim, S., Joo, J., Park, H. H., & shin, H. (2021). Evaluation of the anti-oxidative and ROS scavenging properties of biomaterials coated with epigallocatechin gallate for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 124, 166–178. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.02.005>
- Liao, M., Zhu, S., Guo, A., Han, X., Li, Q., Chen, Y., Liu, Y., Chen, D., Chen, X., Mo, S., & Cao, X. (2023). 3D printed bioactive glasses porous scaffolds with high strength for the repair of long-bone segmental defects. *Composites Part B: Engineering*, 254, 110582. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2023.110582>
- López-Bascón, M. A., & Luque de Castro, M. D. (2020). Soxhlet Extraction. In *Liquid-Phase Extraction* (pp. 327–354). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00011-6>
- Madonna, R., Van Laake, L. W., Botker, H. E., Davidson, S. M., De Caterina, R., Engel, F. B., Eschenhagen, T., Fernandez-Aviles, F., Hausenloy, D. J., Hulot, J.-S., Lecour, S., Leor, J., Menasché, P., Pesce, M., Perrino, C., Prunier, F., Van Linthout, S., Ytrehus, K., Zimmermann, W.-H., ... Sluijter, J. P. G. (2019). ESC Working Group on Cellular Biology of the Heart: position paper for Cardiovascular Research: tissue engineering strategies combined with cell therapies for cardiac repair in ischaemic heart disease and heart failure. *Cardiovascular Research*, 115(3), 488–500. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz010>
- 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>
- Mihai, M. M., Dima, M. B., Dima, B., & Holban, A. M. (2019). Nanomaterials for wound healing and infection control. In *Materials* (Vol. 12, Issue 13). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma12132176>
- Moris, D., Spartalis, M., Spartalis, E., Karachaliou, G.-S., Karaolani, G. I., Tsourouflis, G., Tsilimigras, D. I., Tzatzaki, E., & Theocharis, S. (2017). The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox. *Annals of Translational Medicine*, 5(16), 326. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.06.27>
- Munguía, A., Villegas, Y., Carranza, C., & Campos, R. (2022). Synergistic effect of actives compounds of medicinal plants on their biologic properties. *RIIIT*, 10(57), 10–27.
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- 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>
- Oppedisano, F., Macri, R., Gliozzi, M., Musolino, V., Carresi, C., Maiuolo, J., Bosco, F., Nucera, S., Caterina Zito, M., Guarnieri, L., Scarano, F., Nicita, C., Coppoletta, A. R., Ruga, S., Scicchitano, M., Mollace, R., Palma, E., & Mollace, V. (2020). The Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of n-3 PUFAs: Their Role in Cardiovascular Protection. *Biomedicines*, 8(9), 306. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8090306>
- Orapiriyakul, W., Tsimbouri, M. P., Childs, P., Campsie, P., Wells, J., Fernandez-Yague, M. A., Burgess, K., Tanner, K. E., Tassieri, M., Meek, D., Vassalli, M., Biggs, M. J. P., Salmeron-Sanchez, M., Oreffo, R. O. C., Reid, S., & Dalby, M.

- J. (2020). Nanovibrational Stimulation of Mesenchymal Stem Cells Induces Therapeutic Reactive Oxygen Species and Inflammation for Three-Dimensional Bone Tissue Engineering. *ACS Nano*, *14*(8), 10027–10044. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c03130>
- Osorio, J. F. (2020). Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *Journal of Food Science and Technology*, *57*(12), 4299–4315. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04433-2>
- Palaric, C., Atwi-Ghaddar, S., Gros, Q., Hano, C., & Lesellier, E. (2023). Sequential selective supercritical fluid extraction (S3FE) of triglycerides and flavonolignans from milk thistle (*Silybum marianum* L, Gaertn). *Journal of CO2 Utilization*, *77*, 102609. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2023.102609>
- Panzl, M. V., Menchaca, D., & Rodríguez-Haralambides, A. (2022). Analysis of polyphenols and xanthines in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) infusions by high-pressure extraction and ultra-high performance liquid chromatography. *Applied Food Research*, *2*(2), 100192. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100192>
- Patle, T. K., Shrivastava, K., Kurrey, R., Upadhyay, S., Jangde, R., & Chauhan, R. (2020). Phytochemical screening and determination of phenolics and flavonoids in *Dillenia pentagyna* using UV–vis and FTIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *242*, 118717. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118717>
- Perumal, R. K., Gopinath, A., Thangam, R., Perumal, S., Masilamani, D., Ramadass, S. K., & Madhan, B. (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>
- Pharmawati, M., & Putu, L. (2020). PHYTOCHEMICAL SCREENING AND FTIR SPECTROSCOPY ON CRUDE EXTRACT FROM *Enhalus acoroides* LEAVES. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, *24*(1), 70–77.
- Ramanathan, G., Singaravelu, S., Muthukumar, T., Thyagarajan, S., Perumal, P. T., & Sivagnanam, U. 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>
- Rashid, H. M., Mahmud, A. I., Afifi, F. U., & Talib, W. H. (2022). Antioxidant and Antiproliferation Activities of Lemon Verbena (*Aloysia citrodora*): An In Vitro and In Vivo Study. *Plants*, 11(6), 785. <https://doi.org/10.3390/plants11060785>
- Ren, X., Zhao, M., Lash, B., Martino, M. M., & Julier, Z. (2020). Growth Factor Engineering Strategies for Regenerative Medicine Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00469>
- Rodrigues, M. Á. V., Bertolo, M. R. V., Marangon, C. A., Martins, V. da C. A., & Plepis, A. M. de G. (2020). Chitosan and gelatin materials incorporated with phenolic extracts of grape seed and jabuticaba peel: Rheological, physicochemical, antioxidant, antimicrobial and barrier properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160, 769–779. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.240>
- Rojas, J., Trávez, A., & Cevallos, E. (2022). Extracción hidroalcohólica de polifenoles a partir de las hojas de cedrón (*Aloysia citrodora* Paláu) como ingrediente alimentario natural. *Renpys*, 15(22), 56–59.
- Rubio-Elizalde, I., Bernáldez-Sarabia, J., Moreno-Ulloa, A., Vilanova, C., Juárez, P., Licea-Navarro, A., & Castro-Ceseña, A. B. (2019). Scaffolds based on alginate-PEG methyl ether methacrylate-Moringa oleifera-Aloe vera for wound healing applications. *Carbohydrate Polymers*, 206, 455–467. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.027>
- Saeedi Garakani, S., Khanmohammadi, M., Atoufi, Z., Kamrava, S. K., Setayeshmehr, M., Alizadeh, R., Faghihi, F., Bagher, Z., Davachi, S. M., & Abbaspourrad, A. (2020). Fabrication of chitosan/agarose scaffolds containing extracellular matrix for tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143, 533–545. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.040>
- Samrot, A. V., Sathiyasree, M., Rahim, S. B. A., Renitta, R. E., Kasipandian, K., Krithika Shree, S., Rajalakshmi, D., Shobana, N., Dhiva, S., Abirami, S.,

- Visvanathan, S., Mohanty, B. K., Sabesan, G. S., & Chinni, S. V. (2023). Scaffold Using Chitosan, Agarose, Cellulose, Dextran and Protein for Tissue Engineering—A Review. *Polymers*, *15*(6), 1525. <https://doi.org/10.3390/polym15061525>
- Saravanan, S., Leena, R. S., & Selvamurugan, N. (2016). Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, *93*, 1354–1365. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.112>
- Shehada, S., Jasarevic, M., Jarkas, S., Haddad, A., Al-Rashid, F., Thielmann, M., Koch, A., Pizanis, N., Kamler, M., Ruhparwar, A., & Schmack, B. (2023). Mechanical Circulatory Support Using Impella 5.5 for Patients Presented with Ischemic Heart Disease and Severely Impaired Left Ventricular Function Undergoing Coronary Artery Bypass Surgery: A Three-Year Single Centre Experience. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, *42*(4), S406. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2023.02.1051>
- Silvestro, I., Sergi, R., Scotto D’Abusco, A., Mariano, A., Martinelli, A., Piozzi, A., & Francolini, I. (2021). Chitosan scaffolds with enhanced mechanical strength and elastic response by combination of freeze gelation, photo-crosslinking and freeze-drying. *Carbohydrate Polymers*, *267*, 118156. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118156>
- Snyder, Y., & Jana, S. (2023). Strategies for development of synthetic heart valve tissue engineering scaffolds. *Progress in Materials Science*, *139*, 101173. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2023.101173>
- 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)
- Song, J. E., Tian, J., Kook, Y. J., Thangavelu, M., Choi, J. H., & Khang, G. (2020). A BMSCs-laden quercetin/duck’s feet collagen/hydroxyapatite sponge for



- enhanced bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 108(3), 784–794. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36857>
- Stapleton, L., Zhu, Y., Woo, Y.-P. J., & Appel, E. (2020). Engineered biomaterials for heart disease. *Current Opinion in Biotechnology*, 66, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.08.008>
- Sthijns, M. M. J. P. E., van Blitterswijk, C. A., & LaPointe, V. L. S. (2018). Redox regulation in regenerative medicine and tissue engineering: The paradox of oxygen. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. <https://doi.org/10.1002/term.2730>
- Strauch, K. A., & Robbins, M. R. (2023). Restorative Treatment in a Patient with Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Ischemic Heart Disease, and Arrhythmia. *Dental Clinics of North America*, 67(3), 427–430. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2023.02.011>
- 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>
- Suárez Cunza, S., Alfaro Pillihuaman, E., & Ramírez Roca, E. G. (2021). ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, POLIFENOLES Y FLAVONOIDES DE Coffea arabica de CINCO REGIONES PERUANAS. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 86(4), 343–354. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v86i4.307>
- Sukriti, S., Tauseef, M., Yazbeck, P., & Mehta, D. (2014). Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Pulmonary Circulation*, 4(4), 535–551. <https://doi.org/10.1086/677356>
- Tammar, S., Salem, N., Wannas, W. A., Limam, H., Bourgou, S., Fares, N., Dakhlaoui, S., Hammami, M., Khammassi, S., Re, G. Del, Hessini, K., & Msaada, K. (2021). Chemometric profiling and bioactivity of verbena (*Aloysia citrodora*) methanolic extract from four localities in Tunisia. *Foods*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/foods10122912>

- Telichowska, A., Kobus-Cisowska, J., Ligaj, M., Stuper-Szablewska, K., Szymanowska, D., Tichoniuk, M., & Szulc, P. (2020). Polyphenol content and antioxidant activities of *Prunus padus* L. and *Prunus serotina* L. leaves: Electrochemical and spectrophotometric approach and their antimicrobial properties. *Open Chemistry*, *18*(1), 1125–1135. <https://doi.org/10.1515/chem-2020-0121>
- Telichowska, A., Kobus-cisowska, J., & Szulc, P. (2020). Phytopharmacological possibilities of bird cherry *Prunus padus* L. and *Prunus serotina* L. species and their bioactive phytochemicals. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 7, pp. 1–21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12071966>
- Tonelli, F. M. P., de Cássia Oliveira Paiva, N., de Medeiros, R. V. B., Pinto, M. C. X., Tonelli, F. C. P., & Resende, R. R. (2017). Tissue Engineering. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 315–324). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63660-7.00012-7>
- Tyagi, N., Gambhir, K., Kumar, S., Gangenahalli, G., & Verma, Y. K. (2021). Interplay of reactive oxygen species (ROS) and tissue engineering: a review on clinical aspects of ROS-responsive biomaterials. In *Journal of Materials Science* (Vol. 56, Issue 30, pp. 16790–16823). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10853-021-06338-7>
- Unalan, I., Fuggerer, T., Slavik, B., Buettner, A., & Boccaccini, A. R. (2021). Antibacterial and antioxidant activity of cinnamon essential oil-laden 45S5 bioactive glass/soy protein composite scaffolds for the treatment of bone infections and oxidative stress. *Materials Science and Engineering: C*, *128*, 112320. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112320>
- Valdez, L., Gutiérrez, Y., García, V., & Nieto, O. (2022). Characterization of the Extractive Process by Maceration by Means of a Fractional Factorial Design in *Nephelium Lappaceum* L. *Revista Cubana de Farmacia*, *55*(3), 11–27.
- van der Valk, D. C., Fomina, A., Uiterwijk, M., Hooijmans, C. R., Akiva, A., Kluin, J., Bouten, C. V. C., & Smits, A. I. P. M. (2023). Calcification in Pulmonary Heart

Valve Tissue Engineering. *JACC: Basic to Translational Science*, 8(5), 572–591.  
<https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2022.09.009>

- Wahyuni, H., Diantini, A., Ghozali, M., Subarnas, A., Julaeha, E., Amalia, R., & Sahidin, I. (2021). Phytochemical Screening, Toxicity Activity and Antioxidant Capacity of Ethanolic Extract of *Etlingera alba* Rhizome. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 24(7), 807–814. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2021.807.814>
- Winkler, J., Abisoye-Ogunniyan, A., Metcalf, K. J., & Werb, Z. (2020). Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. *Nature Communications*, 11(1), 5120. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18794-x>
- Xiong, F., Wei, S., Sheng, H., Han, X., Jiang, W., Zhang, Z., Li, B., Xuan, H., Xue, Y., & Yuan, H. (2022). In situ polydopamine functionalized poly-L-lactic acid nanofibers with near-infrared-triggered antibacterial and reactive oxygen species scavenging capability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 201, 338–350. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.024>
- 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., Liu, D., Qin, C., & Shi, Y. (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>
- Zheng, X., Zhang, P., Fu, Z., Meng, S., Dai, L., & Yang, H. (2021). Applications of nanomaterials in tissue engineering. *RSC Advances*, 11(31), 19041–19058. <https://doi.org/10.1039/D1RA01849C>
- 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, 160–179. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.01.023>

## ANEXOS

### Anexo A. Permiso de recolección de material vegetal sin fines de lucro.



#### PRONUNCIAMIENTO FAVORABLE No. MAATE-ARSFC-2023-3272

Sr. **GAVILANES SUAREZ JONATHAN ANDRE,**

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 **EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE ALOYSIA CITRODORA CEDRON Y PRUNUS SEROTINA CAPULI EN ADNAMIOS BIOLÓGICOS**, 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,

VEINTIMILLA YANEZ DAVID ALEJANDRO

**DIRECCIÓN DE BIODIVERSIDAD**

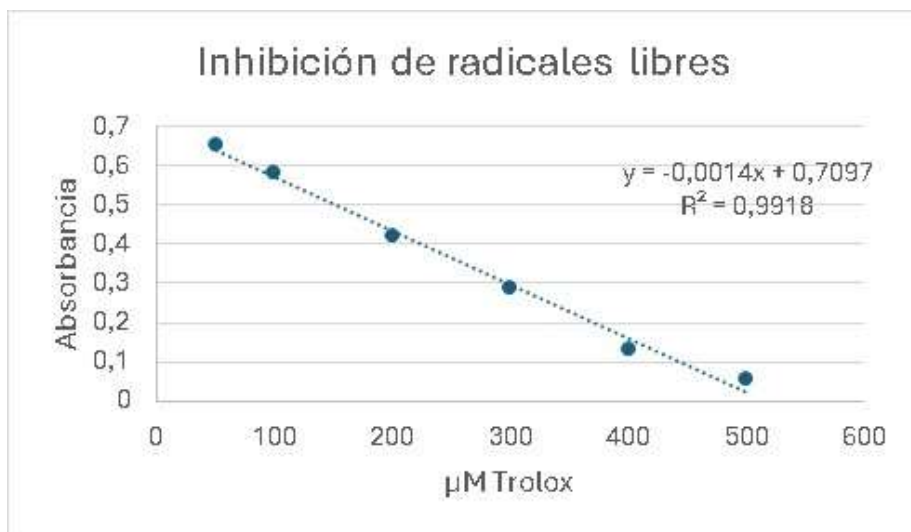
## Anexo B. Extracción de compuestos bioactivos



**Figura 11** Proceso de extracción de compuestos bioactivos

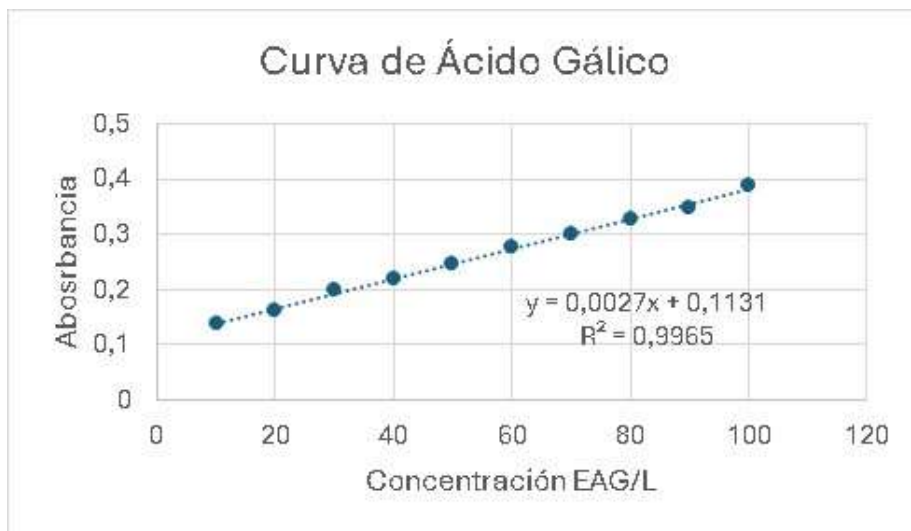
A. Maceración en etanol al 70%. B filtración de la matriz vegetal. C. recuperación de solventes.  
Elaboración propia

### Anexo C. Curvas de calibración



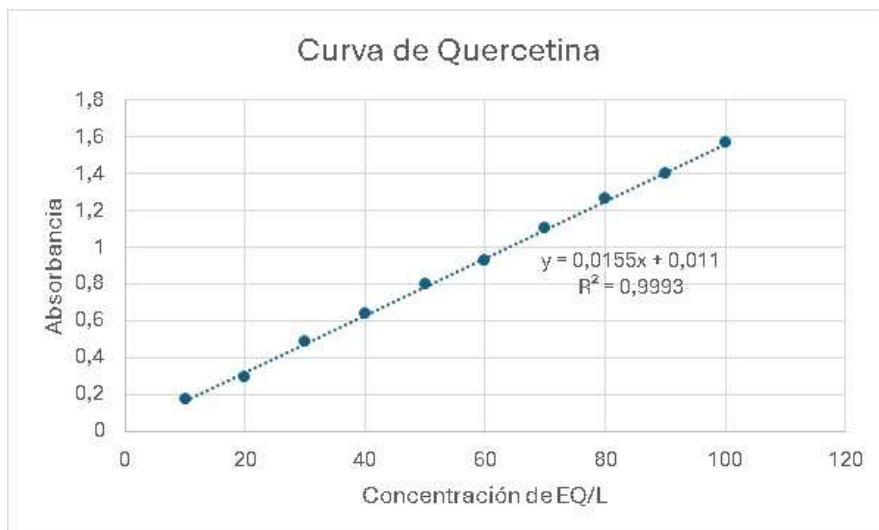
**Figura 12** Curva de calibración de Trolox para cuantificar la capacidad antioxidante

Elaboración propia



**Figura 13** Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales presentes

Elaboración propia



**Figura 14** Curva de calibración de quercetina para la cuantificación de flavonoides totales presentes

Elaboración propia

## Anexo D. Elaboración de andamios biológicos

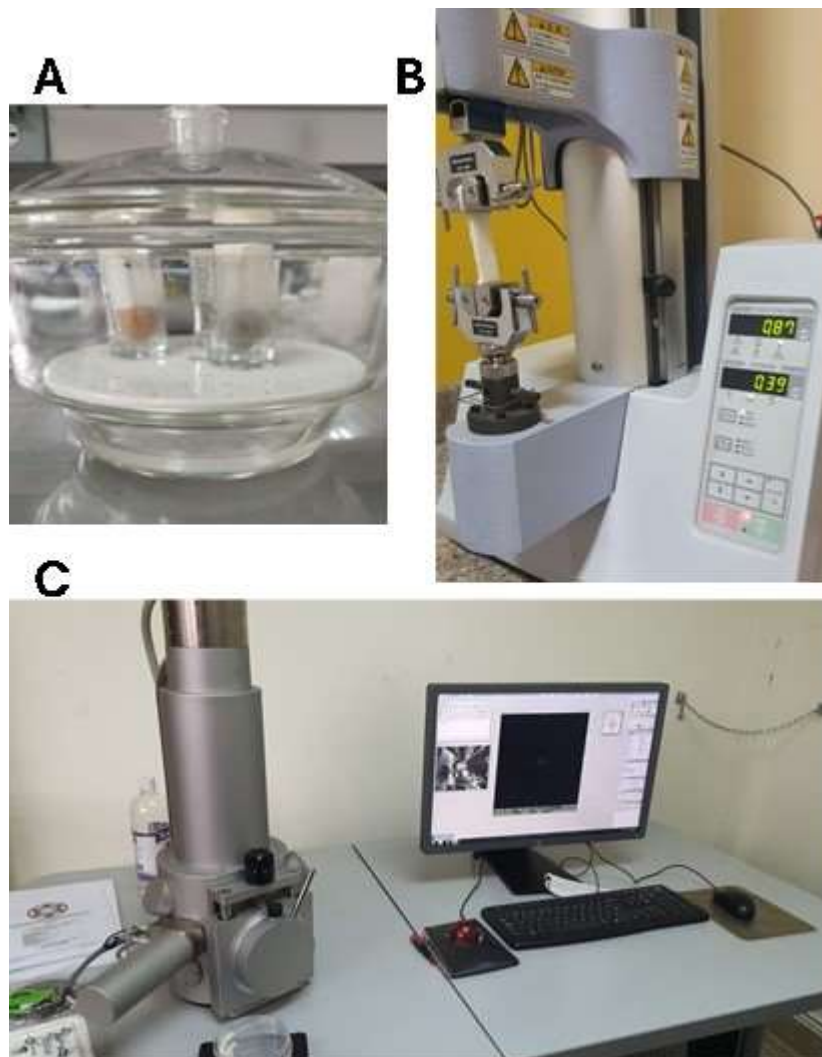


**Figura 15** Elaboración de andamios biológicos.

*A) Pesaje de biopolímeros. B) Preparación de soluciones de biopolímeros C) Ultracongelación.  
D) liofilización*



Anexo E. Evaluación de las propiedades físicas y morfológicas de los Abs



**Figura 16** Evaluación de las propiedades físicas y morfológicas de los ABs

*A) Evaluación de permeabilidad. B) Evaluación de propiedades mecánicas. C) Evaluación morfológica mediante SEM.*

## Anexo F. Tablas de las propiedades físicas y morfológicas

**Tabla 8.** *Datos obtenidos de las pruebas mecánicas realizada por la máquina universal*

Tipo de Andamio	Replicas	Esfuerzo máximo (MPa)	Rotura al desplazamiento (mm)	Rotura al esfuerzo (MPa)	Deformación (%)
Andamio control	<b>R1</b>	6,8325	1,36267	0,13679	3,07114
	<b>R2</b>	5,485	0,978	0,14515	2,85
	<b>R3</b>	7,495	1,14	0,2333	3,08
	<b>Promedio</b>	6,6041666	1,160223333	0,1717466	3,00038
	<b>SD</b>	1,02426905	0,193130758	0,05347038	0,130308224
Andamio con extracto	<b>R1</b>	6,47250	0,97833	0,2404	2,5117
	<b>R2</b>	6,8075	0,95933	0,17141	2,2572
	<b>R3</b>	8,6725	1,50233	0,25306	3,67319
	<b>Promedio</b>	7,31750	1,14666	0,22162	2,81403
	<b>SD</b>	1,1853586	0,308162836	0,04394432	0,754857266

**Tabla 9.** *Datos obtenidos del ensayo de permeabilidad al vapor de agua*

Tiempo (h)	Tipo De andamio					
	Andamio control (g)			Andamio con extracto (g)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b>0</b>	21,1164	21,177	21,1138	21.1228	21.1507	21.1902
<b>1</b>	21,1315	21,1985	21,1306	21.1401	21.1685	21.2088
<b>2</b>	21.1341	21.2017	21.1326	21.1439	21.1725	21.2118
<b>3</b>	21.1396	21.207	21.138	21.1531	21.174	21.2159

<b>4</b>	21.1448	21.2123	21.144	21.159	21.1779	21.2228
<b>5</b>	21.1474	21.2151	21.1479	21.1636	21.1809	21.227
<b>6</b>	21.1527	21.2225	21.1533	21.170	21.1877	21.235
<b>7</b>	21.1577	21.23	21.1596	21.1797	21.1906	21.1401
<b>8</b>	21.1608	21.235	21.1632	21.1853	21.1959	21.2459
<b>WVTR</b>	6.9792	6.1170	7.765	9.8243	7.1049	8.7554
<b>Promedio</b>		7.9538			8.5616	
<b>SD</b>		1.081			1.37	
<b>WVTR 24h</b>		190.8916			205.4788	
<b>SD</b>		25.9512			32.8805	
<b>WVP</b>	1.578	2.0572	1.7522	3.7154	2.687	3.3112
<b>Promedio</b>		1.795			3.238	
<b>SD</b>		0.244			0.518	

**Anexo G. Pruebas estadísticas realizadas**

**Tabla 10.** *Tabla ANOVA y prueba de rangos múltiples para la resistencia a la tracción*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4,45051	1	4,45051	8,39	0,0443
Intra grupos	2,12229	4	0,530572		
Total (Corr.)	6,5728	5			

**Prueba de rangos múltiples**

**Método: 95,0 porcentaje LSD**

<i>Tipo de Andamio</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Andamio Control	3	5,89127	X
Andamio con Extracto	3	7,61377	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Andamio Control - Andamio con Extracto	*	-1,7225	1,65127

\* indica una diferencia significativa.

**Tabla 11.** *Tabla ANOVA y prueba de rangos múltiples para el alargamiento a la rotura*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<i>Entre grupos</i>	<i>0,00027581</i>	<i>1</i>	<i>0,00027581</i>	<i>0,00</i>	<i>0,9516</i>
<i>Intra grupos</i>	<i>0,264528</i>	<i>4</i>	<i>0,0661319</i>		
<i>Total (Corr.)</i>	<i>0,264803</i>	<i>5</i>			

*Método: 95,0 porcentaje LSD*

<i>Tipo de Andamio</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
<i>Andamio con extracto</i>	<i>3</i>	<i>1,14666</i>	<i>X</i>
<i>Andamio control</i>	<i>3</i>	<i>1,16022</i>	<i>X</i>

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>

<i>Andamio con extracto - Andamio control</i>		-0,01356	0,582976
---	--	----------	----------

\* indica una diferencia significativa.

**Tabla 12.** Tabla ANOVA y prueba de rangos múltiples para la distancia a la rotura

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,00373152	1	0,00373152	1,56	0,2800
Intra grupos	0,00958037	4	0,00239509		
Total (Corr.)	0,0133119	5			

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tipo de Andamio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Andamio control	3	0,171747	X
Andamio con Extracto	3	0,221623	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
-----------	------	------------	-------------

Andamio con Extracto - Andamio control		0,0498767	0,110945
--	--	-----------	----------

\* indica una diferencia significativa.

**Tabla 13.** *Tabla ANOVA y prueba de rangos múltiples para la tasa de transmisión de vapor de agua*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	319,181	1	319,181	0,36	0,5789
Intra grupos	3509,19	4	877,298		
Total (Corr.)	3828,37	5			

Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Andamio control	3	190,892	X
Andamio con extracto	3	205,479	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Andamio con extracto - Andamio control		14,5872	67,1457

\* indica una diferencia significativa.

**Tabla 14.** *Tabla ANOVA y comparación de rangos múltiples para la WVP*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,00000312388	1	0,00000312388	19,05	0,0120
Intra grupos	6,55989E-7	4	1,63997E-7		
Total (Corr.)	0,00000377987	5			

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tipo de Andamio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Andamio control	3	0,00179481	X
Andamio con Extracto	3	0,00323793	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Andamio con Extracto - Andamio control	*	0,00144312	0,000918043



\* indica una diferencia significativa.

**Tabla 15.** *Tabla ANOVA y comparación de rangos múltiples para la actividad antioxidante de ABs*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1923,01	1	1923,01	269,86	0,0000
Intra grupos	71,2598	10	7,12598		
Total (Corr.)	1994,27	11			

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tipo de andamio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Andamio control	6	44,8502	X
Andamio con extracto	6	70,1682	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Andamio con extracto - Andamio control	*	25,318	3,43404

\* Indica una diferencia significativa

```

Kruskal-wallis rank sum test
data: Inhi by trat
kruskal-wallis chi-squared = 31.325, df = 11, p-value = 0.0009779

```

**Figura 17** Resultado del análisis de la prueba estadística *Kruskal-Wallis*

La prueba preliminar arroja que los valores no siguen una tendencia normal, por lo que se aplicó la prueba estadística *Kruskal-Wallis* equivalente a un ANOVA para datos normales. El *p. value* es inferior a 0.05, por lo que existen diferencias significativa entre los tratamientos evaluados

**Tabla 16.** Prueba de comparaciones múltiples de Wilcoxon

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
B	0.484	-							
C	0.743	0.264	-						
D	0.521	0.560	0.556	-					
E	0.688	0.523	0.612	0.341	-				
F	0.367	0.642	0.528	0.511		-			
G	0.591	0.543	0.594	0.489	0.687	0.321	-		
H	0.455	0.684	0.542	0.531	0.453	0.673	0.457	-	
I	0.487	0.653	0.489	0.599	0.521	0.591	0.598	0.534	-

Nota: la prueba de comparaciones múltiples de Wilcoxon demostró que los mejores tratamientos son el C debido a su alto porcentaje de actividad antioxidante. Este tiene alta relación con el tratamiento A en relación 9:1 para capulí:cedrón y con el tratamiento E en relación 5:5.

## Anexo H. Resolución UTA CONIN

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CONSEJO DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN

Resolución Nro. UTA-CONIN-2022-0095-R

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**

El Consejo de Investigación e Innovación en sesión ordinaria efectuada el miércoles 09 de marzo de 2022 mediante conferencia virtual utilizando la plataforma tecnológica zoom, visto y analizado el Memorando UTA-DIDE-2022-0540-M del 02 de marzo de 2022 suscrito por la Dra. Lizette Elena Leiva Suero, directora de Investigación y Desarrollo, quien en atención al Memorando UTA-FCIAB-2022-0112-M del 19 de enero de 2022, suscrito por la Dra. Mirari Arancibia Soria, decana de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología; SOLICITA el aval al proyecto "**Screening fitoquímico de especies forestales maderables de bosques montanos de la provincia de Chimborazo**" en base al CONVENIO ESPECÍFICO DE COOPERACIÓN INTERINSTITUCIONAL ENTRE LA ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO Y LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO aprobado con Resolución 1211-CU-P-2021 del 23 de noviembre de 2021 para la ejecución del proyecto en referencia del 14 de diciembre de 2021, que indica que el Convenio tiene por objeto la Cooperación Interinstitucional entre la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH) y la Universidad Técnica de Ambato (UTA) para la ejecución del Proyecto mencionado; con una duración de 2 años (24 meses) de acuerdo a lo estipulado en la cláusula tercera, VIGENCIA, del CONVENIO PARA EL DESARROLLO DEL PROYECTO. Teniendo en consideración que las Unidades requirentes son los entes responsables de la veracidad de la información remitida; y, en uso de las atribuciones contempladas en el literal n), Art. 64 del Estatuto de la Universidad Técnica de Ambato y demás normativa legal vigente aplicable para el efecto:

**RESUELVE**

1. Otorgar el aval correspondiente al proyecto "**Screening fitoquímico de especies forestales maderables de bosques montanos de la provincia de Chimborazo**" de cooperación interinstitucional entre la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y la Universidad Técnica de Ambato, con una duración de 2 años (24 meses) a partir del 14 de diciembre de 2021.
2. Designar a la PhD. Lorena De Los Ángeles Núñez Villacís, docente de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, como INVESTIGADOR RESPONSABLE UTA del proyecto de investigación en referencia.
3. Disponer a la Unidad Operativa de Investigación de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, realizar el seguimiento de esta investigación y reportar a la Dirección de Investigación y Desarrollo, según normativa vigente que la DIDE tiene para el efecto.
4. Disponer a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología brinde las facilidades para la ejecución del proyecto de investigación.

Firmado digitalmente por:  
EISA DE LOS ANGELES  
HERNANDEZ CHERREZ

Dra. Elsa de los Ángeles Hernández Chérrez  
**PRESIDENTE CONSEJO DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN**

Anexos: UTA-DIDE-2022-0597-M AVAL PROYECTO PHD. LORENA NÚÑEZ

Copia: Dra. Lizette Leiva  
**Directora de Investigación y Desarrollo**

Dr. Santiago Casado  
**Coordinador Unidad Operativa de Investigación FCIAB**

SR

Resolución Nro. UTA-CONIN-2022-0095-R

Página 111