

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y
MATERIALES

**Preparación, Caracterización y Estudios *in vivo* de
Nanofibras Electrohiladas de Poli(Ácido Láctico) y
Extracto de *Rumex hymenosepalus* con Potencial Uso
en la Ingeniería de Tejidos.**

TESIS

Que para obtener el Grado de:

Maestro en Ciencia de Materiales

Presenta:

CRISTIAN ENRIQUE TORRES SALCIDO

Hermosillo, Sonora

Noviembre 2021

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**

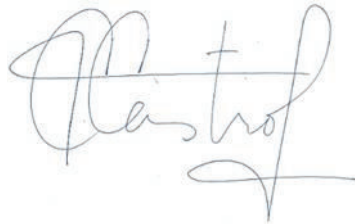


Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual de la Universidad de Sonora y del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del director de tesis, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización del Director de la Tesis.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al DIPM, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

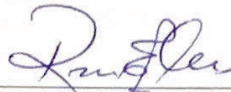
A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Castro', with a stylized flourish at the end.

Dra. Teresa del Castillo Castro

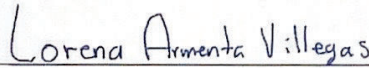
Jefe del Departamento

VOTOS APROBATORIOS

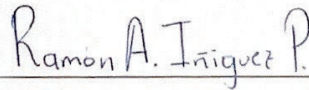
Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de maestría de CRISTIAN ENRIQUE TORRES SALCIDO han determinado que el trabajo cumple satisfactoriamente como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencia de Materiales otorgado por la Universidad de Sonora.



Dra. Rosa Elena Navarro Gautrín
(Presidente)



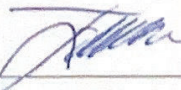
Dra. Lorena Armenta Villegas
(Secretaria)



Dr. Ramón Alfonso Íñiguez Palomares
(Sinodal)



Dr. Luis Fernando López Soto
(Sinodal)



Dra. Elizabeth Carvajal Millán
(Sinodal externo)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Lorena Armenta Villegas del Dpto. de Ciencias Químico-Biológicas, por permitirme desarrollar este proyecto de investigación, por sus consejos y su disponibilidad para guiarnos. A la Dra. Rosa Elena Navarro, a la Dra. Mónica Castillo Ortega, por recibirme en sus laboratorios, por su tiempo y sus consejos. Al Dr. Alex Salazar, por su disponibilidad, el apoyo recibido y sus consejos en el análisis de actividad antioxidante. Al Dr. Luis Fernando López Soto, que forma parte del Dpto. de Ciencias de Medicina y de la Salud, por recibirme en su laboratorio, su apoyo y asesoramiento con el estudio *in vivo*. A la Dra. Elizabeth Carvajal Millán del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. y al Dr. Ramón Alfonso Íñiguez Palomares por su tiempo y sus consejos.

Al Departamento de Investigación de Polímeros y Materiales, por brindar las instalaciones necesarias para el desarrollo de este proyecto, y brindarme mis estudios de posgrado. A la Universidad de Sonora, por ser mi segunda casa y por darme las herramientas para forjarme como profesionista en licenciatura y maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca que me fue otorgada durante mis estudios de posgrado.

Agradezco especialmente a mi familia, por apoyarme incondicionalmente en cada etapa y proyecto de mi vida y al I.Q. Ariel Aguirre, por ser una persona importante en mi formación, por escucharme, brindarme sus consejos y su apoyo en cada uno de mis proyectos personales.

A mis compañeros de posgrado por siempre estar cuando necesité algún consejo, por sus observaciones y por la amistad tan sólida que se ha formado.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABLAS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	3
OBJETIVOS	4
1.1 Objetivo general	4
1.2 Objetivos particulares	4
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	5
2.1 Ingeniería de Tejidos	5
2.2 Andamios	6
2.2.1 Materiales para la fabricación de andamios con aplicación en la ingeniería de tejidos	8
2.3 Poli (ácido láctico) (PLA)	8
2.4 Técnica de Electrohilado	10
2.4.1 Cono de Taylor	11
2.4.2 Variables que afectan el electrohilado.....	12
2.4.3 Parámetros de Procesamiento en la Técnica de Electrohilado	13
2.4.4 Aplicaciones de fibras electrohiladas en la ingeniería de tejidos	15
2.5 Ingeniería de Tejidos de la Piel	17
2.5.1 Proceso de cicatrización de las heridas cutáneas.....	18
2.6 Rol de las Plantas en Biomedicina	20

2.6.1 Materiales Poliméricos Combinados con Extractos Naturales.....	21
2.7 Extractos Naturales.....	22
2.7.1 Género <i>Rumex</i>	23
2.7.2 <i>Rumex hymenosepalus</i>	24
CAPÍTULO 3. METOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	26
3.1 Materiales.....	26
3.2 Métodos.....	26
3.2.1 Obtención del Extracto de <i>R. hymenosepalus</i>	26
3.2.2 Preparación de Fibras Electrohiladas de PLA y PLA Cargadas con Extracto de <i>R. hymenosepalus</i>	27
3.3 Caracterización.....	27
3.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	27
3.3.2 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).....	28
3.3.3 Resonancia Magnética Nuclear de Protón (¹ H RMN).....	28
3.3.4 Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-vis).....	28
3.3.5 Análisis Termogravimétrico (ATG).....	29
3.3.6 Ángulo de Contacto.....	29
3.3.7 Determinación de la Eficiencia de Encapsulación del Extracto de <i>R. hymenosepalus</i> en las Fibras Electrohiladas de PLA.....	29
3.3.8 Estudio del Perfil de Liberación del Extracto de <i>R. hymenosepalus</i>	30
3.3.9 Evaluación de la Actividad Antioxidante de las Fibras de PLA Cargadas con el Extracto de <i>R. hymenosepalus</i>	31
3.3.10 Evaluación <i>in vivo</i> de las Fibras Electrohiladas de PLA y PLA Cargadas con el Extracto de <i>R. hymenosepalus</i>	32
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	34
4.1 Obtención del Extracto de <i>R. hymenosepalus</i>.....	34

4.2 Preparación de Fibras Electrohiladas de PLA y PLA Cargadas con Extracto de <i>R. hymenosepalus</i>.	36
4.3 Caracterización	38
4.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	38
4.3.2 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).....	43
4.3.3 Análisis Termogravimétrico (ATG).	45
4.3.4 Ángulo de contacto.....	47
4.3.5 Resonancia magnética nuclear de protón (¹ H NMR).	48
4.3.6 Determinación de la eficiencia de encapsulación del extracto de <i>R. hymenosepalus</i> en las fibras de PLA.	50
4.3.7 Estudio del perfil de liberación del extracto de <i>R. hymenosepalus</i> a partir de las fibras de PLA.....	52
4.3.8 Evaluación de la Actividad Antioxidante de las Fibras de PLA Cargadas con el Extracto de <i>R. hymenosepalus</i>	55
4.3.9 Evaluación <i>in vivo</i> del efecto de curación de heridas de las Fibras Electrohiladas de PLA y PLA Cargadas con el Extracto de <i>R. hymenosepalus</i>	56
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	60
PERSPECTIVAS	61
REFERENCIAS	62
ANEXO	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura molecular de PLA (Lanza y col., 2017).....	8
Figura 2.	Esquema de polimerización de copolímeros de ácido L-láctico y D-Láctico (Cheng y col., 2009).....	9
Figura 3.	Esquema de un sistema típico de electrohilado (Li y Bou-Akl, 2016).....	11
Figura 4.	Diferentes fases de la cicatrización normal de heridas (Kim y col., 2019).	19
Figura 5.	Utilización de extractos naturales encapsulados para aplicaciones biológicas (Locilento y col., 2019).....	21
Figura 6.	Estructuras químicas de algunos metabolitos aislados de las especies de <i>Rumex</i> (Mishra y col., 2018).....	23
Figura 7.	Raíces secas y extracto de <i>R. hymenosepalus</i> (Rodríguez-León y col., 2013).....	25
Figura 8.	Síntesis de AgNP's por el poder reductor de los compuestos activos de <i>R. hymenosepalus</i> y estabilización de las nanopartículas (Rodríguez-León y col., 2018).....	25
Figura 9.	Extracto sólido de <i>R. hymenosepalus</i> . A) muestra de sólido obtenido una vez eliminado el solvente y B) muestra pulverizada.	34
Figura 10.	Espectro de absorción UV-vis del extracto de <i>R. hymenosepalus</i>	35
Figura 11.	Representación de las soluciones poliméricas de A) PLA y B) PLA/ERh en DCM/DMF (70:30 v/v).....	36
Figura 12.	Fotografías de fibras electrohiladas de A) PLA; B) observación al MO, 4x; C) PLA con extracto de <i>R. hymenosepalus</i> ; D) observación al MO, 10x.....	37
Figura 13.	Imágenes de MEB de fibras electrohiladas de PLA al 14% p/v en una solución de DCM/DMF (70:30).....	40
Figura 14.	Figura 14. Histogramas del comportamiento del diámetro de fibras de PLA, PLA/ERh5 y PLA/ERh10.....	42
Figura 15	Comparación de los espectros de infrarrojo del polvo de <i>R. hymenosepalus</i> :	

	A) extracto obtenido en este estudio y B) el utilizado por Rodríguez-León y col., 2013.....	43
Figura 16.	Espectros de infrarrojo de fibras electrohiladas de PLA, fibras electrohiladas de PLA cargadas con extracto de <i>R. hymenosepalus</i> y el extracto de <i>R. hymenosepalus</i> en polvo.....	45
Figura 17.	Análisis termogravimétrico de fibras de PLA, PLA cargadas con el extracto, en un 5 y un 10% en peso, y el extracto en polvo de <i>R. hymenosepalus</i>	46
Figura 18.	Curva de la derivada de pérdida de masa de fibras de PLA, PLA cargadas con el extracto en un 5 y un 10% en peso, y el extracto en polvo de <i>R. hymenosepalus</i>	47
Figura 19.	Ángulo de contacto de fibras de: A) PLA, B) PLA/ERh5, C) PLA/ERh10....	48
Figura 20.	Espectro de ¹ H RMN del extracto de <i>R. hymenosepalus</i> en DMSO- <i>d</i> ₆ a 400 MHz, (Bruker Advance 400).....	50
Figura 21.	Curva de calibración del extracto de <i>R. hymenosepalus</i> en una mezcla de DCM/EtOH (50:50).....	51
Figura 22.	Determinación de la eficiencia de encapsulación del extracto de <i>R. hymenosepalus</i> en fibras de PLA posterior al proceso de electrohilado en DCM/EtOH (50:50).....	52
Figura 23.	Curva de calibración del extracto de <i>R. hymenosepalus</i> en una solución tampón de PBS, pH = 7.4.....	53
Figura 24.	Liberación del extracto de <i>R. hymenosepalus</i> a partir de las fibras de PLA en una solución tampón de PBS, pH = 7.4 a 37°C.....	54
Figura 25.	Fotografías de la evolución de curación de heridas de la piel de ratas Wistar..	57
Figura 26.	Evaluación de la curación de heridas en piel de ratas Wistar.....	58
Figura 27.	Estructura molecular de las catequinas encontradas en ERh (Rodríguez-León y col., 2018).....	69
Figura 28.	Estructura molecular de estilbeno glucósido encontrado en ERh (Rodríguez-León y col., 2018).....	70

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Relación general entre los parámetros del electrohilado en la morfología de las fibras (Li y Bou-Akl, 2016).....	12
Tabla 2.	Aplicaciones de fibras electrohiladas en la ingeniería de tejidos por distintos métodos de síntesis (Li y Bou-Akl, 2016).....	16
Tabla 3.	Parámetros utilizados en el sistema de electrohilado.....	37
Tabla 4.	Diámetros promedio de fibras electrohiladas de PLA al 14% p/v y PLA al 14% p/v adicionadas con el extracto de <i>R. hymenosepalus</i> en un 5 y 10% en peso.....	41
Tabla 5.	Mediciones de ángulo de contacto.	48
Tabla 6.	Parámetros estadísticos de los perfiles de liberación <i>in vitro</i> del modelo Korsmeyer-Peppas.....	55
Tabla 7.	Desplazamientos químicos de ^1H RMN para el extracto de <i>R. hymenosepalus</i> comparado con los reportados en la literatura.....	67

RESUMEN

En la ingeniería de tejidos se han buscado alternativas de síntesis de materiales que permitan resolver problemas causados por enfermedad o daño de diversos tejidos, para llevar a cabo su restauración. A estos materiales, se pueden incorporar compuestos bioactivos como fármacos, antimicrobianos o antioxidantes que ayuden a mejorar la biocompatibilidad del material para lograr un proceso de recuperación exitoso del tejido.

La técnica de electrohilado es una de las técnicas más utilizadas en la ingeniería de tejidos, siendo un método sencillo y versátil con capacidad de generar de micro y nanoestructuras fibrosas con alta área superficial a las cuales se pueden incorporar componentes orgánicos o inorgánicos, permitiéndoles imitar la parte fibrilar de la matriz extracelular (MEC) de los tejidos del cuerpo, al utilizar materiales biocompatibles se da lugar a su posible aplicación a nivel biológico.

En el presente trabajo se obtuvieron fibras de poli(ácido láctico) (PLA) adicionadas con extracto de *Rumex hymenosepalus* (ERh) mediante la técnica de electrohilado. A partir de las raíces de la planta *R. hymenosepalus* se obtuvo el extracto para posteriormente ser encapsulado en las fibras, las cuales se caracterizaron morfológicamente mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), se evaluaron sus propiedades térmicas por análisis termogravimétrico (ATG), y mediante la técnica de infrarrojo (FTIR-ATR) se evidenció la presencia de ambos componentes en el material. Se analizó la liberación del extracto previamente encapsulado en la matriz polimérica y sus efectos a nivel biológico, tanto capacidad antioxidante como estudios *in vivo*, para poder predecir su comportamiento y aplicabilidad en la ingeniería de tejidos.

ABSTRACT

In tissue engineering, alternatives have been sought for the synthesis of materials that allow solving problems caused by disease or damage to various tissues, in order to carry out their restoration. To these materials, bioactive compounds such as drugs, antimicrobials or antioxidants can be incorporated that help improve the biocompatibility of the material to achieve a successful tissue recovery process.

The electrospinning technique is one of the most used techniques in tissue engineering, being a simple and versatile method with the capacity to generate fibrous micro and nanostructures with high surface area to which organic or inorganic components can be incorporated, allowing them to imitate the fibrillar part of the extracellular matrix (ECM) of the body's tissues, when using biocompatible materials, their possible application at the biological level is possible.

In this work, poly (lactic acid) (PLA) fibers added with *Rumex hymenosepalus* (ERh) extract were obtained by electrospinning technique. From the roots of *R. hymenosepalus* plant, the extract was obtained to later be encapsulated in the fibers, which were morphologically characterized by scanning electron microscopy (SEM), their thermal properties were evaluated by thermogravimetric analysis (TGA), and infrared technique (FTIR-ATR) was used to evidence the presence of both components in the material. The release of the extract previously encapsulated in the polymeric matrix and its effects at the biological level, antioxidant capacity and *in vivo* studies, were analyzed to predict its behavior and applicability in tissue engineering.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

En años recientes se ha investigado la obtención de materiales que permitan resolver problemáticas del sector salud. Es aquí donde la ingeniería de tejidos juega un papel relevante como una herramienta biomédica y tecnológica que busca restaurar, mantener y regenerar el tejido humano, recuperando así, su estructura y función biológica (Granados y col., 2017).

Existen una gran variedad de técnicas para la fabricación de este tipo de materiales, donde se ha destacado el electrohilado, siendo una técnica de relativamente bajo costo en la síntesis y de fácil procesamiento, presentando algunas otras ventajas en las características de los andamios: un área superficial alta, diámetros y estructuras modificables, poros interconectados, flexibilidad mecánica, permite funcionalizar y encapsular varios agentes activos (Balusamy y col., 2020).

Se pueden generar nanofibras de diámetros que van desde unas cuantas micras hasta cientos de nanómetros, siendo un parteaguas para un gran número de aplicaciones en la ingeniería de tejidos. Es importante señalar que las nanofibras obtenidas forman una arquitectura semejante a la matriz extracelular de los tejidos, resultando ser una herramienta que promueve la adhesión y migración celular (Castillo-Ortega, 2015; Celebioglu y col., 2014; Ewaldz y Brettmann, 2019; Granados y col., 2017; Kabay y col., 2018).

Se han empleado una gran variedad de materias primas para la síntesis de nanofibras entre las cuales destacan polímeros naturales y sintéticos, tal es el caso del poli(ácido láctico) (PLA por sus siglas en inglés), el cual estructuralmente es un poliéster alifático extraído principalmente de residuos agroindustriales. Es un polímero que ofrece biocompatibilidad y ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos, debido a que al biodegradarse por hidrólisis del enlace éster da como resultado la generación de residuos de agua y CO₂. El PLA se puede disolver en un gran número de solventes no tóxicos y es fácil de procesar lo cual lo convierte en un excelente candidato para aplicaciones en la ingeniería de tejidos (Granados y col, 2017).

Adicional a la utilización de matrices poliméricas como andamios, en algunos estudios se les ha utilizado como sistema de liberación de fármacos, antimicrobianos y antioxidantes, así

mismo se ha buscado la oportunidad de encapsular algunos compuestos bioactivos en las fibras para ser estabilizados y a su vez tengan mayor biodisponibilidad por un periodo prolongado de tiempo (Castillo-Ortega y col., 2015; Kabay y col., 2018). Con base a lo anterior y tomando en cuenta que desde hace décadas se ha tenido interés en los agentes bioactivos de fuentes naturales como agentes terapéuticos para prevenir enfermedades relacionadas al estrés oxidativo y cáncer se ha obtenido una gran variedad de extractos en diversos solventes, sin embargo, se tiene la problemática de que muchos presentan tiempos de vida corta al estar expuestos a ambientes de exposición a luz solar y presencia de oxígeno. Por ello se ha intentado encapsular algunos agentes naturales con efectos terapéuticos tales como extracto de ajo y de uva, donde se ha encontrado que el proceso de electrohilado no afecta la capacidad antioxidante del extracto incorporado a la solución, por lo cual las membranas generadas además de funcionar como un sistema de liberación localizado de fármacos, ofrece la posibilidad de conservar las biomoléculas al encapsularlas, para ofrecer una mayor biodisponibilidad (Faki y col., 2019; Radusin y col., 2019; Celebioglu y Uyar, 2020).

El extracto de la planta *R. hymenosepalus* (ERh) ha sido de interés de estudio debido a que algunos miembros de su misma familia han presentado efectos biológicos, además de ser una de las especies de plantas que presentan el mayor contenido de antioxidantes naturales (Mishra y col., 2018; VanderJagt y col., 2002). Dicha planta es endémica del norte de México y el sur de EUA, y se pueden extraer estos compuestos a partir de sus raíces, de los cuales se han identificado mayoritariamente epicatequinas y taninos en su composición. Se ha utilizado como agente reductor para la fabricación de nanopartículas de plata, las cuales han demostrado que tienen capacidad de reducir hasta el 50% de glucosa sérica en modelos murinos en 9 días. También se ha demostrado que dichas nanopartículas presentan baja citotoxicidad atribuido al extracto como agente biocompatible de fuentes naturales que las estabiliza y que en conjunto actúan como agente microbicida de amplio espectro (Rodríguez-León y col., 2013; Virgen-Ortiz y col., 2015; Rodríguez-León y col., 2018).

Por lo mencionado anteriormente resulta interesante utilizar el ERh y combinarlo con técnicas de electrohilado para generar fibras de PLA y resulte en un material prometedor para futuras terapias en la ingeniería de tejidos, aprovechando la biocompatibilidad de ambos materiales provenientes de fuentes naturales, tanto como el soporte estructural que brinda la

matriz polimérica como los efectos bioactivos que puede proveer los componentes del extracto natural.

JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de materiales biocompatibles, no inmunogénicos con aplicaciones a nivel biológico son de gran importancia debido a que se pueden utilizar como alternativas terapéuticas para poder combatir algunas de las problemáticas que se presentan en el sector salud, tal como son las heridas en la piel. La ingeniería de tejidos aborda dicha problemática, brindando la posibilidad de sintetizar matrices poliméricas nanofibrosas con buenas propiedades mecánicas y que cumplan con los requerimientos de biocompatibilidad, ya que en años recientes ha sido relevante utilizar polímeros provenientes de origen natural, como el PLA, que al cumplir su vida útil se descomponga en productos inocuos y reabsorbibles por el organismo. Adicionalmente, ha sido útil incorporar en las fibras durante el proceso de electrohilado extractos naturales con diversos efectos biológicos, teniendo como resultado su encapsulación con aplicaciones como sistema de liberación controlada de compuestos bioactivos. Por ello se propone utilizar el ERh como uno de los componentes de fabricación de andamios, el cual ha demostrado su capacidad antioxidante e hipoglucemiante por sí solo, por lo que resulta prometedor combinar algunas metodologías como la técnica de electrohilado, relativamente sencilla y de bajo costo, que permite obtener matrices poliméricas para que actúen como vehículo y protector de componentes de origen natural para obtener alta biodisponibilidad, dando lugar a una alternativa terapéutica en la ingeniería de tejidos.

OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Preparar y caracterizar fibras electrohiladas de PLA cargadas con el extracto de *R. hymenosepalus* y evaluar *in vivo* su potencial terapéutico para su posible aplicación en la ingeniería de tejidos.

1.2 Objetivos particulares

1. Obtener el extracto etanólico de las raíces de *R. hymenosepalus* por maceración.
2. Encontrar las condiciones óptimas para la síntesis de las fibras de PLA/ERh por la técnica de electrohilado.
3. Caracterizar las fibras electrohiladas mediante las técnicas de MEB, ATG, FTIR-ATR.
4. Determinar el perfil de liberación del extracto mediante UV-vis.
5. Evaluar la capacidad antioxidante de las fibras sintetizadas y el extracto obtenido por DPPH.
6. Evaluar *in vivo* el efecto de curación en heridas de la piel de las fibras de PLA/ERh.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1 Ingeniería de Tejidos

El Instituto Nacional de Imagen y Bioingeniería (NIBIB, por sus siglas en inglés) define la ingeniería de tejidos como “Un área de rápido crecimiento que busca generar, reparar y/o reemplazar tejidos y órganos mediante el uso de combinaciones de células, biomateriales y/o moléculas biológicamente activas” (Lannutti y col., 2007). Este es un campo emergente y multidisciplinario que integra la ingeniería de los principios de la biología y medicina con la finalidad de restaurar o mejorar el funcionamiento de un tejido (Li y Bou-Akl, 2016).

Un componente clave de la ingeniería de tejidos es la utilización de andamios porosos y biodegradables para proveer soporte estructural a las células (Li y Bou-Akl, 2016). Lo más importante en la ingeniería de tejidos es la selección de un material apropiado para la producción de andamios que no sea rechazado por el sistema inmune una vez que es implantado. Por lo que resulta desafiante poder imitar el ambiente biológico, esto con la finalidad de promover la adhesión y proliferación celular (Zadeh y col., 2019).

Se han tratado de utilizar andamios biodegradables para mejorar la regeneración del tejido dándose el remplazo de este biomaterial sintético con la matriz extracelular (MEC) que van produciendo las propias células (Zadeh y col., 2019). La MEC cumple con funciones de carácter estructural para darle soporte a las células y promover un andamiaje específico para la proliferación y migración célula, también tiene funciones bioquímicas en el secuestro de factores de crecimiento y dar señales químicas específicas para la regulación celular, biológicamente la MEC presenta secuencias peptídicas que pueden interactuar con algunos receptores y llegar a activar una señalización intracelular.

Una de las técnicas para la obtención de este tipo de materiales es la técnica de electrohilado, que reúne algunas ventajas, como su fácil y bajo costo en la fabricación de fibras no tejidas que poseen tamaños que van desde unas cuantas micras hasta cientos de nanómetros y además permite incorporar uno o múltiples compuestos bioactivos en la misma matriz (Li y Bou-Akl 2016).

Otro de los principales retos de la ingeniería de tejidos es la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en las superficies del trasplante de un andamio. Las ERO se producen en el cuerpo humano de manera normal debido al metabolismo del oxígeno y es asociado con roles importantes en la señalización celular, procesos de cicatrización de heridas y respuestas inflamatorias. Las ERO son oxidadas y liberadas en forma de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), aniones superóxidos (O^{2-}) y radicales libres como, hidroxilos ($OH\cdot$) y peróxido ($R-COO\cdot$), los cuales poseen tiempos de vida corto, pero altamente reactivos en el ambiente celular (Zadeh y col., 2019).

Durante algunos estados de enfermedad como la inflamación, diabetes y cáncer, los niveles de ERO se ven incrementados considerablemente, causando daño en las estructuras celulares. Entonces, el uso de antioxidantes en combinación con los biopolímeros para la generación de andamios con aplicación en la ingeniería de tejidos resulta una estrategia prometedora para prevenir la producción excesiva de ERO, evitando el proceso de inflamación y eventualmente el rechazo del implante (Zadeh y col., 2019).

Recientemente, los andamios fibrosos han recibido atención debido a los diámetros y áreas superficiales logradas las cuales pueden llegar a imitar las estructuras fibrilares de la MEC de diversos tejidos. El colágeno tipo I y el tipo II tienen diámetros entre 90 y 600 nm. Al sintetizar fibras a base de biopolímeros pueden obtenerse esos diámetros con facilidad, permitiendo su aplicación en la ingeniería de tejidos y en la liberación controlada de fármacos (Granados y col., 2017).

2.2 Andamios

Diariamente se llevan a cabo miles de procedimientos quirúrgicos para reemplazar o reparar tejido que ha sido dañado por enfermedad o traumatismo. Como se mencionó anteriormente la ingeniería de tejidos tiene como objetivo regenerar los tejidos dañados utilizando la combinación de células con biomateriales de andamiaje altamente porosos, que actúan como plantillas para la regeneración de tejidos, guiando el desarrollo de nuevo tejido (O'brien, 2011).

Un gran número de andamios se han utilizado, independientemente del tipo de tejido. Existe una serie de consideraciones clave que son importantes al diseñar un andamio para su uso en la ingeniería de tejidos:

- I) **Biocompatibilidad:** El primer criterio de cualquier andamio para la ingeniería de tejidos es que debe ser biocompatible; las células deben adherirse, funcionar normalmente y migrar a la superficie a través del andamio y comenzar a proliferar antes de asentar una nueva matriz. Después de su implantación debe provocar una reacción inmune insignificante para evitar que cause un proceso inflamatorio exacerbado que puede reducir la curación de la herida o un rechazo del injerto por parte del organismo.
- II) **Biodegradabilidad:** Los andamios y las construcciones no están pensados como implantes permanentes. Por lo tanto, deben ser biodegradables para permitir que las células produzcan su propia matriz extracelular. Los subproductos de degradación también deben ser no tóxicos y capaces de salir del cuerpo sin interferir con otros órganos.
- III) **Propiedades mecánicas:** El andamio debe tener propiedades mecánicas acordes al sitio anatómico en el que se va a implantar y lo suficientemente resistente para la manipulación quirúrgica durante su implantación. Está claro que un equilibrio entre las propiedades mecánicas y la arquitectura porosa suficiente para permitir la infiltración celular y la vascularización es clave para el éxito de cualquier andamio.
- IV) **Arquitectura de andamios:** Los andamios deben tener una estructura de poros interconectados y una alta porosidad para asegurar la penetración de células y la difusión adecuada de nutrientes a las células que están dentro de la construcción y a la matriz extracelular formada, también se requiere para permitir que los productos de desecho difundan al exterior del andamio y que los productos de degradación de este puedan salir del cuerpo.

2.2.1 Materiales para la fabricación de andamios con aplicación en la ingeniería de tejidos

Existe gran variedad de polímeros biodegradables que se han utilizado en la ingeniería de tejidos, tales como, policaprolactona (PCL) y polivinil alcohol (PVA), siendo el ácido poliláctico (PLA) uno de los más utilizados para la síntesis de andamios enfocados al mejoramiento de las propiedades de adhesión celular (Zadeh y col., 2019).

2.3 Poli (ácido láctico) (PLA)

Entre los polímeros de origen natural se encuentra el poli(ácido láctico) o ácido poliláctico (PLA), un poliéster alifático de cadena lineal de naturaleza hidrofóbica tiene una estructura molecular que se aprecia en la Figura 1. Es un material aprobado por la FDA desde 1970 y es ampliamente utilizado en aplicaciones biomédicas debido a sus características de biocompatibilidad y biodegradabilidad, resistencia mecánica y estabilidad térmica. Por otra parte, el PLA también presenta la desventaja de ser bastante hidrófobo y no cuenta con sitios de reconocimiento celular, lo cual dificulta algunas de sus aplicaciones en la biomedicina (Cheng y col., 2009; Mohabatpour y col., 2016; Locilento y col., 2019).

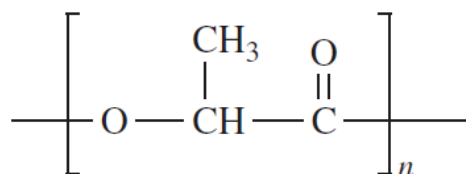


Figura 1. Estructura molecular de PLA (Lanza y col. 2017).

El PLA es sintetizado por polimerización de anillo abierto de ácido láctico que se obtiene por fermentación de dextrosa, que a su vez proviene de residuos agroindustriales (maíz,

celulosa y otros polisacáridos), también puede sintetizarse a partir de la condensación del ácido láctico libre, tal y como se muestra en la Figura 2 (Cheng y col., 2009; Arrieta y col., 2016).

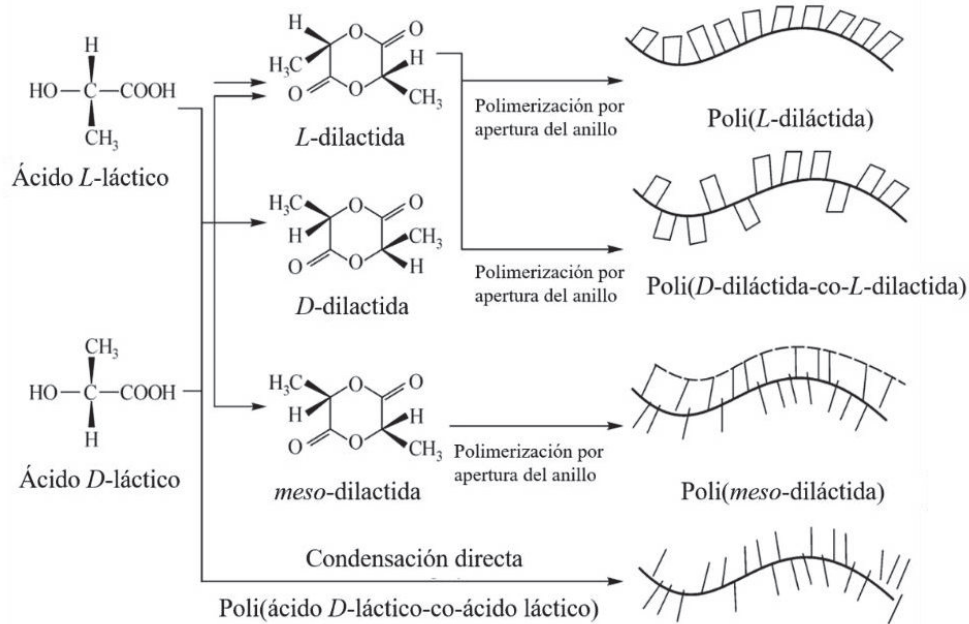


Figura 2. Esquema de polimerización de copolímeros de ácido L-láctico y D-Láctico (Cheng y col., 2009).

Dado que el ácido láctico es una molécula quiral, existe en dos formas isoméricas, *D*-ácido láctico y *L*-ácido láctico, que dan lugar a cuatro polímeros morfológicamente distintos. Los polímeros derivados de los monómeros *D* y *L* ópticamente activos son materiales semicristalinos, mientras que los *D*, *L* ópticamente inactivos son siempre amorfos. Las diferencias en la cristalinidad del PLA tienen implicaciones importantes a la hora de llevarse a aplicación, ya que los polímeros de PLA amorfos se utilizan usualmente para liberación de fármacos, donde es importante tener una dispersión homogénea de las especies activas, mientras que los polímeros de PLA semicristalinos son preferidos para aplicaciones con alta fuerza mecánica y rigidez, como aquellos en los que se requiere una función estructural a nivel macroscópico tales como dispositivos ortopédicos.

La importancia biológica de los isómeros radica en que el estereoisómero tipo *L* es capaz de ser metabolizado por el organismo humano. Otra ventaja de aplicaciones de PLA en

la biomedicina es que el lactato (es decir, el producto de degradación de hidrólisis de PLA) es conocido por ser capaz de estimular la síntesis de colágeno y la formación de nuevos vasos (Lanza y col. 2017; Yao y col., 2017). Cabe mencionar que el producto final de la degradación del PLA es finalmente agua y dióxido de carbono (Granados y col., 2017).

2.4 Técnica de Electrohilado

La técnica de electrohilado utiliza las fuerzas electrostáticas para producir fibras a partir de soluciones poliméricas. Es una técnica demandada por ser un proceso de bajo costo y fácil procesamiento a nivel experimental. Logra producir fibras en intervalos de diámetro micro y nanométricos, ofreciendo ventajas de gran área superficial y capacidad de incorporar componentes orgánicos e inorgánicos. Un sistema típico de electrohilado consiste en tres componentes: un sistema de inyección (una bomba de flujo constante acoplada a una jeringa con una aguja de metal), una fuente de alto voltaje y un colector (conectado a tierra o negativamente cargado), Figura 3. El sistema de inyección se utiliza para conducir la solución polimérica a través de un flujo capilar por la jeringa de metal hasta salir por él, siendo las fuerzas electrostáticas aplicadas las que harán que la solución polimérica se elongue en forma de chorro hacia el colector por efecto del rompimiento de la tensión superficial y de la gota al final de la jeringa, dando lugar a la formación del cono de Taylor. Durante el trayecto el solvente utilizado en la solución polimérica se volatiliza, formándose estructuras fibrilares como producto final (Li y Bou-Akl, 2016; Granados y col., 2017).

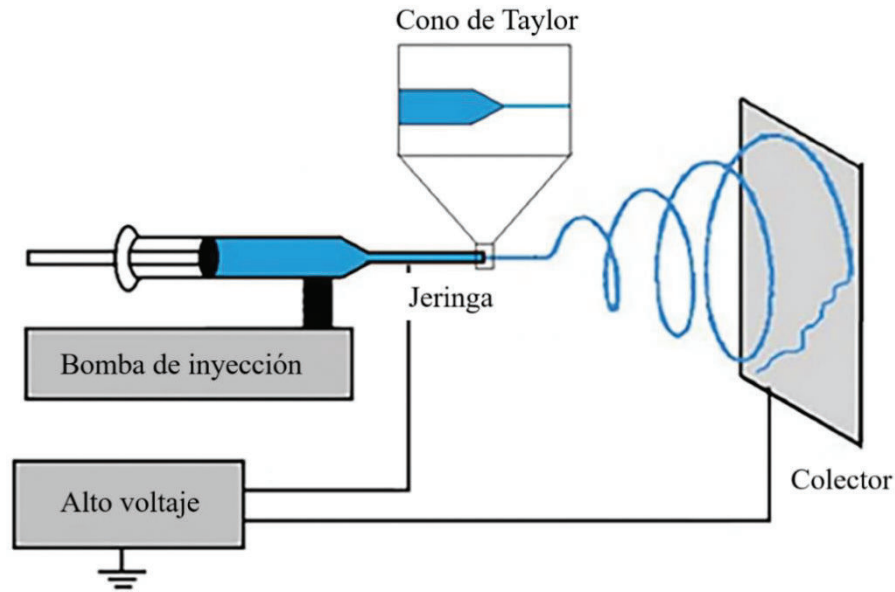


Figura 3. Esquema de un sistema típico de electrohilado (Li y Bou-Akl, 2016).

2.4.1 Cono de Taylor

El cono de Taylor, nombrado así por el pionero Sir Geoffrey Ingram Taylor por su trabajo con fluidos electrificados, propuso el modelo de “dieléctricos con fugas” para un fluido que no se comporta como un dieléctrico perfecto ni como un conductor perfecto, siendo el flujo de carga a través del fluido lo que conduce al alargamiento y adelgazamiento del chorro por la inestabilidad provocada en las repulsiones de las cargas similares en el mismo. La predicción y la observación de este fenómeno mostró que el chorro se elongaba en forma cónica, tomando una trayectoria en espiral que al entrar en contacto con el colector produce fibras continuas con diámetros comprendidos entre unas decenas de nanómetros a un milímetro (Li y Bou-Akl, 2016).

2.4.2 Variables que afectan el electrohilado

A pesar del arreglo simple del sistema de electrohilado, existen muchas variables que influyen el proceso, tomándose en cuenta principalmente tres aspectos, como las propiedades de las soluciones poliméricas a utilizar, así como los parámetros del proceso de electrohilado y por último los factores ambientales.

Se han establecido algunas relaciones de las propiedades de las fibras a obtener y los parámetros del sistema de electrohilado, sin embargo, presentan algunas limitaciones debido a que en la mayoría de los casos depende de las condiciones presentes al momento de llevar a cabo la producción de fibras y a que una cantidad considerable de variables influencia el proceso, dependiendo más de la observación empírica. Aunque no existe un modelo establecido para la formación de estas fibras, se puede estudiar el efecto de la modificación de los parámetros para guiar el proceso, como se muestra en la Tabla 1 (Li y Bou-Akl, 2016).

Tabla 1. Relación general entre los parámetros del electrohilado en la morfología de las fibras (Li y Bou-Akl 2016; Balusamy y col., 2020).

Parámetros	Efecto en la morfología de las fibras
Parámetros de la solución	
Presión de vapor del solvente	Mayor porosidad con una mayor volatilidad
Concentración del polímero	Incremento del diámetro de fibra al aumentar la concentración del polímero.
Viscosidad de la solución	Incremento del diámetro de fibra al aumentarse la viscosidad.
Conductividad de la solución	Decremento del diámetro de fibra con una mayor conductividad.
Parámetros de procesamiento	
Voltaje	Al incrementarse se relaciona con menores diámetros y una mayor probabilidad de formación de cuentas.

Flujo	Incremento del diámetro de fibra y la formación de cuentas al aumentarse.
Distancia (Aguja-colector)	Decremento del diámetro de fibra con distancias más largas.
Parámetros ambientales	
Temperatura	Decremento del diámetro de fibra con un aumento en la temperatura.
Humedad	La humedad induce poros circulares en las fibras.

2.4.3 Parámetros de Procesamiento en la Técnica de Electrohilado

Existen intervalos óptimos en los parámetros de procesamiento para mezclas específicas en función de la concentración y naturaleza tanto de polímeros y solventes en el sistema para la obtención de fibras con tamaños y distribuciones deseados (Li y Bou-Akl, 2016).

A continuación, se muestran las variables de electrohilado que pueden modificarse y como estos influyen en el proceso:

2.4.3.1 Voltaje aplicado

La aplicación de alto voltaje a la solución polimérica durante el proceso de electrohilado es un parámetro muy importante, ya que ejerce una influencia directa en la dinámica del fluido al inducirse cargas. Sin embargo, las modificaciones en el voltaje aplicado se verán reflejados en la morfología estructural de las fibras depositadas. Dependiendo de la velocidad de inyección y la viscosidad de la solución polimérica, se puede requerir un alto voltaje aplicado para mantener la estabilidad de chorro expulsado, ya que el voltaje suministrado se encuentra ligado al estiramiento y aceleración del chorro expulsado, el cual impacta directamente en la morfología de las fibras obtenidas.

Durante el estudio de la formación de fibras de poli(óxido de etileno) (PEO), se observó la influencia del voltaje en la formación de fibras. Al utilizar un voltaje de 5 kV, observaron muy poca formación de fibras con una gran cantidad de cuentas, después al aumentarse se formaron mayor cantidad de fibras, pero con cúmulos de cuentas aumentando el diámetro de las fibras, mientras que, considerablemente hasta 25 kV, resultó en la formación de fibras muy delgadas con la reducción de los cúmulos formados con anterioridad. Este estudio refleja la influencia del voltaje aplicado y su impacto en la formación de fibras (Jacobs y col., 2010). En otro estudio a partir de polivinilporrilidona (PVP) se demostró la formación nanofibras de diámetros más pequeños y con buena uniformidad al reducir la concentración del polímero, la velocidad de flujo e incrementar el voltaje. Se ha determinado que un voltaje crítico, es aquel que estabiliza el chorro que sale impulsada a partir de la solución polimérica y da pie a la formación de fibras. Y en el estudio anteriormente mencionado se utilizó un voltaje mínimo de 14 kV y un máximo de 20 kV (Balusamy y col., 2020).

2.4.3.2 Sistema de inyección

Entre los componentes del sistema de inyección el diseño de la salida de la solución polimérica es lo más importante, donde el más comúnmente utilizado es una aguja simple anclada a la bomba de inyección. Algunos otros diseños han desarrollado la capacidad de obtener fibras con estructuras de núcleo/coraza en el cual alguno de los dos componentes es de interés biológico, tal es el caso, en la incorporación de agentes terapéuticos o factores de crecimiento para regular la liberación de estos y modular el comportamiento celular al cual va dirigido (Li y Bou-Akl 2016).

2.4.3.3 Colector

Los primeros experimentos de electrohilado mencionan la utilización de colectores estacionarios dando como resultado la obtención de fibras con orientación al azar, sin embargo, con el paso del tiempo se han diseñado colectores que controlan la orientación final de la deposición de las fibras, obteniéndose fibras alineadas demostrando ser idóneas para cierta fabricación de dispositivos y aplicaciones a nivel biológico (Li y Bou-Akl, 2016). Existen colectores metálicos de aluminio, hierro y cobre, que al estar conectados a tierra directa permiten la recolección de las fibras hasta formar una monocapa y que al apilarse una tras otra, se logra la formación de la membrana tridimensional y con poros interconectados. Por otro lado, existen placas a las que se les aplica una carga para formar una diferencia mayor en el campo de potencial entre la placa colectora y el capilar por donde fluye la solución, entonces, las fibras que se generan son atraídas con mayor facilidad hacia la placa que en el electrohilado convencional.

2.4.4 Aplicaciones de fibras electrohiladas en la ingeniería de tejidos

La facilidad para producir nanofibras y la variedad de polímeros biocompatibles que pueden formarse mediante electrohilado han mostrado muchas de sus aplicaciones potenciales en campos emergentes como la ingeniería de tejidos. Una de las muchas ventajas de los andamios de nanofibras electrohiladas es que su superficie se puede modificar controlando los parámetros de electrohilado para obtener la topografía que mejor se adapte a la aplicación. Otra ventaja es que las membranas o matrices de nanofibras se pueden formar en casi cualquier forma (parches, esteras, tubos, matrices multicapa de fibras) según el lugar de implantación deseado. Como se muestra en la Tabla 2, se han usado armazones fibrosos electrohilados para regenerar una variedad de tejidos tales como vasos sanguíneos, neural, hueso, ligamento y cartílago (Li y Bou-Akl, 2016).

Tabla 2. Aplicaciones de fibras electrohiladas en la ingeniería de tejidos por distintos métodos de síntesis (Li y Bou-Akl, 2016).

Método	Fibras	Agentes inmovilizados	Aplicaciones en ingeniería de tejidos
Encapsulamiento físico	PCL, P(LLA-CL), PLLA, Seda.	Gelatina, fosfato de calcio, proteínas solubles de membrana de huevo; colágeno; laminina; fibrina.	Óseo, vascular, neural, cartílago y en general.
Baño químico (hidrólisis con NaOH)	PLLA, PCL.	HAp.	Óseo y ligamentos.
Inmovilización química	PET/PMAA, PLLA (PGA, PLGA)/PAA, PCL.	Gelatina; Arg-Gly-Asp.	Vascular y en general.
Co-electrohilado	PLLA, PLGA-PEG-NH ₂	HAp; Arg-Gly-Asp.	Óseo y en general.

Abreviaciones: PCL, poli(ϵ -caprolactona); P(LL-CL), poli(L-ácido láctico)-co-poli(ϵ -caprolactona); PLLA, poli(L-ácido láctico); PLLC, poli(L-lactida-co-glicólico) copolímero; PET, polietilentereftalato; PGA, poli(ácido glicólico); PLGA, poli(ácido láctico-co-glicólico); PMAA, poli(ácido metacrílico); PAA, poli(ácido acrílico); HAp, hidroxiapatita; PEG, poli(etilenglicol); Arg-Gly-Asp, arginina-glicina-aspartato.

2.5 Ingeniería de Tejidos de la Piel

La piel es el órgano más largo en el cuerpo humano y juega un rol importante al mantener la homeostasis y proteger los órganos internos del ambiente externo. Sin embargo, al perderse su integridad se forman las lesiones cutáneas, ya sea por traumatismos, procedimientos quirúrgicos y quemaduras, las cuales se pueden complicar por infecciones provocadas por microorganismos exógenos. Algunas heridas pueden volverse crónicas dependiendo del tiempo de curación, tal es el caso de los pacientes con diabetes y obesidad, que puede volverse una causa de morbilidad e incluso mortalidad. Desafortunadamente, a pesar de la intensa investigación para mejorar las heridas cutáneas, el tratamiento clínico de las heridas crónicas sigue siendo insatisfactorio en muchos casos, es por ello que en las últimas décadas los investigadores han prestado atención a la ingeniería de tejidos en conjunto con las estrategias de diseño de biomateriales para la regeneración de la piel (Kim y col., 2019; Rahmati y col., 2020).

El campo de biomateriales y la ingeniería de tejidos han emergido por la necesidad de desarrollar combinaciones de materiales con agentes terapéuticos que combatan esta problemática, donde se ha destacado que diversos biomateriales poliméricos de origen natural y sintético pueden ser exitosos para la regeneración de tejidos de la piel. El diseño de andamios para la piel potencia la curación al proteger el tejido de la pérdida de fluidos y proteínas, facilitando la eliminación de exudados, previniendo la adquisición de infecciones, actuando como sistemas de liberación de factores de crecimiento, fármacos y componentes de la matriz para la cicatrización de la herida. (Rahmati y col., 2020).

Como soporte de la regeneración de la MEC, los andamios ayudan a la adhesión celular, proliferación y migración, los cuales eventualmente permiten el desarrollo de una piel nueva. También se deben considerar algunos puntos en el diseño de andamios para la piel, tal es el caso de procesos como la angiogénesis, el intercambio de gas y el transporte de masa en el tejido. La tasa de degradación, flexibilidad y las propiedades mecánicas de los andamios deben asemejarse a las del tejido de piel nativo (Rahmati y col., 2020).

Se han utilizado varias estrategias para atacar esta problemática, donde los sistemas de administración de fármacos a nano, micro y macroescala pueden extender la vida media,

mejorar la biodisponibilidad, así como optimizar la farmacocinética y disminuir la frecuencia de dosificación de fármacos. De los anteriores mencionados la administración de macrosistemas como andamios de ingeniería de tejidos son particularmente relevantes por su utilidad para incorporar terapias con fármacos, que además pueden proteger físicamente las heridas como apósitos para heridas. Uno de ellos es el utilizar membranas fibrosas, que pueden ser lisas y flexibles, las cuales se ha visto que son preferidas por las células de la dermis y promueve la cicatrización, regeneración y sustitución de la piel dañada (Kim y col., 2019; Li y Bou-Akl, 2016). Por lo tanto, los andamios cargados con fármacos son particularmente prometedores para acelerar sinérgicamente el proceso de curación de las heridas crónicas. Por otro lado, es de importancia conocer que la capacidad innata de cicatrización de heridas de la piel depende en gran medida del tipo de herida, las enfermedades del paciente o el estado de la lesión (Kim y col., 2019).

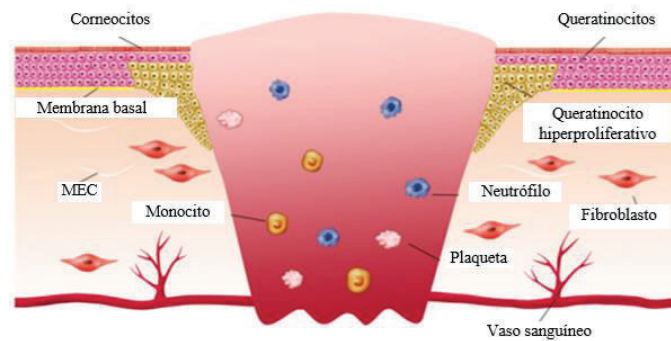
2.5.1 Proceso de cicatrización de las heridas cutáneas.

El proceso de cicatrización de las heridas cutáneas consta de tres fases: I) hemostasia e inflamación, II) formación de tejido nuevo (proliferación) y III) remodelación de tejido (Figura 4). Dentro de estas fases, hay una serie de eventos estrictamente regulados que involucran quimiotaxis, fagocitosis, formación, degradación y remodelación del colágeno. La cicatrización de heridas en humanos es un proceso biológico complicado que requiere la migración y proliferación coordinadas de queratinocitos y fibroblastos, así como de otros tipos de células para generar una respuesta inflamatoria, sintetizar tejido y restaurar la capa epitelial.

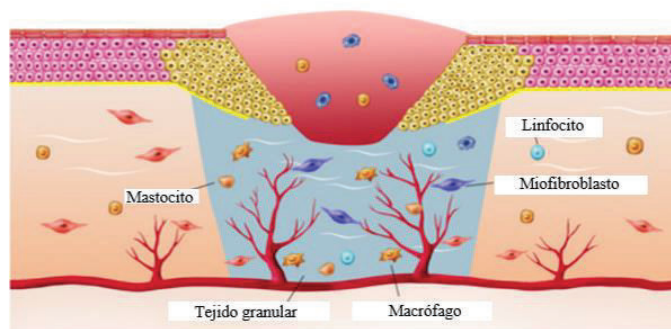
La fase inflamatoria ocurre poco después de la lesión y se caracteriza por la infiltración de células inflamatorias. En respuesta a las señales inflamatorias, los leucocitos migran al sitio de la lesión y a medida que cede la fase inflamatoria comienza la fase de proliferación celular para reparar el tejido con una hiperproliferación de células dérmicas y epidérmicas, dándose la reepitelización, depósito de colágeno, la formación de vasos sanguíneos y la formación del tejido nuevo. La última fase de remodelación del tejido se caracteriza por una disminución de las células y citocinas proinflamatorias y el establecimiento de la matriz extracelular. En esta

fase la herida se contrae y resulta en la formación de una cicatriz con una resistencia a la tracción reducida (Kim y col., 2019).

A. Hemostasia e inflamación



B. Proliferación



C. Remodelación del tejido

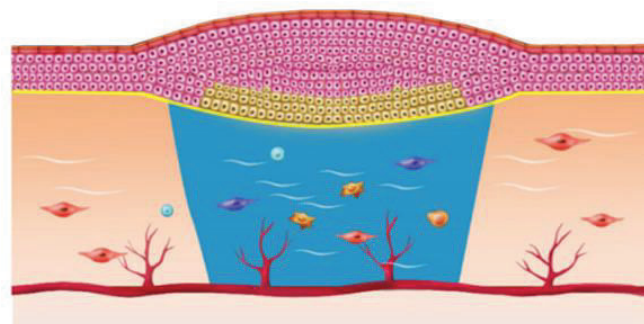


Figura 4. Diferentes fases de la cicatrización normal de heridas. A) Fase inflamatoria. B) Fase de proliferación. C) Fase de remodelación del tejido (Kim y col., 2019).

2.6 Rol de las Plantas en Biomedicina

Un gran número de plantas han sido utilizadas en la medicina tradicional en muchos países a lo largo del tiempo. Las flores, tallos, hojas y raíces de una diversa variedad de plantas se utilizan en forma de té para tratar problemas de dolor, digestivos, edemas, artritis y fiebre. También se usan como alternativas de tratamiento de heridas y quemaduras por su efecto de cicatrización, ya que poseen capacidad de inducción de regeneración de tejidos, a través de múltiples mecanismos. El uso de plantas en la medicina no es solo barata y asequible, sino que, es segura por su origen natural. Es por lo que se han planteado las posibilidades de ser utilizados como agentes cicatrizantes, debido a los constituyentes activos biológicamente que poseen (VanderJagt y col., 2001; Thakur y col., 2010).

Los constituyentes biológicamente activos se encuentran distribuidos en diversas familias de químicos como lo son: alcaloides, aceites esenciales, flavonoides, taninos, terpenos, saponinas y compuestos fenólicos. Tales compuestos son de interés para los científicos por sus efectos antibacteriales, antiinflamatorios y de cicatrización de heridas para el desarrollo de fármacos, sin embargo, necesitan hacerse más estudios a profundidad y determinar los mecanismos moleculares por los cuales actúan (Thakur y col., 2010).

Los compuestos de origen natural ricos en polifenoles aunque son de gran interés para la promoción de la salud o la prevención de enfermedades, tienen ciertas limitaciones en su biodisponibilidad a nivel fisiológico por lo que se han buscado combinar algunas tecnologías de investigación para su acarreamiento, en este caso, el encapsulamiento de éstos para permitir su estabilidad química hasta su liberación y mejorar su aprovechamiento en aplicaciones biológicas tal como se muestra en la Figura 5 (Locilento y col., 2019).

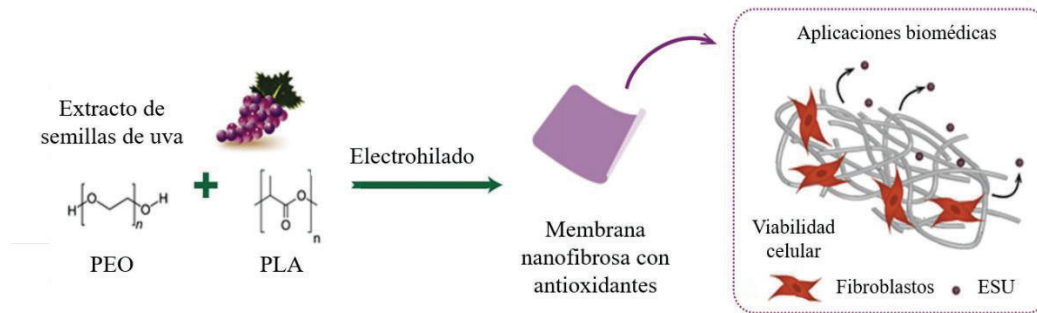


Figura 5. Utilización de extractos naturales encapsulados para aplicaciones biológicas (Locilento y col., 2019).

2.6.1 Materiales Poliméricos Combinados con Extractos Naturales

Investigaciones recientes han demostrado que la incorporación de diferentes tipos de antioxidantes a fibras electrohiladas mejoran las características adhesión celular. También se ha visto que la producción de radicales libres se ven reducidos en gran medida en ensayos *in vitro* e *in vivo*, los cuales son responsables de daño en los tejidos y promoción del proceso de inflamación, que resulta en un proceso de curación de las heridas más eficiente, mejorando la proliferación celular. Compuestos polifenólicos extraídos de plantas han sido utilizados como antioxidantes en la dieta e investigaciones recientes demostraron que esos componentes contribuyen a la protección contra el desarrollo de cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, osteoporosis y enfermedades neurodegenerativas (Locilento y col., 2019; Zadeh y col., 2019).

Se ha demostrado que, al utilizar metodologías de síntesis de andamios, como el electrohilado, da lugar a un encapsulamiento de estos polifenoles, protegiéndoles de factores ambientales que los llegaran a oxidar o degradar, teniendo como resultado una mejor biodisponibilidad y liberación controlada de estos componentes. La incorporación de extractos naturales en la síntesis de matrices poliméricas biodegradables trae algunas ventajas ante otro tipo de componentes, ya que por ser de origen natural no producen un rechazo del injerto, además hay un decremento en la hidrofobicidad final del material, teniendo consigo una mejor interacción y adhesión celular, por otra parte existe una relación directa entre la concentración

del extracto y la conductividad de la solución polimérica a electrohilar, lo que provoca una distribución de diámetros de fibra menor, y que por consiguiente da lugar a una estructura con mayor porcentaje de porosidad, y que estos poros interconectados, resultan en mayor área de superficie de contacto para las células que puedan infiltrarse y tener un mejoramiento en la adhesión, proliferación y migración celular, además como ya se ha mencionado estos componentes provocan señales químicas para las células que desencadenan en procesos de señalización intracelular dependiente de los grupos funcionales presentes en los compuestos bioactivos (Locilento y col., 2019; Radusin y col., 2019; Zadeh y col., 2019).

Se han investigado fibras de PLA cargadas con polifenoles extraídos de plantas, los cuales han mostrado una mejora en las propiedades antibacteriales al añadir estos compuestos. Algunos estudios hacen uso de ajo, uva y dátil para combinarlos con fibras de PLA y realizar estos tipos de estudios (Radin y col., 2019; Zadeh y col., 2019). El extracto de la *planta Rumex hymenosepalus* es uno de los cuales ha demostrado tener gran capacidad antioxidante (VanderJagt y col. 2001). Esto atribuido a la composición de sus agentes químicos ricos en polifenoles, como los antes mencionados, pudiendo ser una alternativa para aplicaciones en la ingeniería de tejidos como efectos de cicatrización de heridas de la piel.

2.7 Extractos Naturales

Los compuestos bioactivos naturales provenientes de fuentes a partir de agroindustrias y obtenidos de productos de plantas han tomado gran relevancia, ya que poseen compuestos polifenólicos con propiedades fisiológicas benéficas y han sido utilizadas en diversos campos por sus actividades como antioxidantes y antimicrobianas (Locilento y col., 2019). Las plantas de la familia *Polygonaceae* comprende alrededor de 50 géneros y 1200 especies distribuidas alrededor del mundo. Dentro de esta familia los géneros *Rheum*, *Rumex*, *Polygonum*, *Coccoloba*, *Calligonum* y *Persicaria* se han utilizado como remedios herbáceos tradicionales para tratar inflamaciones urinarias, cálculos biliares y enfermedades cutáneas crónicas, quemaduras en la piel, hepatitis, fiebre, osteomielitis, también se han utilizado como agentes anticancerígenos, diuréticos y laxantes (Mishra y col., 2018).

2.7.1 Género *Rumex*

El género *Rumex* comprende cerca de 205 especies distribuidas a nivel mundial. Estudios previos han reportado actividades anticancerígenas, antidiarreicas, antioxidantes, analgésico, antiinflamatorios, antihelmínticos y antimicrobianos de plantas que pertenecen a este género, ricos en fitoquímicos (Figura 6).

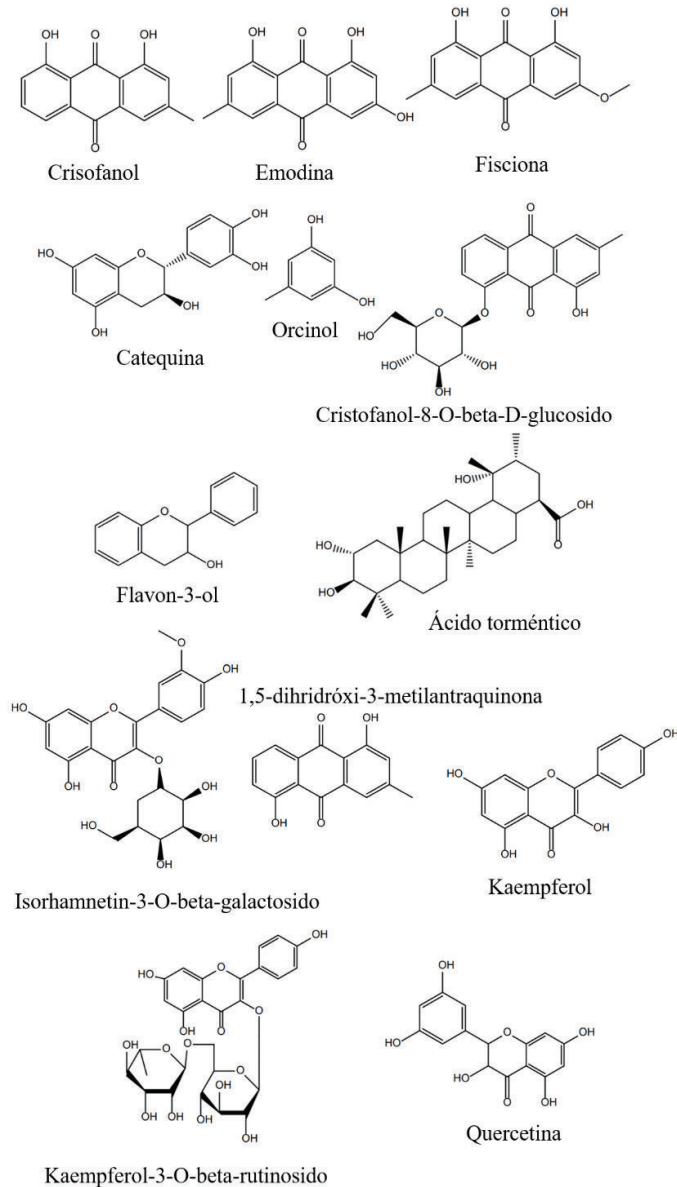


Figura 6. Estructuras químicas de algunos metabolitos aislados de las especies de *Rumex* (Mishra y col., 2018).

2.7.2 *Rumex hymenosepalus*

Es una planta conocida como “*Canaigre dock*” o “*Rubarbo salvaje*”, se encuentra distribuida con gran abundancia en el norte de México y en el sur de Estados Unidos de América. En México es una planta de carácter comercial, y se pueden encontrar sus partes anatómicas secas a disposición del público en general. Es una planta que contiene una cantidad considerable de antioxidantes, de los cuales principalmente se encuentran en su composición polifenoles (taninos y estilbenos). Estás son moléculas con potencial reductor debido a los grupos funcionales hidroxilo ($-OH$) presentes en su estructura, a lo cual se le atribuye su capacidad antioxidante.

Se han realizado estudios del extracto de las raíces de esta planta (Figura 7), con la finalidad de aprovechar su potencial reductor, donde se han sintetizado nanopartículas de plata estabilizadas (AgNP's), esto a través de los mismos mecanismos moleculares responsables de su actividad antioxidante, sin la utilización de algún agente químico adicional que dañe al medio ambiente (Figura 8) (VanderJagt y col., 2001; Rodríguez-León y col., 2013). Los métodos de síntesis a través de química verde han tomado importante relevancia en el campo clínico por sus efectos benéficos y toxicológicos para aplicarlos al sistema biológico. También se hizo un estudio donde se suministraron estas nanopartículas por vía oral en modelos de ratas diabéticas donde se encontró que en comparación con el grupo sin tratamiento y en un periodo de 9 días hubo un decremento significativo de los niveles de glucosa séricos, hasta en un 50%, mostrando una mejora en los efectos antihiperglicémicos de las nanopartículas sintetizadas por química verde y estabilizadas por los agentes presentes en el extracto (Virgen-Ortiz y col. 2015). Por otro lado, estas nanopartículas han mostrado actividad antibacteriana de amplio espectro, inhibiendo el desarrollo de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como el hongo *Candida albicans*. En el mismo estudio se desarrollaron experimentos que arrojan que fracciones del extracto son efectivas en la inhibición de microorganismos de manera específica sobre *Staphylococcus aureus*, pero no para *Escherichia coli* y *C. albicans*. El análisis *in vitro* de biocompatibilidad no mostró un efecto citotóxico sobre las líneas celulares utilizadas en el estudio (Rodríguez-León y col., 2018).



Figura 7. Raíces secas y extracto de *R. hymenosepalus* (Rodríguez-León y col., 2013).

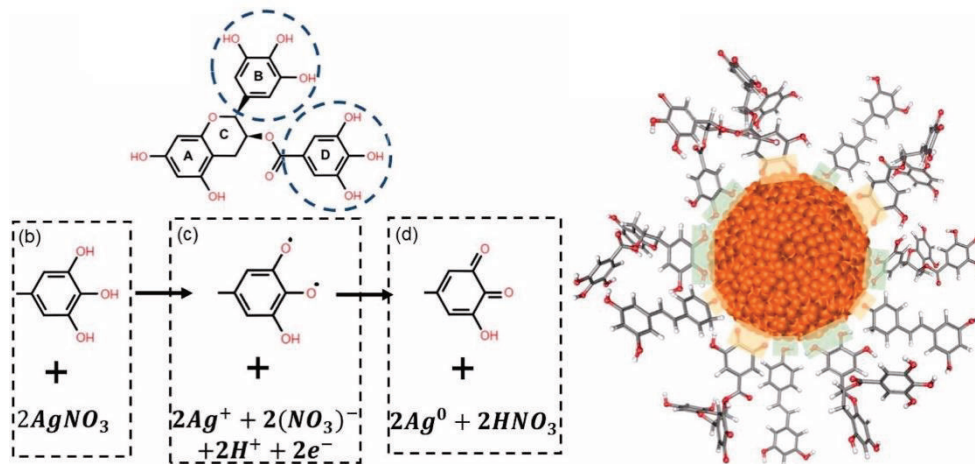


Figura 8. Síntesis de AgNP's por el poder reductor de los compuestos activos de *R. hymenosepalus* y estabilización de las nanopartículas (Rodríguez-León y col., 2018).

Un estudio reciente, combina la síntesis de matrices poliméricas de PLA por la técnica de electrohilado y la incorporación de extractos naturales, tratando de modular las cinéticas de liberación mediante hidrólisis de las nanofibras de PLA antes de ser embebidas, para su posible aplicación en el sector salud, falta realizar estudios aplicados a nivel biológico (Torres-Salcido y col., 2020). Sin embargo, es relevante el método de inclusión del extracto, sabiendo que también se puede modular al ser encapsulados en el interior de la matriz durante el proceso de electrohilado.

CAPÍTULO 3. METOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 Materiales

Poli (ácido láctico) (PLA 4060D, peso molecular = 188 kDa, *L*-lactida al 88% y *D*-lactida al 12%) obtenido de NatureWorks Ingeo®, *N,N*-Dimetilformamida (DMF) anhidro al 99.8%, comercializado por Sigma-Aldrich®, Diclorometano (DCM) anhidro al 99.8%, comercializado por Sigma-Aldrich, alcohol etílico al 96% comercializado por MEYER®, las raíces secas de *Rumex hymenosepalus* fueron obtenidas en Comercial Zazueta®, Hermosillo, Sonora, México.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtención del Extracto de *R. hymenosepalus*.

Para la obtención del extracto de *R. hymenosepalus* (ERh), se utilizaron las raíces de la planta, secas y cortadas en rodajas, adquiridas de manera comercial. Se colocaron las raíces en un frasco ámbar con una mezcla de solventes etanol/agua en proporción 70:30, de tal modo que se pesaron 15 g de raíces por cada 100 mL de solución (Álvarez-Cirerol, 2015; Rodríguez-León y col., 2013 y 2018). La solución se dejó en reposo posterior a un periodo de 4 semanas con el fin de alcanzar el equilibrio de difusión de los componentes activos de la planta hacia el medio de extracción. El frasco se dejó sellado con Parafilm® y en oscuridad.

Transcurrido el tiempo de maceración se prosiguió a concentrar los componentes disueltos en la mezcla de solventes. Primeramente, se separaron los restos de materia orgánica de las raíces de la planta, utilizando un filtro Whatman® grado 4 (retención de partículas de 20-25 µm), se desecharon y el sobrenadante fue filtrado utilizando otro filtro Whatman® grado 2 (retención de partículas ≥ 8 µm) y después un ACRODISC GHP PALL (retención de partículas ≥ 0.45 µm) con la finalidad de eliminar microorganismos y partículas de restos orgánicos que pudiesen haber quedado. El sobrenadante recuperado se concentró en un rotavapor Büchi,

Vacuum Controller, modelo V-805 a 37 °C en condiciones de vacío. La pasta obtenida se secó en una estufa Cole-Parmer a temperatura ambiente y en condiciones de vacío durante un periodo de 8 h hasta la obtención de un sólido, el cual fue pulverizado con un mortero.

3.2.2 Preparación de Fibras Electrohiladas de PLA y PLA Cargadas con Extracto de *R. hymenosepalus*.

Para la preparación de fibras se prepararon soluciones poliméricas de PLA al 10, 12 y 14% p/v utilizando una mezcla de solventes DCM/DMF (70:30 v/v) que han sido utilizados por Valente y col., en el 2016, Zadeh y col., en el 2019 y por Radusin y col., en el 2019. Así mismo se prepararon soluciones de PLA, con las concentraciones antes mencionadas y una vez disuelto el polímero se añadieron concentraciones de *R. hymenosepalus* al 5 y 10% en peso (con base en el peso de PLA de la solución) tomando como base los estudios de Locilento y col., 2019, Radusin y col., 2019, Zadeh y col., 2019. Tales soluciones se dejaron en agitación constante 24 h antes de llevar al proceso de electrohilado, el cual se partió de un voltaje de 15 kV, un flujo de 1.2 mL/h, una distancia de 15 cm y una humedad relativa de $20 \pm 5\%$ a $25 \pm 5\%$ °C. A partir de ello se realizaron ajustes para encontrar las condiciones óptimas de electrohilado, considerando el obtener fibras lisas, sin cuentas y lograr una estabilidad en la salida del chorro de la solución polimérica.

3.3 Caracterización.

3.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Se estudió la morfología de las fibras mediante un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5410LV. Se realizaron micrografías de las fibras de PLA y PLA/ERh utilizándose un haz de electrones secundarios de 20 kV de intensidad a alto vacío. Todas las muestras se montaron en un portamuestras de cobre con una cinta de carbono de doble cara y se recubrieron con una

película de oro. Las imágenes obtenidas y el análisis de diámetro promedio de las fibras se realizaron utilizando el software ImageJ del National Institute of Health (NIH), EUA, tomando al menos 200 fibras para cada andamio y los datos se procesaron en el software Origin 2018 para la construcción de los histogramas, obtención de diámetros promedio de fibra y desviaciones estándar para cada uno de los andamios.

3.3.2 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).

Las muestras se analizaron utilizando un espectrómetro de infrarrojo acoplado a un sistema de reflectancia total atenuada (Attenuance Total Reflectance, ATR, por sus siglas en inglés) (Perkin Elmer FTIR Frontier) y procesados con ayuda del Software Spectrum, se realizó el análisis de las señales mostradas en un intervalo de número de onda desde 4000 hasta 400 cm^{-1} . Un total de 16 lecturas fueron tomados a una resolución de 8 cm^{-1} .

3.3.3 Resonancia Magnética Nuclear de Protón (^1H RMN).

Se obtuvo el espectro de ^1H RMN del extracto sólido extraído de la planta *R. hymenosepalus* en un equipo Bruker Avance 400, operando a 400 MHz, a 25 °C. Se utilizó como solvente dimetil sulfóxido deuterado ($\text{DMSO}-d_6$). La referencia interna fue tetrametilsilano (TMS).

3.3.4 Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-vis).

Se obtuvo el espectro del extracto utilizando un espectrofotómetro UV-vis (Lambda 20, Perkin Elmer) en un intervalo de 190-1100 nm, para evidenciar la presencia de los compuestos polifenólicos reportados por Rodríguez-León y colaboradores en el 2013 y 2015, los cuales presentan un máximo de absorbancia a 280 nm.

3.3.5 Análisis Termogravimétrico (ATG).

Se analizaron las propiedades térmicas de cada una de las membranas obtenidas con un analizador termogravimétrico (Pyris 1 TGA analyzer Perkin Elmer) con la finalidad de estudiar su descomposición en función de la temperatura a la que fueron expuestas. Se obtuvieron muestras de membranas de PLA y PLA/ERh con una masa de aproximadamente 3-5 mg y se sometieron a calentamiento en un intervalo de temperaturas desde 25 °C hasta 900 °C, con una razón de calentamiento 10 °C min⁻¹, en condiciones atmosféricas de nitrógeno.

3.3.6 Ángulo de Contacto.

El ángulo de contacto de las fibras se determinó utilizando un sistema de medición de ángulo de contacto (CAM-Plus, ChemInstruments). Para cada una de las mediciones se añadió una gota de agua destilada en la superficie de las membranas y se realizaron las mediciones. Se calculó el ángulo de contacto en diez ocasiones para cada una de las muestras analizadas y se estimó la desviación estándar.

3.3.7 Determinación de la Eficiencia de Encapsulación del Extracto de *R. hymenosepalus* en las Fibras Electrohiladas de PLA.

La eficiencia de encapsulación (EE) se determinó de acuerdo con la metodología reportada por Locilento y colaboradores en el 2019. Las membranas de PLA/ERh5 y PLA/ERh10 (6 mg) fueron disueltas en una mezcla de DCM/EtOH (50:50). La cantidad del extracto cargado en las membranas fue cuantificada utilizando espectroscopía de absorción UV-Vis (Lambda 20, Perkin Elmer), siendo monitoreada a 280 nm contra la curva de calibración del extracto previamente obtenida. Las fibras de PLA fueron disueltas en el mismo solvente y utilizada como blanco. Cada ensayo se realizó por triplicado y la EE se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{\text{Concentración de ERh en las nanofibras de PLA}}{\text{Concentración teórica de ERh en las nanofibras de PLA}} \times 100$$

3.3.8 Estudio del Perfil de Liberación del Extracto de *R. hymenosepalus*.

El estudio del perfil de liberación *in vitro* del ERh de las membranas de PLA se llevó a cabo en solución tampón de fosfatos (PBS), el cual simula las condiciones del plasma sanguíneo y los exudados de las heridas. Se utilizaron membranas de aproximadamente 6 mg y fueron inmersas en 15 mL de PBS (0.1 M, pH 7.4) a 37 °C bajo mínima agitación constante (50 rpm). Una muestra de 3 mL de solución se retiró del sistema y se analizó a 280 nm en intervalos de tiempo determinados por UV-Vis (Lambda 20, Perkin Elmer). Al concluir la lectura, el volumen de solución de PBS retirado se agregó al sistema de liberación con la finalidad de mantener el volumen constante. La cantidad del ERh liberado en función del tiempo se calculó utilizando la curva de calibración anteriormente construida. Los datos obtenidos fueron promediados a partir de los triplicados para cada muestra. El porcentaje de liberación se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Liberación (\%)} = \frac{M_t}{M_0} \times 100$$

Donde M_t (mg) es la masa liberada del ERh a un determinado tiempo (t) y M_0 (mg) es la masa del ERh encapsulado en las nanofibras.

Una vez determinado el porcentaje de liberación también se utilizó la ecuación de Korsmeyer-Peppas para describir el perfil de liberación de ERh a partir de las nanofibras de PLA, siguiendo:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

Donde M_t (mg) y M_∞ son la masa de ERh liberado en un tiempo arbitrario (t) y en el equilibrio respectivamente, K es la constante de la tasa de liberación, y n indica la liberación exponencial, sugiriendo la naturaleza del mecanismo de liberación. Los datos mostrados se muestran como logaritmo del porcentaje de liberación acumulada del extracto frente al logaritmo del tiempo. Entonces, el mecanismo de liberación se considera basado en el valor n obtenido del modelo Korsmeyer-Peppas ajustado a la curva. El valor n se determina considerando la porción de la curva de liberación que satisface que $M_t/M_\infty < 0.6$, donde valores del exponencial $n < 0.5$ están relacionados con un mecanismo de liberación de difusión Fickiano, mientras que para valores de $n > 1.0$, se dice que hay un mecanismo de liberación anómalo o no Fickiano, en este último mencionado se deberán tomar otras consideraciones, tales como, hinchamiento y erosión.

3.3.9 Evaluación de la Actividad Antioxidante de las Fibras de PLA Cargadas con el Extracto de *R. hymenosepalus*.

La actividad antioxidante de fibras electrohiladas de PLA cargadas con el ERh se evaluó *in vitro* utilizando el ensayo de estabilización de radicales DPPH. Las nanofibras se disolvieron en DCM/EtOH (50:50) y fueron tratadas con solución de DPPH en metanol (0.1 mM) por 30 min a temperatura ambiente y oscuridad. Transcurridos los 30 min, la absorbancia de la solución a 520 nm fue medida en UV-Vis (Multiskan FC, Thermo Scientific). La actividad antioxidante en porcentaje (AA) de las muestras se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$AA (\%) = \frac{A_{control} - A_{muestra}}{A_{control}} \times 100$$

Donde $A_{control}$ y $A_{muestra}$ son los valores de absorbancia de la solución de DPPH sin y con la presencia de las soluciones de la muestra, respectivamente. Las mediciones se realizaron por triplicado.

3.3.10 Evaluación *in vivo* de las Fibras Electrohiladas de PLA y PLA Cargadas con el Extracto de *R. hymenosepalus*.

En este estudio se utilizaron ratas macho Wistar (225 ± 25 g). Los ratones se criaron en las instalaciones de cuidado de animales de la Universidad de Sonora, con ciclos de luz y oscuridad de 12 h a 25° C, se les proporcionó agua estéril y comida *ad libitum*. Esta investigación fue aprobada por el Comité de Bioética del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Sonora (Hermosillo, Sonora, México). Cada animal fue anestesiado con una mezcla de ketamina/xilazina (90:10) (mg/kg de peso) vía intramuscular, esto con la finalidad de relajar y minimizar el estrés y posible sufrimiento del animal de experimentación. Posteriormente, se procedió a depilar el área dorsa-lateral del abdomen del roedor. Se realizaron incisiones circulares con un Dermal Punch desechable y estéril, de 8.0 mm de diámetro. Las heridas fueron cubiertas con un tamaño igual de membranas irradiadas con luz UV por un periodo de 30 min en cada lado. Se utilizaron membranas de PLA, PLA/ERh5 y PLA/ERh10 para cada grupo designado, mismo que se repitió cada 24 horas hasta completar un total de 3 aplicaciones a partir del día uno. La evolución del área superficial de la herida se midió con un vernier electrónico calibrado. El área de la herida se midió hasta que la herida se cerró por completo. El porcentaje de la curación de la herida se evaluó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Área de herida (\%)} = \frac{A}{A_i} \times 100$$

Donde, A_i es el área inicial de la herida, y A es el área de la herida después de un intervalo de tiempo específico. Los resultados se expresaron como la media \pm la desviación

estándar. Todos los datos se analizaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Un valor de $p < 0.05$ es considerado estadísticamente significativo.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Obtención del Extracto de *R. hymenosepalus*.

Primeramente, se llevó a cabo la extracción de los componentes de las raíces de la planta *R. hymenosepalus* por maceración en una mezcla de solventes (EtOH/H₂O), posterior al secado y como producto final, se obtuvo un sólido oscuro y quebradizo que fácilmente se pudo retirar del recipiente que lo contenía, mostrado en la Figura 9A. Después, con la finalidad de obtener una muestra más homogénea se procedió a realizar un procedimiento de molienda utilizando un mortero para deshacer los cúmulos grandes del extracto sólido, obteniéndose un polvo fino más homogéneo para ser utilizado posteriormente, mostrado en la Figura 9B. Una vez obtenido el polvo fino se registró la masa final obtenida del extracto, que haciendo una relación con la masa inicial utilizada de las raíces de la planta se obtuvo un rendimiento de 25.6%, un poco más bajo que el reportado de 28% por Álvarez-Cirerol en el 2015. Sin embargo, no representa una diferencia muy significativa, esto puede deberse a la utilización de alcohol etílico grado 96 en este estudio, propiciando a una menor difusión de los componentes activos contenidos en las raíces de la planta, reiterando que no se presentó un cambio considerable.

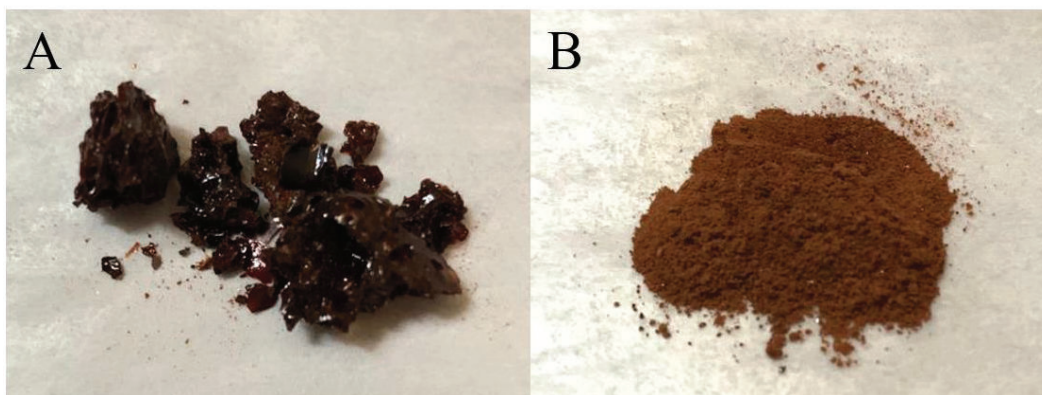


Figura 9. Extracto sólido de *R. hymenosepalus*. A) muestra de sólido obtenido una vez eliminado el solvente y B) muestra pulverizada.

Como parte del seguimiento de la obtención del extracto se tomó un espectro de absorción en UV-vis. Se aprecia en la Figura 10, que la absorción en un intervalo longitud de onda comprendida entre los 260 nm y los 350 nm se atribuye a los grupos fenólicos presentes en los estilbenos y catequinas contenidas en el extracto, el cual coincide con el anteriormente reportado por Rodríguez-León y colaboradores en 2013, donde la absorción máxima tiene lugar a 280 nm, mostrado en la Figura 10.

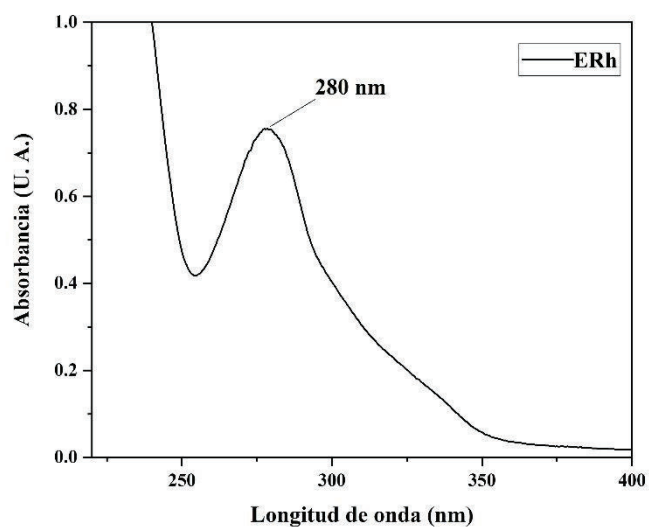


Figura 10. Espectro de absorción UV-vis del extracto de *R. hymenosepalus*.

4.2 Preparación de Fibras Electrohiladas de PLA y PLA Cargadas con Extracto de *R. hymenosepalus*.

Para la obtención de las fibras electrohiladas de PLA y extracto de *R. hymenosepalus* primeramente se utilizaron soluciones de PLA al 10% p/v y PLA al 10% p/v adicionado con 10% en peso del extracto (en relación con la masa de PLA) con una mezcla de solventes de DCM/DMF (70:30 v/v) (Figura 11).

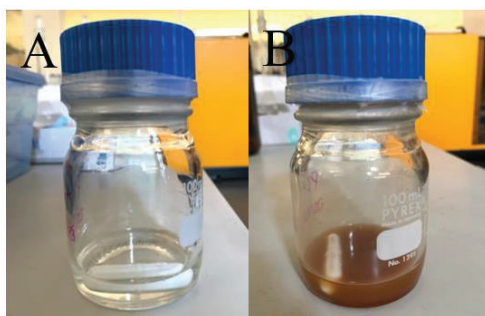


Figura 11. Representación de las soluciones poliméricas de A) PLA y B) PLA/ERh en DCM/DMF (70:30 v/v).

Al someter estas soluciones al proceso de electrohilado se logró la formación de fibras, mostradas en la Figura 12, donde en las imágenes A y C se aprecian las membranas depositadas a nivel macroscópico, mientras que al observarse en un microscopio óptico (MO) en las imágenes B y D se evidencia la formación de fibras a partir de las soluciones previamente mencionadas. Sin embargo, se realizaron modificaciones a los parámetros de electrohilado con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas de procesado, tales modificaciones se resumen en la Tabla 3. En la primera etapa de la modificación de los parámetros de electrohilado, para las soluciones uno y dos, se utilizó la modificación de uno de los parámetros, ya sea, flujo, voltaje o distancia, manteniendo constante los otros dos. Se observó que, utilizar un voltaje de 16 kV permitía un flujo constante de la solución polimérica, sin obstruir su paso por la aguja, y una estabilidad en la expulsión del chorro, mientras que no fue así al utilizar voltajes de 17, 15 y 14 kV. Además, al aumentar la distancia de la placa

colectora de aguja a 18 cm permitió una reducción en la observación de las cuentas en MO, por lo que se utilizaron para las demás soluciones, tomándose como condiciones óptimas de procesamiento para la obtención de las membranas nanofibrosas.

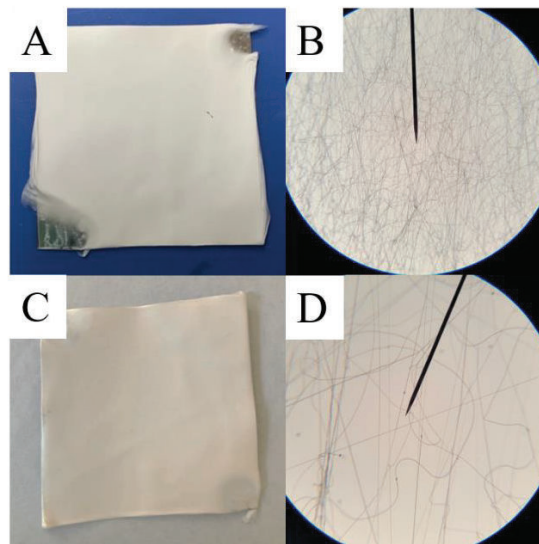


Figura 12. Fotografías de fibras electrohiladas de A) PLA; B) observación al MO, 4x; C) PLA con extracto de *R. hymenosepalus*; D) observación al MO, 10x.

Tabla 3. Parámetros utilizados en el sistema de electrohilado.

Soluciones	PLA (% p/v)	<i>R. hymenosepalus</i> (% peso)	Flujo (mL/h)	Voltaje (kV)	Distancia (cm)
1	10	-	0.8-1.2	14-17	15-18
2	10	10	0.8-1.2	14-17	15-18
3	12	-	0.4-1.0	16	18
4	12	5	0.4-1.0	16	18
5	12	10	0.4-1.0	16	18
6	14	-	0.4-1.0	16	18
7	14	5	0.4-1.0	16	18
8	14	10	0.4-1.0	16	18

De las soluciones utilizadas para la formación de fibras se puede destacar que tanto para las soluciones de PLA al 10 y 12% p/v adicionadas con el extracto de *R. hymenosepalus* en peso se observó la formación de fibras con cuentas en su estructura al MO, esto para cada una de las condiciones modificadas en la reducción del flujo, manteniendo una distancia de 18 cm y un voltaje de 16 kV constantes (imágenes no mostradas). Por otro lado, para las fibras de PLA al 14% p/v se observó una reducción considerable de la formación de estas cuentas, casi nula, esto debido a que el aumento de la concentración del polímero en la solución conlleva a una reducción en la formación de cuentas, relacionado al aumento de la viscosidad de la solución (Casasola., R., y col., 2014). Por ello, tras la obtención de fibras y su monitoreo en microscopía óptica se decidió trabajar con las fibras de PLA al 14% p/v y llevar a cabo su observación en MEB.

4.3 Caracterización

4.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Como parte de la caracterización morfológica de las membranas nanofibrosas obtenidas se tomaron imágenes de MEB para las fibras de PLA puro al 14% p/v y aquellas que fueron adicionadas con el extracto de *R. hymenosepalus* al 5 y 10% en peso, a las cuales se les nombrará a partir de esta sección como PLA, PLA/ERh5 y PLA/ERh10, respectivamente. En la Figura 13, las imágenes A pertenecen a las fibras de PLA, B a las fibras de PLA/ERh5 y C a las fibras de PLA/ERh10. En las imágenes A1, A2 y A3 que corresponden a las fibras de PLA puro con un flujo de inyección de 0.4 mL/h, 0.6 mL/h y 0.8 mL/h, respectivamente, se aprecia la formación de fibras lisas, con superficies uniformes y sin la formación de cuentas en su estructura, mientras que las fibras de la imagen A4 se logró apreciar la formación de cuentas para un flujo de 1.0 mL/h, esto debido al aumento de la velocidad de flujo, así mismo se observa una mayor variación en los diámetros, dando como resultado un aumento en la magnitud de su diámetro promedio como se muestra en la Tabla 4. Para un flujo de 0.4 mL/h se obtuvieron fibras con diámetros promedio de 371 ± 134 nm mientras que para fibras de 1.0 mL/h se obtuvieron diámetros de 461 ± 224 nm. En la figura B1 se aprecian fibras lisas y en su

mayoría con estructuras uniformes, sin embargo, se observó la ruptura superficial de algunas fibras, esto ocasionado por la intensidad del voltaje a bajos flujos de inyección (0.4 mL/h), propiciando que la morfología de las fibras se vea comprometida, lo cual puede influir en sus propiedades mecánicas, también se aprecia la formación de fibras de menores tamaños respecto a las de PLA, obteniéndose diámetros promedio de 344 ± 75 nm. En la figura B2 se aprecian fibras lisas y con superficies uniformes, con estructuras tipo cuentas con formas irregulares que pueden atribuirse a la encapsulación del extracto en esas regiones (Radusin, T., y col., 2019). En este caso también los diámetros son más reducidos respecto a las fibras de PLA, obteniéndose valores de 350 ± 86 nm.

En la imagen B3 se aprecian fibras lisas, uniformes y sin formación de cuentas en su estructura, con diámetros de 420 ± 92 nm. La imagen B4 muestra la formación de fibras lisas y uniformes con la formación de algunas cuentas, lo cual coincide con lo mostrado para las fibras de PLA a 1.0mL/h. Dentro del mismo grupo de fibras de PLA/ERh5 fueron las que presentaron mayores diámetros, con tamaños de 448 ± 111 nm, además que en estas se apreció una reducción del volumen libre, pues se encuentran más compactas lo cual puede repercutir en la infiltración celular al aplicarlas en la lesión, ya que la estructura porosa de estas membranas se asemeja a la MEC nativa y trae consigo algunos beneficios, tales como, la absorción de fluidos, hemostasia, intercambio de gases y el mantenimiento de un ambiente húmedo que favorece la curación de heridas y la regeneración del tejido (Bi, H., y col., 2020). Se observó una reducción en los diámetros promedio de fibra (Tabla 4) para todas las muestras de PLA/ERh5 en comparación con las de PLA puro, acompañado de una mayor homogeneidad en los datos, atribuido a una alta densidad de carga y mayor conductividad de la solución en presencia del extracto, además que la estabilidad de la expulsión del chorro se puede ver influenciada por el establecimiento de las interacciones tipo puente de hidrógeno entre la matriz y el extracto (Pakravan, I., y col., 2012; Yousefi, I., y col., 2017).

En la imagen C1 se muestran fibras lisas, con superficies uniformes y sin la formación de cuentas, que presentaron diámetros promedio de 436 ± 81 nm, diámetros mayores que las fibras de PLA y PLA/ERh5 a un flujo de 0.4 mL/h, lo cual puede atribuirse a la encapsulación de mayor cantidad del extracto no disuelto, engrosándolas por al aumento de la concentración de este. La imagen C2 muestra la formación de fibras lisas, con superficies uniformes y sin la

formación de cuentas, con diámetros de 434 ± 78 nm, muy parecido al anterior mencionado. La imagen C3 muestra la formación de fibras lisas, con superficies uniformes y sin la formación de cuentas, con diámetros de 461 ± 91 nm y en la imagen C4 se aprecia la formación de fibras lisas, con superficies uniformes y con la presencia de cuentas reducida, con diámetros de 551 ± 133 nm. En esta última se observa una mayor variación de las desviaciones de diámetro de fibra dando por entendido una mayor heterogeneidad de la población, además que es consistente el apreciar una estructura más compacta, lo cual puede atribuirse al aumento del diámetro en la formación de fibras que reduce el volumen libre de los poros. También se observa una tendencia al aumento de los diámetros promedio de fibra al incrementar la velocidad de flujo, y se aprecia un mayor control sobre el diámetro de las fibras.

En todas las imágenes se mostró una orientación al azar de las fibras depositadas, lo cual era de esperarse tras haber utilizado una placa colectora plana y estática.

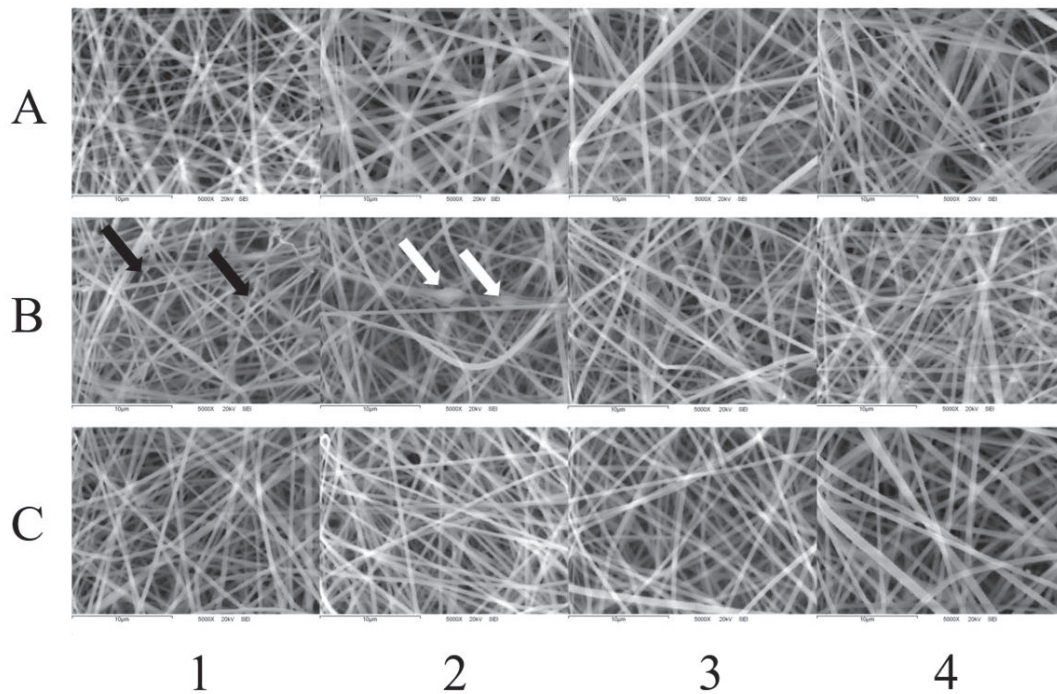


Figura 13. Imágenes de MEB de fibras electrohiladas de PLA al 14% p/v en una solución de DCM/DMF (70:30). A) PLA, B) PLA/ERh5 y C) PLA/ERh10. Según el flujo utilizado para el sistema se dividen en 1) 0.4 mL/h, 2) 0.6 mL/h, 3) 0.8 mL/h, 4) 1.0 mL/h. Para cada una de las muestras se utilizó una distancia de 18 cm y un voltaje de 16 kV. IES, 5000X.

Tabla 4. Diámetros promedio de fibras electrohiladas de PLA al 14% p/v y PLA al 14% p/v adicionadas con el extracto de *R. hymenosepalus* en un 5 y 10% en peso.

Diámetro promedio de fibra (nm)			
Flujo (mL/h)	PLA	PLA/ERh5	PLA/ERh10
0.4	371 ± 134	344 ± 75	436 ± 81
0.6	534 ± 194	350 ± 86	434 ± 78
0.8	461 ± 126	420 ± 92	461 ± 91
1.0	461 ± 224	448 ± 111	551 ± 133

En la Figura 14, se observan los histogramas del comportamiento del diámetro de las fibras donde se evidencia que al aumentar el flujo de las fibras aumenta su diámetro y hay una mayor heterogeneidad entre las poblaciones de fibra para la mayoría de las muestras como se ha mencionado anteriormente. En la primera columna se muestran las distribuciones de diámetro para las fibras de PLA donde, hay poca homogeneidad entre las poblaciones ya que hay fibras desde los 150 nm hasta cercanos a 1 μm para un flujo de 0.4 mL/h, mientras que para los demás presentan diámetros mayores que 1 μm , inclusive cercanos a 1.5 μm . Sin embargo, al incorporar el extracto al PLA se observa una mayor homogeneidad en el diámetro de las fibras. Para PLA/ERh5 y PLA/ERh10, en flujos entre 0.4 – 0.8 mL/h que se mantienen las fibras en un intervalo de diámetro entre los 200 y 700 nm aproximadamente, presentando una mayor frecuencia entre los 300 y 400 nm, mientras que al incrementar el flujo a 1.0 mL/h en ambos se aprecia la formación de fibras por arriba de los 800 nm y cercanos a 1 μm , por lo cual se concluye que el control en los diámetros de fibra se da para este sistema a flujos menores que 1.0 mL/h. Esto demuestra que la incorporación de extractos naturales a las soluciones poliméricas presenta una mayor homogeneidad entre las poblaciones de fibras por efecto del aumento en la conductividad de las soluciones, lo que genera un mayor control en el diámetro al formar las fibras (Yousefi y col., 2017). Además, tomando en cuenta la aplicación enfocada hacia la ingeniería de tejidos, los diámetros obtenidos de las fibras asemejan en tamaño los diámetros de las fibras de colágeno en la MEC nativa de los tejidos que va desde los 90-600 nm (Granados, M. y col., 2017).

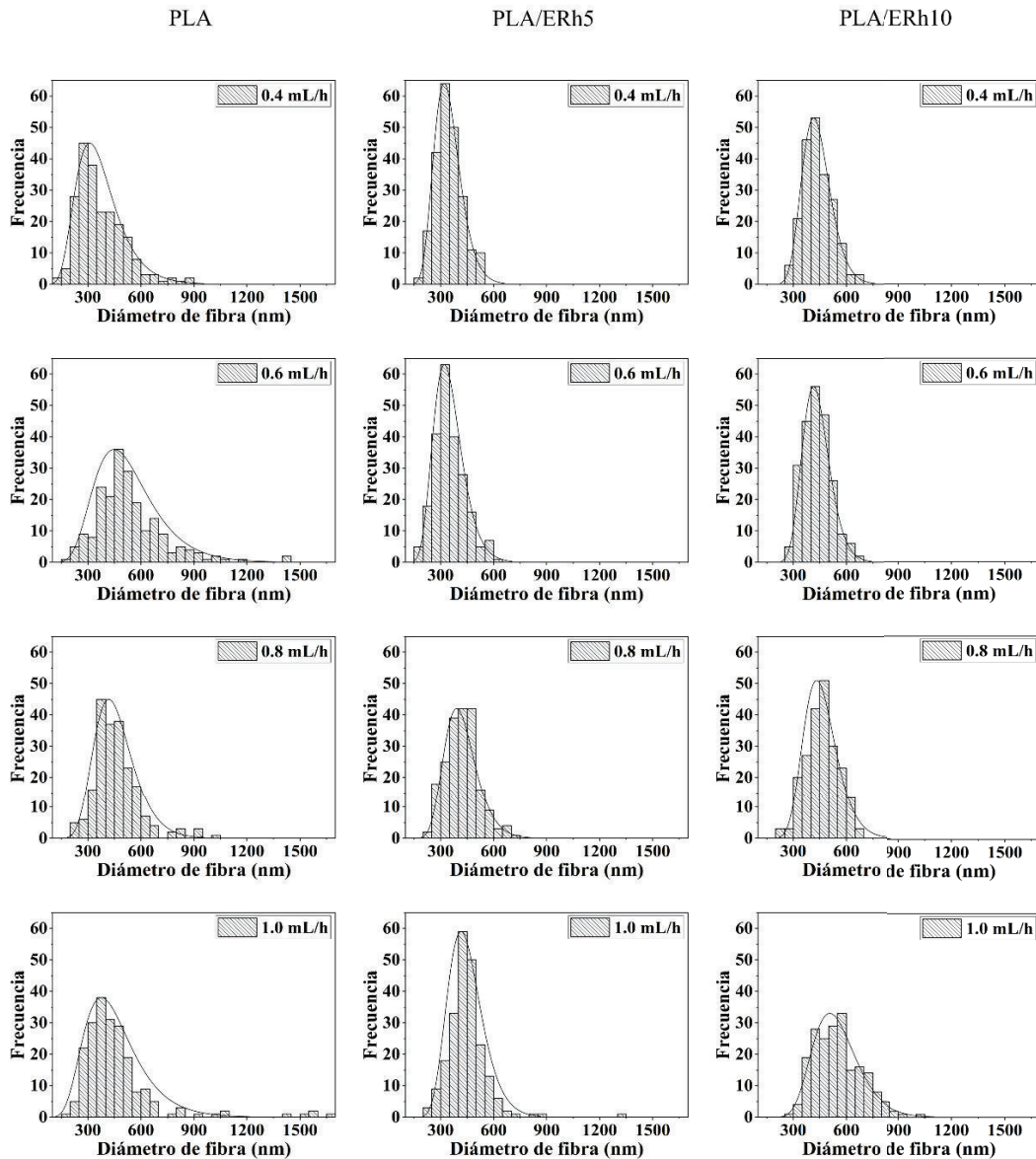


Figura 14. Histogramas del comportamiento del diámetro de fibras de PLA, PLA/ERh5 y PLA/ERh10.

Con base en a los resultados obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido y el análisis de diámetro de fibras se procedió a realizar los demás ensayos con membranas nanofibrosas obtenidas con un flujo de 0.8 mL/h, voltaje de 16 kV y una distancia de 18 cm, tanto para PLA, PLA/ERh5 y PLA/ERh10.

4.3.2 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).

Con la finalidad de comparar el espectro de infrarrojo del extracto obtenido y el extracto utilizado por el grupo de investigación de Rodríguez-León y colaboradores en 2013 y 2015, se tomaron los espectros de infrarrojo de ambos en estado sólido, obteniéndose prácticamente el mismo patrón de señales en el espectro para ambas muestras las cuales se muestran en la Figura 15, donde A es el espectro de infrarrojo del extracto obtenido en este estudio y B es el espectro de infrarrojo es del extracto obtenido por el otro grupo de investigación.

Como resultado, las señales correspondientes a las vibraciones de los grupos funcionales aparecen casi al mismo número de onda en su región específica.

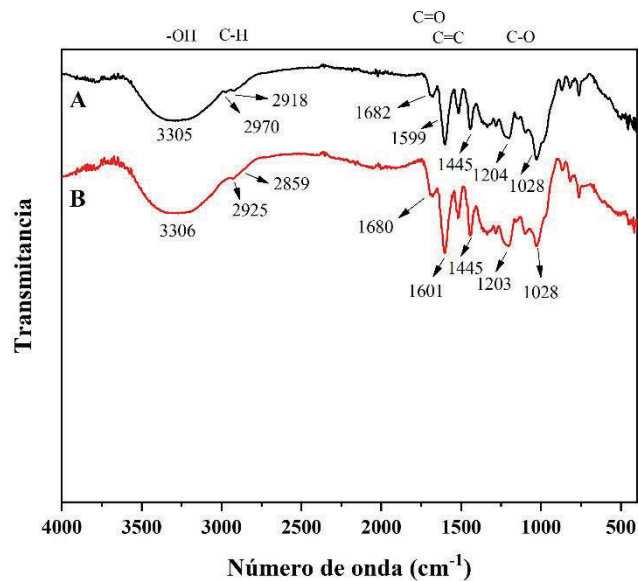


Figura 15. Comparación de los espectros de infrarrojo del polvo de *R. hymenosepalus*: A) extracto obtenido en este estudio y B) el utilizado por Rodríguez-León y col., 2013.

Además, con la finalidad de evaluar la presencia de cada uno de los componentes de las fibras se tomaron los espectros de infrarrojo por FTIR-ATR, los cuales se muestran en la

Figura 16. En primer lugar, se muestra el espectro de las fibras electrohiladas de PLA, donde se observan las señales características de las vibraciones asimétricas y simétricas de los grupos metilo $\nu(\text{C-H})$; el estiramiento del doble enlace carbono-oxígeno del grupo carbonilo $\nu(\text{C=O})$, las deformaciones del grupo metilo $\nu(\text{C-H})$ y el estiramiento carbono-oxígeno del grupo éster $\nu(\text{C-O})$ presentes en su estructura los cuales corresponden respectivamente a números de onda de 2994 y 2946 cm^{-1} ; 1754 cm^{-1} ; 1452 cm^{-1} y 1384 cm^{-1} ; 1184 cm^{-1} y 1089 cm^{-1} (Locilento y col., 2019; Valente y col., 2019; Xu y col., 2009). Dichas señales se mantienen en el espectro que corresponde a las fibras de PLA que contienen el extracto de *R. hymenosepalus* (ERh). Sin embargo, aparecen otras señales, que al comparar con el espectro del extracto en polvo de *R. hymenosepalus* corresponden a las señales de los grupos funcionales presentes en sus componentes principales, tales como epicatequina, epigallocatequina galato, glucósido de estilbeno y *trans*-resveratrol (Figura 27 y 28, ANEXO). La banda ancha típica de los compuestos fenólicos se puede observar a 3305 cm^{-1} , correspondientes a los modos de estiramiento de los diferentes grupos hidroxilo $\nu(\text{-OH})$, las vibraciones asociadas a los anillos aromáticos $\nu(\text{C-H})$, $\nu(\text{C=C})$ se muestran a 2970 cm^{-1} y 1599 cm^{-1} y el estiramiento del doble enlace carbono-oxígeno del grupo carbonilo de la epicatequina galato $\nu(\text{C=O})$ a 1682 cm^{-1} , el estiramiento del enlace carbono-oxígeno del grupo éster $\nu(\text{C-O})$ asociado a las moléculas de catequinas, a 1028 cm^{-1} (Locilento y col. 2019, Rodríguez-León y col., 2018; Torres-Salcido y col. 2020). Al observar el espectro de las fibras que contienen ambos componentes se observa el solapamiento de las señales de PLA y el extracto, con ligeros corrimientos a mayor número de onda de los grupos fenólicos, es decir a menor energía, lo cual está asociado a la debilitación de las vibraciones del grupo hidroxilo por interacciones de tipo puente de hidrógeno, en ese sentido existe una probable interacción entre la cadena principal del PLA y los componentes del ERh.

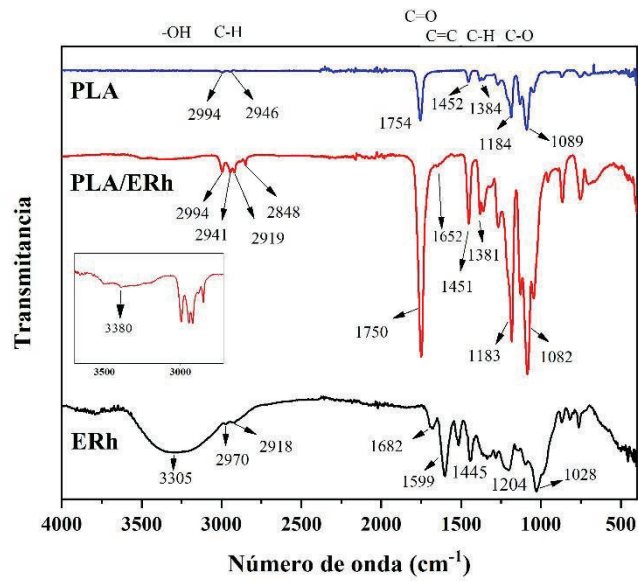


Figura 16. Espectros de infrarrojo de fibras electrohiladas de PLA, fibras electrohiladas de PLA cargadas con extracto de *R. hymenosepalus* y el extracto de *R. hymenosepalus* en polvo.

4.3.3 Análisis Termogravimétrico (ATG).

Se obtuvo el análisis termogravimétrico para el ERh, las fibras de PLA, PLA/ERh5 y PLA/ERh10, los cuales se muestran en la Figura 17. La descomposición de las fibras puras de PLA tuvo un evento de una sola etapa en un intervalo alrededor entre 296 y 372 °C, el cual coincide con el reportado por Locilento y colaboradores en 2019. Para el polvo del ERh, la curva del termograma muestra un evento inicial de pérdida de masa por debajo de los 100 °C asociado con la desorción de agua, seguido de su descomposición en un intervalo de 116 a 725 °C. La curva de derivada del termograma del extracto en la Figura 18, muestra dos picos en el intervalo de temperatura de 116 a 315 °C, seguido de un pico ancho entre 462 y 725 °C, lo que sugiere que muchos procesos superpuestos ocurren como consecuencia de la descomposición compleja del ERh. Las curvas de termograma y la derivada del termograma para las fibras de PLA/ERh5 muestran dos etapas de pérdida de masa debido a la degradación de la matriz polimérica y del ERh encapsulado, respectivamente. La temperatura del segundo pico de degradación, que corresponde a la temperatura de degradación de ERh, disminuyó tras la

encapsulación, probablemente debido a la disolución/dispersión del compuesto bioactivo antes de su encapsulación. Mientras que la temperatura de degradación máxima presentada en la curva de la derivada del termograma, es de 357.21 °C para las fibras puras de PLA, disminuyó para PLA/ERh5 y PLA/ERh10, a 356 °C y 350 °C respectivamente. La disminución de la estabilidad térmica del PLA puede atribuirse al hecho de que el ERh puede intercalar alrededor de las cadenas del PLA y romper las interacciones polímero-polímero (Locilento y col., 2019). También existe una relación directa entre el aumento de la concentración del extracto en las fibras y la disminución de la temperatura de degradación máxima del material, por lo anterior mencionado. Algo importante que puede observarse en el termograma de las fibras que contienen el ERh, es que, en comparación con el ERh puro hay un efecto de protección ante la temperatura de degradación de las primeras descomposiciones del mismo, esto atribuido principalmente a la encapsulación eficiente en la matriz polimérica de PLA, estabilizándose los compuestos bioactivos en el interior de las fibras de polímero, y no es hasta cuando el PLA se degrada cuando se observa la degradación consiguiente de los componentes del extracto.

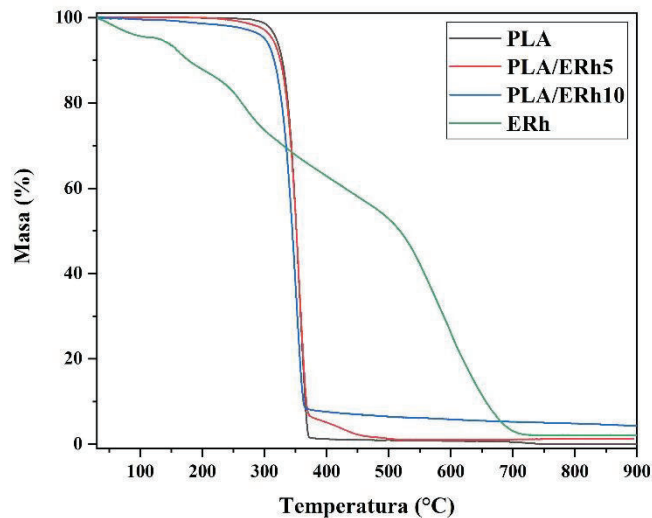


Figura 17. Análisis termogravimétrico de fibras de PLA, PLA cargadas con el extracto en un 5 y un 10% en peso, y el extracto en polvo de *R. hymenosepalus*.

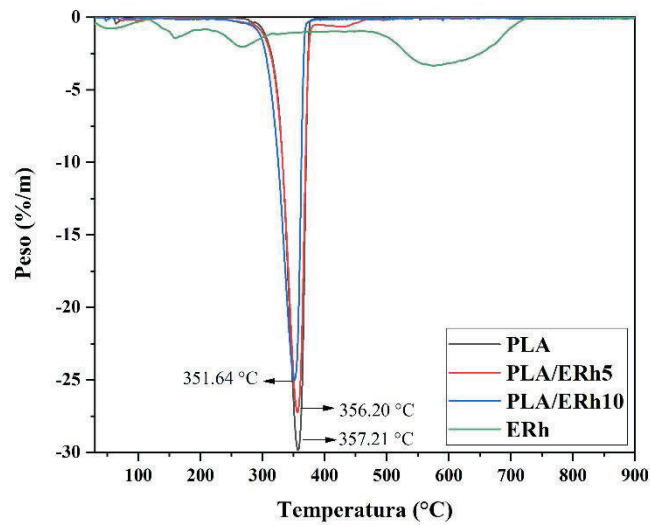


Figura 18. Curva de la derivada de pérdida de masa de fibras de PLA, PLA cargadas con el extracto en un 5 y un 10% en peso, y el extracto en polvo de *R. hymenosepalus*.

4.3.4 Ángulo de contacto.

Los resultados de ángulo de contacto de las distintas fibras mostradas en la Figura 19 se resumen en la Tabla 5, donde se observa que las fibras de PLA presentan un ángulo de contacto característico de un material hidrofóbico como era de esperarse debido a su naturaleza química, asemejándose al valor de 113.6° reportado por Gonçalves y colaboradores en 2015. Las fibras que tienen el extracto presentan poca diferencia del ángulo de contacto como se ha visto por Locilento y colaboradores en el 2019, manteniéndose una superficie hidrófoba.

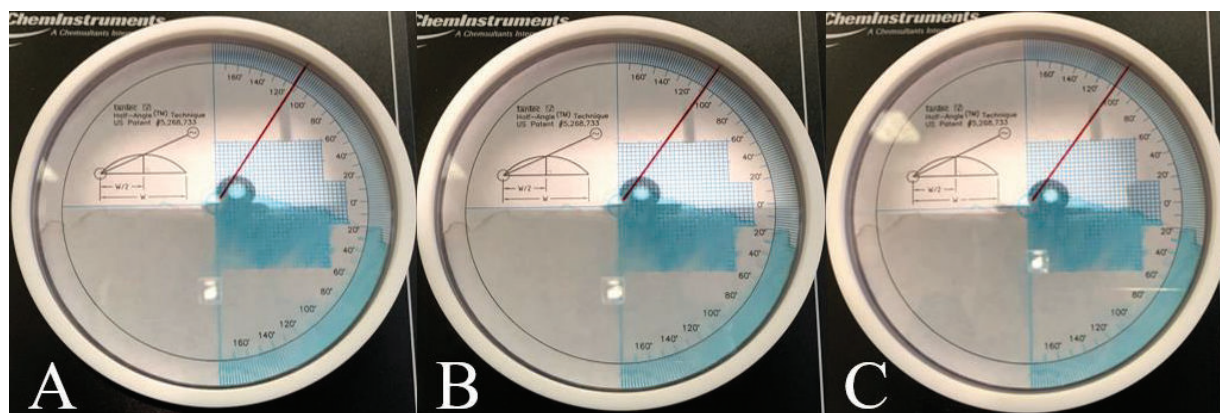


Figura 19. Ángulo de contacto de fibras de: A) PLA, B) PLA/ERh5, C) PLA/ERh10.

Tabla 5. Mediciones de ángulo de contacto.

Material	Humectabilidad θ (°)
PLA	111.4 ± 0.966
PLA/ERh5	109.0 ± 1.414
PLA/ERh10	107.0 ± 0.942

4.3.5 Resonancia magnética nuclear de protón (^1H NMR).

Con la finalidad de identificar la presencia de compuestos químicos del extracto se tomó el espectro de ^1H NMR. En la Figura 20 se muestra el espectro de resonancia tomado para el extracto de *R. hymenosepalus* y las estructuras de EGCG y glucósido de estilbeno, los cuales han sido identificados previamente por Rodríguez-León y colaboradores en 2013, sin embargo, se muestra una aproximación de los grupos de hidrógenos presentes en los compuestos principales del extracto, debido a la complejidad de la muestra. En los estudios obtenidos por Sivakumar, y colaboradores en 2013 y Zhong y Shahidi, en 2011, se reportaron los desplazamientos químicos de las estructuras base de EGCG y *trans*-resveratrol en $\text{DMSO-}d_6$. Por lo tanto, en la Figura 20 se aprecian los grupos importantes en el espectro de resonancia, en donde alrededor de 9 ppm se observa una señal ancha la cual pertenece a los diferentes grupos

fenólicos, es decir, a los protones de los grupos hidroxilo unidos directamente a los anillos aromáticos presentes tanto en EGCG como en *trans*-resveratrol, también están presentes las asignaciones para los hidrógenos de los anillos aromáticos en un desplazamiento químico entre aproximadamente 6 y 8 ppm, finalmente se aprecian multipletes superpuestos entre 3 y 4 ppm, esto atribuido a grupos de protones presentes en el grupo glucósido, mientras que el grupo metilo del grupo glucósido se muestra entre 0.8 y 1.25 ppm (Joseph y col., 2007; Piva y col., 2020; Spectral Data Base for Organic Compounds, Japan). Cabe mencionar que se realizó una aproximación a los desplazamientos químicos esperados para las moléculas individuales, sin embargo, debido a la complejidad de la muestra, se requiere hacer estudios posteriores más profundos.

También dentro del análisis de ^1H NMR (ANEXO) coinciden en la presencia de señales obtenidas con las reportadas por Rodríguez-León y colaboradores en el 2013, donde se observan las señales prácticamente a los mismos desplazamientos químicos, que se les atribuye a moléculas de catequinas y estilbenos, los cuales son compuestos químicos presentes en muchos extractos de plantas. En sus estudios se determinó que epicatequina (EC), epicatequina galato (ECG) y epigallocatequina galato (EGCG), estilbeno glucósido se encontraban presentes debido a la coincidencia de señales correspondientes a las moléculas de polifenoles en comparación con la base de datos (Spectral Data Base for Organic Compounds, Japan), (Joseph, C. y col., 2007; Commodari, y col., 2005). Es imprescindible señalar que en el espectro hay señales presentes que no se reportaron por Rodríguez-León y colaboradores en el 2013. La diferencia de señales se puede atribuir a la eliminación de algunos compuestos tras la obtención de la fracción en tetrahidrofurano (THF) obtenida por este grupo de investigación.

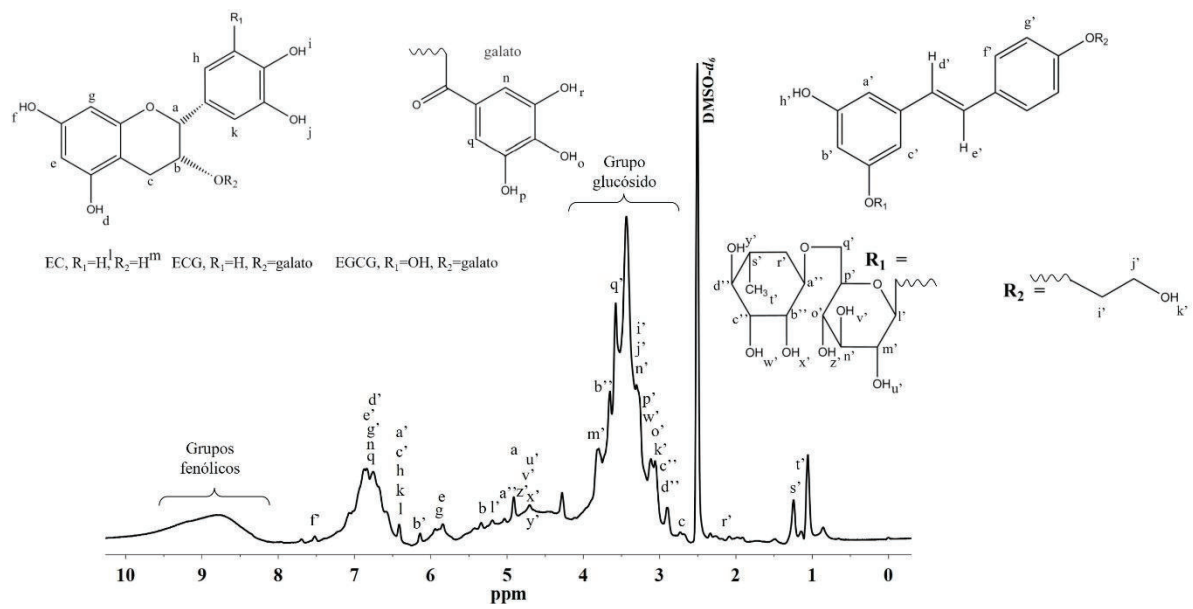


Figura 20. Espectro de ^1H RMN del extracto de *R. hymenosepalus* en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz, (Bruker Advance 400).

4.3.6 Determinación de la eficiencia de encapsulación del extracto de *R. hymenosepalus* en las fibras de PLA.

Se evaluó la eficiencia de encapsulación (EE) del proceso de electrohilado para comprobar que el extracto adicionado inicialmente se mantiene en la deposición final de las fibras, ya que en los últimos años el electrohilado ha resultado ser una propuesta para aprovechar algunos agentes activos como fármacos y aditivos en alimentos. Algunos autores como Locilento y colaboradores en 2019, Radusin y colaboradores en 2019 han demostrado la encapsulación de extractos naturales.

Para esto, se construyó una curva de calibración (Figura 21) a partir de soluciones del extracto de concentraciones conocidas. Una vez obtenida la ecuación de la recta se utilizó para cuantificar la concentración experimental del extracto encapsulado posterior al proceso de electrohilado, que haciendo una relación entre lo anterior mencionado y la concentración teórica del extracto de *R. hymenosepalus*, se expresó en porcentaje de la EE. Se puede observar en la Figura 22, que para fibras de PLA/ERh5 y PLA/ERh10, se determinó que se logró

encapsular un $95.48 \pm 8.48\%$ y un $98.15 \pm 0.65\%$, respectivamente. Los datos anteriormente mencionados coinciden con lo reportado por Locilento y colaboradores en el 2019, donde reporta una encapsulación cercana al 90% para las fibras de PLA obtenidas por electrohilado, indicando que no hay una pérdida considerable del extracto durante el proceso, demostrándose que el proceso de electrohilado es una alternativa eficiente para aislar los componentes bioactivos de los factores ambientales que puedan afectarles, como temperatura, oxidación y también mejorar su estabilidad ante la fotodegradación (Celebioglu y Uyar, 2017).

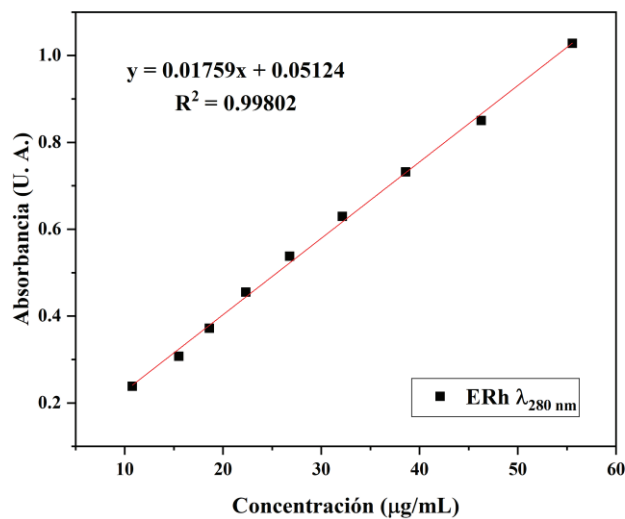


Figura 21. Curva de calibración del extracto de *R. hymenosepalus* en una mezcla de DCM/EtOH (50:50).

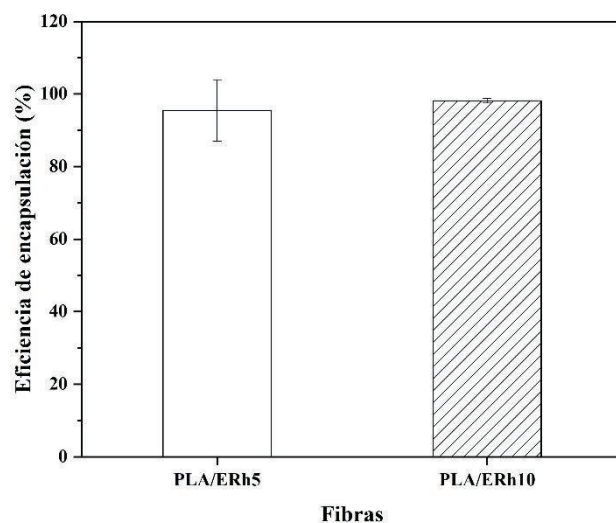


Figura 22. Determinación de la eficiencia de encapsulación del extracto de *R. hymenosepalus* en fibras de PLA posterior al proceso de electrohilado en DCM/EtOH (50:50).

4.3.7 Estudio del perfil de liberación del extracto de *R. hymenosepalus* a partir de las fibras de PLA.

Como parte del estudio del perfil de liberación del extracto de *R. hymenosepalus* en ambiente fisiológico, se construyó una curva de calibración del extracto en PBS (pH de 7.4, a 37 °C) a partir de soluciones del extracto de concentraciones conocidas, obteniéndose la ecuación de la recta la cual se muestra en la Figura 23. A partir de ella se cuantificó la concentración de extracto liberado de las fibras de PLA en función del tiempo que estuvo en contacto con el medio. El comportamiento de la liberación de fármacos cargados en nanofibras electrohiladas puede ser modificado utilizando diferentes combinaciones de polímeros con distinta naturaleza, que pueden ser hidrofóbicos e hidrofílicos. Esta última característica de los andamios puede verse afectada por la polaridad del fármaco incluido, además de su localización en las fibras, es decir, si queda adsorbido en la superficie o bien incluido dentro de la matriz polimérica, además de su concentración, ya que tendrá implicaciones en la interacción al medio que se someta.

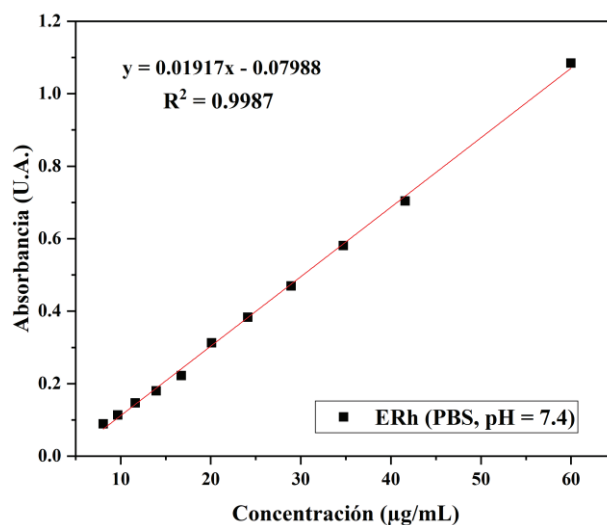


Figura 23. Curva de calibración del extracto de *R. hymenosepalus* en una solución tampón de PBS, pH = 7.4.

La liberación del extracto a partir de las membranas de PLA fue monitoreada por espectroscopía UV-vis a 280 nm, para observar su comportamiento en función del tiempo. En la Figura 24, donde se tienen membranas nanofibrosas de PLA/ERh5 y PLA/ERh10, se logran observar dos comportamientos en el proceso de liberación. Para PLA/ERh5 hay una ráfaga inicial de liberación del fármaco por parte de PLA/ERh5, esto asociado con una mayor cercanía del fármaco hacia la superficie de las fibras. Este comportamiento no persiste por mucho tiempo y el aumento de la concentración liberada durante las primeras 12 horas liberando hasta casi un 50% del extracto presente. Por otro lado, para PLA/ERh10, hay un retraso en la liberación al inicio durante las primeras 12 h, esto se atribuye a que las fibras de PLA/ERh10 presentan diámetros mayores lo que provoca que difunda más lentamente el fármaco hacia el medio, culminando este periodo con un 44% de liberación, dándose un proceso de liberación más lineal y controlado. Sin embargo, a las 24 h hay un aumento en la liberación para PLA/ERh10, asociado con el gradiente de concentración y que el sistema no permita llegar al equilibrio con el medio. Una vez finalizado el experimento y en un periodo de 72 horas, alcanzan un máximo de liberación de casi el 70% y 90% de liberación para PLA/ERh5 y PLA/ERh10, respectivamente. Posterior al tiempo de 72 horas, no fue posible seguir su

comportamiento debido a la presencia de productos de descomposición de las membranas que interfieren con la medición. Que el material comience a descomponerse en tiempos relativamente cortos en tratamiento habla de una liberación y biodisponibilidad de las biomoléculas que no logran difundir en el gradiente de concentración generado. Otra observación importante en el monitoreo de su liberación fue que al estar las membranas en contacto con el medio se iban humectando a medida que pasaba el tiempo, a pesar de sus características hidrofóbicas. Esto puede atribuirse a su estructura porosa, que al estar en contacto con el medio permite la entrada de pequeñas cantidades de este a la matriz y conforme pasa el tiempo posiblemente contribuye a la degradación por hidrólisis de la matriz polimérica y la consecuente liberación del extracto no difundido.

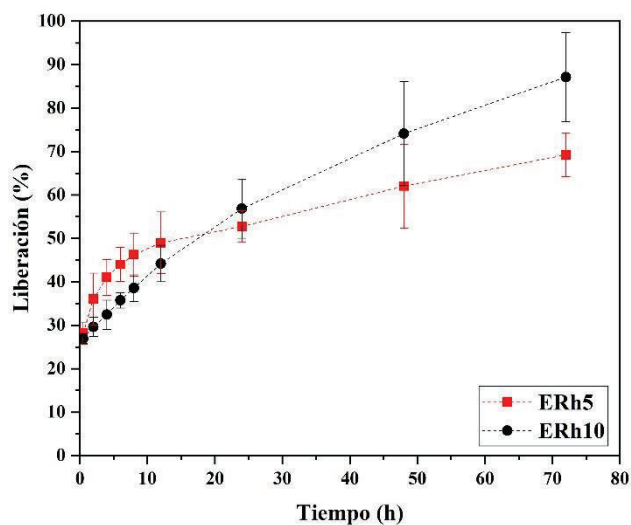


Figura 24. Liberación del extracto de *R. hymenosepalus* a partir de las fibras de PLA en una solución tampón de PBS, pH = 7.4 a 37°C.

El modelo de Korsmeyer-Peppas ha sido utilizado ampliamente para describir de una manera sencilla el mecanismo de liberación de un fármaco a partir de un sistema polimérico (Locilento y col., 2019). Este modelo categoriza los perfiles de liberación basados en el valor del exponente n de su ecuación, como se describió en la metodología. Los valores de la cinética de liberación para las membranas nanofibras de PLA/ERh5 y PLA/ERh10 se muestran en la

Tabla 6. Los valores del exponente n fueron para ambos casos menores a 0.5, lo que sugiere que la liberación del ERh de las nanofibras mostró un mecanismo de difusión tipo Fickiano, en el cual la liberación es causada por un gradiente de concentración entre las nanofibras y el medio de liberación, lo cual era de esperarse siendo un mecanismo típico para materiales planos y membranosos.

Tabla 6. Parámetros estadísticos de los perfiles de liberación *in vitro* del modelo Korsmeyer-Peppas.

Muestra	n	k (min⁻¹)	R²
PLA/ERh5	0.161 ± 0.001	0.323 ± 0.034	0.964 ± 0.013
PLA/ERh10	0.173 ± 0.001	0.277 ± 0.001	0.870 ± 0.001

4.3.8 Evaluación de la Actividad Antioxidante de las Fibras de PLA Cargadas con el Extracto de *R. hymenosepalus*.

Para de determinar la capacidad antioxidante de las fibras de PLA adicionadas con el extracto, se analizó su comportamiento ante la presencia del radical DPPH. Las membranas nanofibras de PLA se utilizaron como control y no mostraron un efecto antioxidante, así mismo los solventes utilizados para la disolución de las membranas no interfieren en las mediciones. Adicionalmente se utilizaron soluciones de ERh donde se ajustaron las concentraciones asociadas a las membranas de PLA/ERh5 y ERh10, dando como resultado para ERh5 y ERh10 una inhibición del radical de 41.6 ± 2.9% y 60.3 ± 1.7%, respectivamente. Así mismo, se obtuvo para las fibras de PLA/ERh5 y PLA/ERh10 una inhibición del radical de 42.4 ± 3.9% y 56.3 ± 0.8%, respectivamente, demostrando con esto, que la actividad antioxidante no se ve afectada por el proceso de síntesis y que aumenta directamente con la concentración del extracto contenido. También demuestra la eficiencia del proceso de electrohilado en la encapsulación y la estabilidad que brinda al incorporar estos compuestos bioactivos a matrices poliméricas (Arrieta y col., 2018; Faki y col., 2019).

Los extractos de plantas como estabilizadores naturales de radicales pueden ser utilizadas para aplicaciones de biomateriales, debido a que la implantación de biomateriales siempre induce respuestas inflamatorias y estrés oxidativo. En consecuencia, las oxidasas se activan y hay generación de ERO en el cuerpo y resulta en daño a los tejidos por muerte celular (Kai y col., 2016). Es por lo que, al utilizar fibras antioxidantes como biomateriales aplicados a la ingeniería de tejidos puede reducir localmente el estrés oxidativo y daños en el tejido relacionados a lo anterior mencionado, resultando en un proceso de curación de heridas más efectivo (Munteanu y col., 2014).

4.3.9 Evaluación *in vivo* del efecto de curación de heridas de las Fibras Electrohiladas de PLA y PLA Cargadas con el Extracto de *R. hymenosepalus*.

Como parte de la última fase experimental, se realizaron estudios *in vivo* con ratas macho Wistar, con la finalidad de analizar la capacidad de curación de heridas en la piel. En la Figura 25 se aprecia en las imágenes de la primera columna los cuatro grupos de ratas estudiados, donde A, C, E y G son imágenes del día uno a partir de la generación de la herida que corresponden a A) el grupo control sin tratamiento (S/TX), C) en contacto con las membranas de PLA puro, E) en contacto con PLA/ERh5 y G) con PLA/ERh10. Mientras que en la segunda columna se observan las heridas al día 12 de los mismos cuatro grupos B, D, F y H. Se observó que para aquellos grupos que fueron sometidos al contacto con las fibras con el extracto presente cerraron primero las heridas en al menos un ejemplar respecto al grupo control, siendo para el grupo G evidente la mejoría de la herida, relacionado a una mayor concentración del extracto en la membrana nanofibrosa lo cual pudo contribuir a su mejoría. Sin embargo, la tendencia por parte de las fibras con PLA puro no mostró una mejoría en la resolución de la herida con respecto al grupo control.

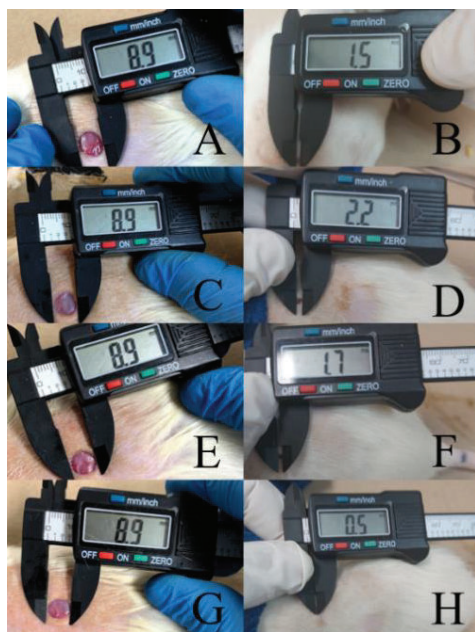


Figura 25. Fotografías de la evolución de curación de heridas de la piel de ratas Wistar. A) Grupo control al día 1. B) Grupo control al día 12. C) Heridas en contacto con fibras de PLA al día 1. D) Heridas en contacto con PLA al día 12. E) Heridas en contacto con PLA/ERh5 al día 1. F) Heridas en contacto con PLA/ERh5 al día 12. G) Heridas en contacto con PLA/ERh10 al día 1. H) Heridas en contacto con PLA/ERh10 al día 12.

Esto mismo puede apreciarse en la Figura 26, donde se muestra el porcentaje del área de la herida para cada grupo: el grupo control sin estar en contacto con algún material, el grupo que estuvo en contacto con PLA puro, el grupo en contacto con PLA/ERh5 y finalmente el grupo en contacto con PLA/ERh10. Estos datos muestran una mejoría significativa en el día cinco para los grupos que estuvieron en contacto con PLA/ERh5 y PLA/ERh10, respecto al grupo control. Esto puede relacionarse a la liberación del extracto a partir de las primeras 24 h y que va en aumento en función del tiempo. Lo anterior mencionado también puede verse influenciado con las dosis suministradas y la concentración del extracto ya que, por otro lado, en el día 12 del experimento el grupo en contacto con PLA/ERh10 mostró diferencia significativa, respecto al grupo control, mientras que PLA/ERh5 no. Es un hecho que los componentes bioactivos del extracto ayudan a la mejora de la herida ya que puede atribuirse con la actividad antioxidante que poseen los polifenoles que ayudan modular la respuesta

inflamatoria a nivel local combatiendo el estrés oxidativo en el tejido circundante. También cabe mencionar que desde el día uno, posterior a la aplicación de las membranas en la herida se observó una adsorción de ellas quedando la herida cubierta por una fina capa del material, permitiendo una interacción más directa con la herida.

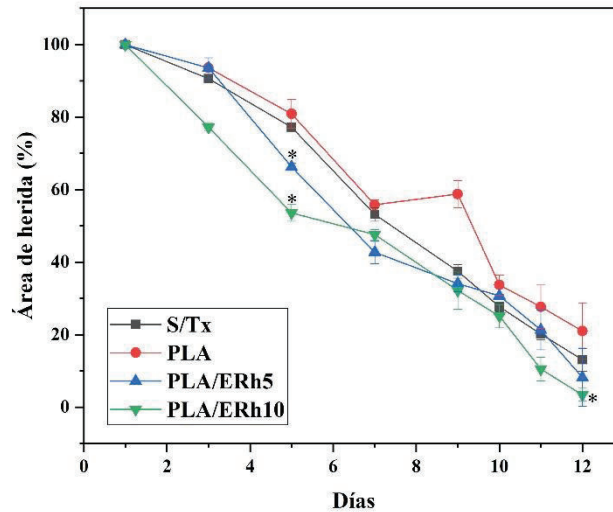


Figura 26. Evaluación de la curación de heridas en piel de ratas Wistar. Grupo control, sin tratamiento (S/Tx), grupo en contacto con PLA, en contacto con PLA/ERh5, en contacto con PLA/ERh10. Un valor de $*p < 0.05$ es considerado estadísticamente significativo (ANOVA).

Como se ha mencionado anteriormente los componentes identificados para el extracto de *R. hymenosepalus* se destacan epicatequina, epigalocatequina galato y *trans*-resveratrol (Rodríguez-León y col., 2013, Rodríguez-León y col., 2013). Está descrito en la literatura que algunos de estos componentes se encuentran relacionados con sus actividades en la cicatrización de heridas, donde se describe que epicatequina galato tiene como diana y actúa a nivel de AKT1, CCL2 y COL1A1, EGFR, GSK3B, HIF1A, IL-6, STAT3, TNF, TRP53, estas son algunos objetivos clave en el proceso de cicatrización que brindan señales asociadas al ensamblaje de colágeno en heridas de la piel y alrededor de vasos sanguíneos, al proceso de reepitelización, angiogénesis, al control de la respuesta inflamatoria y que este no se vea

prolongado, a la regulación de fibrogénesis, apoptosis celular y formación de tejido granular. Mientras que resveratrol también tiene como diana a GSK3B, HIF1A, IL-6, STAT3, TNF. Y epicatequina tiene como diana IL-6. Estas asociaciones resultan en una respuesta de señales químicas que promueven la curación de heridas. Sin embargo, se debe mencionar que estas moléculas pueden actuar sinérgica y pleiotrópicamente (Budovsky y col., 2015).

Un dato importante, es el diámetro de las fibras, que es un factor crítico para el desarrollo de células de piel, ya que se ha estudiado en cultivos *in vitro* de nanofibras electrohiladas con líneas celulares de fibroblastos y queratinocitos, las cuales juegan un papel importante en la cicatrización de heridas de la piel. En este estudio se demostró que la combinación de fibras delgadas y gruesas son apropiadas (diámetros entre 300 y 700 nm) para la regeneración del tejido de la piel, ya que las fibras gruesas estimulan la proliferación celular, mientras que las fibras delgadas estimulan la movilidad celular, lo que resulta en el cierre de la herida (Pelipenko., J y col., 2015). En relación con los diámetros obtenidos de las fibras de PLA/ERh5 y PLA/ERh10 tienen fibras que se asemejan a los diámetros antes mencionados pudo contribuir en la curación de las heridas. Estos resultados obtenidos *in vivo* muestran que se puede mejorar la capacidad de curación de heridas de la piel al utilizarse membranas nanofibrosas antioxidantes, y que en tamaño asemejan la MEC nativa, las cuales pueden aplicarse a la ingeniería de tejidos de la piel.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

Se prepararon y caracterizaron fibras electrohiladas de PLA cargadas con el extracto de *R. hymenosepalus* y se evaluó *in vivo* su potencial terapéutico en la curación de heridas de la piel, resultando en un material con potencial aplicación en la ingeniería de tejidos.

Primeramente, se logró obtener el extracto etanólico de las raíces de la planta *R. hymenosepalus* por maceración con un rendimiento de 25.6%, posterior a ello, se incorporó a las fibras de PLA y se obtuvo un material funcionalizado de PLA/ERh de la cual al variarse su concentración en un 5 y 10%, se determinó que las condiciones óptimas para la síntesis de este material fue el utilizar una concentración de PLA al 14% p/v y parámetros de procesamiento de electrohilado a 0.8 mL/h, 16 kV y 18 cm, a una humedad relativa de $20 \pm 5\%$, esto basado en la distribución de diámetros obtenidos y su morfología. El análisis de FTIR-ATR, mostró que se lograron incorporar con éxito los materiales y además su posible interacción a través del establecimiento de puentes de hidrógeno, mientras que el estudio del análisis termogravimétrico mostró un efecto de protección del extracto frente a altas temperaturas debido a la alta eficiencia de encapsulación obtenida ($> 95\%$), sin afectar las propiedades térmicas del PLA. También se obtuvo el espectro de ^1H RMN para el ERh, donde se logró asignar los grupos de protones presentes en los compuestos principales del extracto, tales como, (-)-EGCG y *trans*-resveratrol.

Se determinó el perfil de liberación del extracto para las fibras por espectroscopía UV-vis, donde se observaron porcentajes de liberación de 70% y 90% para PLA/ERh5 y PLA/ERh10, respectivamente, en un periodo de 72 h, y se determinó que ambas presentaron un mecanismo de difusión Fickano, típico para estos materiales. Adicional se determinó que estas fibras poseen actividad antioxidante por la inclusión de ERh, donde se observó que el proceso de electrohilado no afecta su actividad. Finalmente, en el estudio *in vivo* se observó una mejoría considerable al aplicar las membranas funcionalizadas con el ERh en un periodo de 5 días, mientras que, al final del proceso experimental las fibras de PLA/ERh10 presentaron un proceso de curación de heridas más exitoso, comparado con el grupo control, obteniéndose un material antioxidante con potencial aplicación en la ingeniería de tejidos de la piel.

PERSPECTIVAS

- Realizar una cromatografía para separar los distintos componentes del extracto y un análisis más completo de su perfil fitoquímico.
- Con la finalidad de conocer la superficie de las fibras se recomienda realizar estudios de microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) y analizar su relación con su cultivo celular *in vitro*.
- Sintetizar membranas nanofibrosas de PLA en combinación con un polímero hidrofílico, por ejemplo, óxido de polietileno, comparar las cinéticas de liberación y ver su comportamiento *in vitro* e *in vivo*.
- Realizar pruebas mecánicas para las fibras y cualquier modificación que se les realice.
- Realizar estudios de degradación hidrolítica en distintos ambientes fisiológicos de pH y analizar sus efectos morfológicos en MEB, además de su capacidad de hinchamiento.
- Ajustar con otros modelos matemáticos la liberación del extracto.
- Calcular un IC₅₀ para la actividad antioxidante, así como comparar con otras metodologías de inhibición de radicales como ABTS⁺ o algunos radicales que puedan presentarse a nivel celular.

REFERENCIAS

- Alvarez-Cirerol, F. (2015). Síntesis de nanopartículas de plata empleando extractos de raíz de la cañagria (*Rumex hymenosepalus*) y sus efectos antimicrobianos. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora, México.
- Arrieta, M. P., López, J., López, D., Kenny, J. M., and Peponi, L. (2016). Effect of chitosan and catechin addition on the structural, thermal, mechanical and disintegration properties of plasticized electrospun PLA-PHB biocomposites. *Polymer Degradation and Stability*, 132, 145-156.
- Balusamy, B., Celebioglu, A., Senthamizhan, A., and Uyar, T. (2020). Progress in the design and development of “fast-dissolving” electrospun nanofibers based drug delivery systems-A systematic review. *Journal of Controlled Release*.
- Bi, H., Feng, T., Li, B., and Han, Y. (2020). *In Vitro* and *In Vivo* Comparison study of electrospun PLA and PLA/PVA/SA fiber membranes for wound healing. *Polymers*, 12(4), 839.
- Budovsky, A., Yarmolinsky, L., and Ben-Shabat, S. (2015). Effect of medicinal plants on wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 23(2), 171-183.
- Castillo-Ortega, M.M., Montaña-Figueroa, A. G., Rodríguez-Félix, D. E., Prado-Villegas, G., Pino-Ocaño, K. P., Valencia-Córdova, M. J., Quiroz-Castillo, J.M., and Herrera-Franco, P. J. (2015). Preparation by coaxial electrospinning and characterization of membranes releasing (-) epicatechin as scaffold for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 46, 184-189.
- Celebioglu, A., and Uyar, T. (2017). Antioxidant vitamin E/cyclodextrin inclusion complex electrospun nanofibers: enhanced water solubility, prolonged shelf life, and photostability of vitamin E. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(26), 5404-5412.
- Celebioglu, A., Umu, O. C., Tekinay, T., and Uyar, T. (2014). Antibacterial electrospun nanofibers from triclosan/cyclodextrin inclusion complexes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 116, 612-619.
- Cheng, Y., Deng, S., Chen, P., and Ruan, R. (2009). Polylactic acid (PLA) synthesis and modifications: a review. *Frontiers of chemistry in China*, 4(3), 259-264.

- Commodari, F., Khiat, A., Ibrahimi, S., Brizius, A. R., and Kalkstein, N. (2005). Comparison of the phytoestrogen trans-resveratrol (3, 4', 5-trihydroxystilbene) structures from x-ray diffraction and solution NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43(7), 567-572.
- Ewaldz, E., and Brettmann, B. (2019). Molecular interactions in electrospinning: from polymer mixtures to supramolecular assemblies. *ACS Applied Polymer Materials*. 1(3), 298-308.
- Faki, R., Gursoy, O., and Yilmaz, Y. (2019). Effect of Electrospinning Process on Total Antioxidant Activity of Electrospun Nanofibers Containing Grape Seed Extract. *Open Chemistry*, 17(1). 912-918.
- Gonçalves, R. P., da Silva, F. F., Picciani, P. H., and Dias, M. L. (2015). Morphology and thermal properties of core-shell PVA/PLA ultrafine fibers produced by coaxial electrospinning. *Materials Sciences and Applications*, 6(02), 189.
- Granados, M. V., Montesinos-Montesinos, J. J., y Álvarez-Pérez, M. A. (2017). Adhesión y proliferación de las células troncales mesenquimales de médula ósea en andamios fibrilares de poli (ácido L-láctico) (PLA). *Revista mexicana de ingeniería biomédica*, 38(1). 288-296.
- Jacobs, V., Anandjiwala, R. D., and Maaza, M. (2010). The influence of electrospinning parameters on the structural morphology and diameter of electrospun nanofibers. *Journal of applied polymer science*, 115(5), 3130-3136.
- Joseph, C. C., Moshi, M. J., Innocent, E., and Nkunya, M. H. H. (2007). Isolation of a stilbene glycoside and other constituents of *Terminalia sericeae*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 4(4), 383-386.
- Kabay, G., Demirci, C., Can, G. K., Meydan, A. E., Daşan, B. G., and Mutlu, M. (2018). A comparative study of single-needle and coaxial electrospun amyloid-like protein nanofibers to investigate hydrophilic drug release behavior. *International journal of biological macromolecules*, 114. 989-997.
- Kai, D., Ren, W., Tian, L., Chee, P. L., Liu, Y., Ramakrishna, S., and Loh, X. J. (2016). Engineering poly (lactide)–lignin nanofibers with antioxidant activity for biomedical application. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4(10), 5268-5276.

- Kim, H. S., Sun, X., Lee, J. H., Kim, H. W., Fu, X., and Leong, K. W. (2019). Advanced drug delivery systems and artificial skin grafts for skin wound healing. *Advanced drug delivery reviews*. 146, 209-239.
- Lannutti, J., Reneker, D., Ma, T., Tomasko, D., and Farson, D. (2007). Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 27(3), 504-509.
- Lanza, R., Langer, R., and Vacanti, J. P. (2017). Principles of tissue engineering. 3rd Edition. San Diego (CA): *Elsevier Academic Press*. (23): 323-340.
- Li, Y., and BOU-AKL, T. (2016). Electrospinning in tissue engineering. *Electrospinning-Material, Techniques, and Biomedical Applications*, 117-139.
- Locilento, D. A., Mercante, L. A., Andre, R. S., Mattoso, L. H., Luna, G. L., Brassolatti, P., and Correa, D. S. (2019). Biocompatible and biodegradable electrospun nanofibrous membranes loaded with grape seed extract for wound dressing application. *Journal of Nanomaterials*, 2019.
- Mishra, A. P., Sharifi-Rad, M., Shariati, M. A., Mabkhot, Y. N., Al-Showiman, S. S., Rauf, A., and Sharifi-Rad, J. (2018). Bioactive compounds and health benefits of edible *Rumex* species-A review. *Cellular and Molecular Biology*, 64(8). 27-34.
- Mohabatpour, F., Karkhaneh, A., and Sharifi, A. M. (2016). A hydrogel/fiber composite scaffold for chondrocyte encapsulation in cartilage tissue regeneration. *RSC advances*, 6(86), 83135-83145.
- Munteanu, B. S., Aytac, Z., Pricope, G. M., Uyar, T., and Vasile, C. (2014). Polylactic acid (PLA)/Silver-NP/VitaminE bionanocomposite electrospun nanofibers with antibacterial and antioxidant activity. *Journal of nanoparticle research*, 16(10), 1-12.
- O'brien, F. J. (2011). Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials today*, *Materials today*, 14(3), 88-95.
- Pakravan, M., Heuzey, M. C., and Ajji, A. (2012). Core-shell structured PEO-chitosan nanofibers by coaxial electrospinning. *Biomacromolecules*, 13(2), 412-421.
- Pelipenko, J., Kocbek, P., and Kristl, J. (2015). Nanofiber diameter as a critical parameter affecting skin cell response. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66, 29-35.
- Piva, H. M., Sá, J. M., Miranda, A. S., Tasic, L., Fossey, M. A., Souza, F. P., and Caruso, Í. P. (2020). Insights into interactions of flavanones with target human

respiratory syncytial virus M2-1 protein from STD-NMR, fluorescence spectroscopy, and computational simulations. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 2241.

- Radusin, T., Torres-Giner, S., Stupar, A., Ristic, I., Miletic, A., Novakovic, A., and Lagaron, J. M. (2019). Preparation, characterization and antimicrobial properties of electrospun polylactide films containing *Allium ursinum L.* extract. *Food Packaging and Shelf Life*. 21, 100357.
- Rahmati, M., Mills, D. K., Urbanska, A. M., Saeb, M., Venugopal, J. R., Ramakrishna, S., and Mozafari, M. (2020). Electrospinning for tissue engineering applications. *Progress in Materials Science*, 100721.
- Rodríguez-León, E., Iñiguez-Palomares, R., Navarro, R. E., Herrera-Urbina, R., Tánori, J., Iñiguez-Palomares, C., and Maldonado, A. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (*Rumex hymenosepalus* extracts). *Nanoscale research letters*. 8(1), 318.
- Rodríguez-León, E., Iñiguez-Palomares, R., Navarro, R. E., Rodríguez-Beas, C., Larios-Rodríguez, E., Alvarez-Cirerol, F. J., Iñiguez-Palomares, C., Ramírez-Saldaña, M., Hernández M., J., Martínez-Higuera, A., Galván-Moroyoqui, J. M., and Martínez-Soto, J. M. (2018) Silver nanoparticles synthesized with *Rumex hymenosepalus* extracts: effective broad-spectrum microbicidal agents and cytotoxicity study. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 46:6, 1194-1206.
- Sivakumar, B., Murugan, R., Baskaran, A., Khadangale, B. P., Murugan, S., and Senthilkumar, U. P. (2013). Identification and characterization of process-related impurities of trans-resveratrol. *Scientia pharmaceutica*, 81(3), 683-696.
- Spectral Data Base for Organic Compounds, SDBS by National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan, (Last data updated, September, 18th, 2018) : <https://sdb.sdb.aist.go.jp>.
- Thakur, R., Jain, N., Pathak, R., and Sandhu, S. S. (2011). Practices in wound healing studies of plants. *Evidence-based complementary and alternative medicine*.
- Torres-Salcido, C. E., Rodríguez-Leon, E., Castillo-Ortega, M.M., Ramírez-Bon, R., Moreno-Corral, R., Burruel-Ibarra, S. E., Corella-Madueño, M. A. y Armenta-Villegas,

- L. (2020). Fibras electrohiladas de poli (ácido láctico) adicionadas con extracto de *Rumex hymenosepalus*: preparación y caracterización. *Biotecnia*. XXII (3): 108-115.
- Valente, T. A. M., Silva, D. M., Gomes, P. S., Fernandes, M. H., Santos, J. D., and Sencadas, V. (2016). Effect of sterilization methods on electrospun poly (lactic acid)(PLA) fiber alignment for biomedical applications. *ACS applied materials and interfaces*. 8(5), 3241-3249.
 - VanderJagt, T. J., Ghattas, R., VanderJagt, D. J., Crossey, M., and Glew, R. H. (2002). Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. *Life Sciences*. 70(9), 1035-1040.
 - Virgen-Ortiz, A., Limón-Miranda, S., Soto-Covarrubias, M. A., Apolinar-Iribe, A., Rodríguez-León, E., and Iñiguez-Palomares, R. (2015). Biocompatible silver nanoparticles synthesized using *Rumex hymenosepalus* extract decreases fasting glucose levels in diabetic rats. *Dig. J. Nanomater. Biostruc.* 10, 927-933.
 - Xu, J., Zhang, J., Gao, W., Liang, H., Wang, H., and Li, J. (2009). Preparation of chitosan/PLA blend micro/nanofibers by electrospinning. *Materials Letters*, 63(8), 658-660.
 - Yao, Q., Cosme, J. G., Xu, T., Miszuk, J. M., Picciani, P. H., Fong, H., and Sun, H. (2017). Three dimensional electrospun PCL/PLA blend Nano fibrous scaffolds with significantly improved stem cells osteogenic differentiation and cranial bone formation. *Biomaterials*. (115): 115-127.
 - Yousefi, I., Pakravan, M., Rahimi, H., Bahador, A., Farshadzadeh, Z., and Haririan, I. (2017). An investigation of electrospun Henna leaves extract-loaded chitosan based nanofibrous mats for skin tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 75, 433-444.
 - Zadeh, K. M., Luyt, A. S., Zarif, L., Augustine, R., Hasan, A., Messori, M., Hassan, K.M. and Yalcin, H. C. (2019). Electrospun polylactic acid/date palm polyphenol extract nanofibres for tissue engineering applications. *Emergent Materials*. 2(2), 141-151.
 - Zhong, Y., and Shahidi, F. (2011). Lipophilized epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives as novel antioxidants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(12), 6526-6533.

ANEXO

Tabla 7. Desplazamientos químicos de ^1H RMN para el extracto de *R. hymenosepalus* comparado con los reportados en la literatura: estilbeno glucósido, epigallocatequina galato (EGCG), epicatequina galato (ECG), epicatequina (EC) y trans-resveratrol.

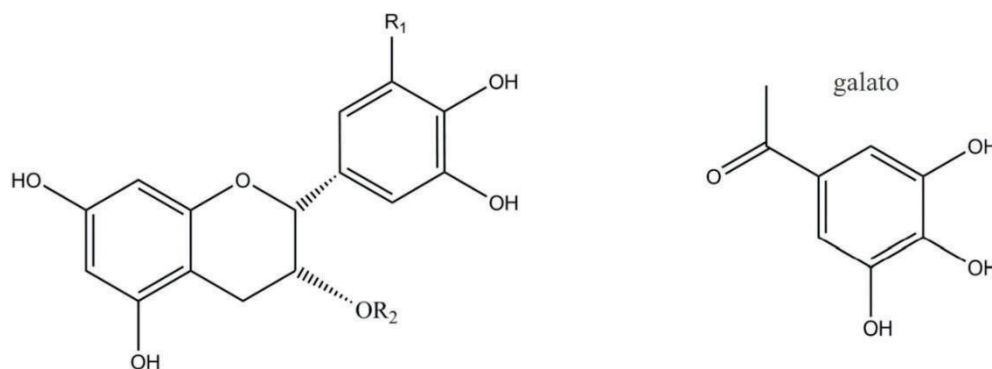
Desplazamiento químico (δ, ppm)						
Extracto de <i>R. hymenosepalus</i> (ERh)	ERh*	Estilbeno glucósido* $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_{13}$	EGCG*	ECG*	EC*	<i>trans</i> -resveratrol ***
9.24						9.48, 9.12
8.74						
7.69						
7.52	7.50	7.49				
7.15						7.35
7.08						
7.02	7.00	6.99		6.99		
6.96						
6.94	6.94		6.95			
6.91						
6.89	6.88			6.88		
6.87	6.86					6.87
6.84		6.85				
6.82	6.82				6.82	
6.75	6.77, 6.74	6.74		6.78		6.71, 6.76
6.67	6.66	6.66				
6.57						
6.41		6.47**				6.34
6.14	6.07					6.07
5.95			6.03	6.03		

5.89						
5.84	5.82				5.82	
5.43						
5.34						
5.19						
5.04	5.03		5.03	5.09		
4.91	4.90	4.90				
4.71	4.73	4.75				
4.57					4.66	
4.47						
4.30						
4.28						
4.26						
3.83	3.90	3.90			3.92	
3.79						
3.77						
3.73						
3.70	3.71	3.71				
3.67	3.68	3.68				
3.65						
3.58	3.57, 3.56	3.58, 3.56				
3.50						
3.47	3.47	3.47				
3.44	3.43	3.44				
3.41						
3.36		3.35**				
3.30						
3.26						
3.19						
3.13						

3.11						
3.09						
3.06						
3.04						
3.02	3.03		3.03	3.03		
2.91						
2.89	2.88		2.89			
2.73						
2.68						
2.67						
2.51	S	S	S	S	S	S
1.25	1.21	1.22				
1.08						
1.06						
1.04						

(*Rodríguez-León y col., 2013; **Joseph y col., 2007; *** Commodari, y col., 2005).

(S) Todas las muestras fueron utilizadas en DMSO-*d*₆.



ec, R₁=H, R₂=H

ecg, R₁=H, R₂= galato

egcg, R₁=OH, R₂=galato

Figura 27. Estructura molecular de las catequinas encontradas en ERh (Rodríguez-León y col., 2013).

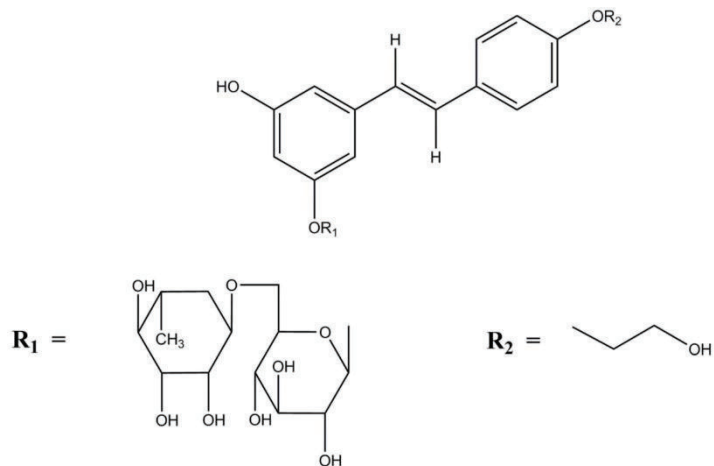


Figura 28. Estructura molecular de estilbeno glucósido encontrado en ERh (Rodríguez-León y col., 2013).

Productos obtenidos:

-Participación en el XIV Coloquio Bienal en Ciencia de Materiales: Responsabilidad Social en Ciencia de Materiales, con la ponencia “Estudios de Biocompatibilidad de Fibras de PLA con Extracto de *Rumex hymenosepalus* Obtenidas Mediante Electrohilado con Potencial Uso en Ingeniería de Tejido”, efectuado en modalidad virtual a través de la plataforma Zoom en Hermosillo, Sonora, México del 10 al 12 de marzo de 2021.