



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO**  
**CAMPUS ENSENADA**

**DESARROLLO DE ANDAMIOS BIOACTIVOS A PARTIR DE**  
**NANOMATERIALES OBTENIDOS POR MÉTODOS ECO-**  
**AMIGABLES**

TESIS  
PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**BIOINGENIERO**

PRESENTA:  
**DANIELA GUADALUPE CASTRO BERTIN**

DIRECTOR:  
DRA. ANA BERTHA CASTRO CESEÑA

CODIRECTOR:  
DR. PRISCY ALFREDO LUQUE MORALES

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MAYO 2019.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

**DESARROLLO DE ANDAMIOS BIOACTIVOS A PARTIR DE NANOMATERIALES  
OBTENIDOS POR MÉTODOS ECO-AMIGABLES**

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**BIOINGENIERO**

PRESENTA:

**DANIELA GUADALUPE CASTRO BERTIN**

Aprobada por:



---

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña  
Director  
(Presidente)



---

Dr. Priscy Alfredo Luque Morales  
Codirector  
(Vocal)



---

Dr. Rubén César Villarreal Sánchez  
Sinodal  
(Vocal)



---

Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez  
Sinodal  
(Secretario)

## RESUMEN

De la tesis de Daniela Guadalupe Castro Bertin, presentada como requisito para la obtención del título de BIOINGENIERO. Ensenada, Baja California, Mayo 2019.

### DESARROLLO DE ANDAMIOS BIOACTIVOS A PARTIR DE NANOMATERIALES OBTENIDOS POR MÉTODOS ECO-AMIGABLES

Resumen aprobado por:



---

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña  
Director



---

Dr. Priscy Alfredo Luque Morales  
Codirector

En el presente trabajo, se desarrollaron andamios bioactivos a base de un biopolímero, alginato de calcio, incorporando metil éter metacrilato de polietilenglicol (PEGMA), nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) biogénicas y extracto de *Moringa oleifera*, para su aplicación como andamio en cicatrización de heridas. El análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) mostró andamios porosos con un tamaño de poro entre 50 - 150 nm. La incorporación de nanopartículas de ZnO (5 mg por andamio) proporcionó a los apósitos capacidad antioxidante, un 22% de inhibición de la oxidación. Todos los andamios mostraron actividad anti-inflamatoria, relacionada con la remoción de óxido nítrico (NO) en el medio. Los materiales compuestos alginato-PEGMA-M.O -ZnO mostraron actividad antimicrobiana contra *K. pneumoniae* y *B. subtilis*, después de la incorporación de 5 mg de ZnO y 6 mg de *M. oleifera* por andamio. En este trabajo se desarrollaron materiales porosos con actividad antimicrobiana, antioxidante y anti-inflamatoria. Basado en lo anterior, los materiales obtenidos, pueden ser una buena opción para su aplicación en cicatrización de heridas.

**Palabras clave:** alginato, andamio, *M. oleifera*, nanopartículas de óxido de zinc

## DEDICATORIA

*Con mucho cariño, a mis padres, por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida y me han permitido culminar con esta etapa. Además, gracias, por creer en mí y brindarme el amor y la motivación necesarias para seguir adelante.*

*A mi hermana Perla, por estar en los momentos difíciles y apoyarme cuando más lo necesitaba.*

*Por último, me dedico este trabajo a mí, por todo el esfuerzo y el tiempo que invertí en desarrollarlo, permitiéndome adquirir nuevos conocimientos, así como aprender de mis errores y mejorar en diferentes aspectos de mi vida.*

*El éxito consiste en obtener lo que se desea. La felicidad, en disfrutar lo que se obtiene. Ralph Waldo Emerson.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Ana Bertha, por aceptarme en su grupo de investigación, por brindarme su paciencia y todas sus enseñanzas, y por permitirme la iniciación de este proyecto.

Al Dr. Priscy Luque, por todo el apoyo y el tiempo brindados para que el proyecto saliera adelante.

A la Dra. Johanna Bernáldez Sarabia por su disposición y los conocimientos brindados durante la realización de los experimentos.

A mis mejores amigos de Ensenada y de mi pueblo, por estar conmigo siempre, haciéndome reír y apoyándome en todo momento.

A mis amigos del laboratorio: Lesly, Alejandra, Aurora, Erick, Joaquín, y Edith por apoyarme en el día a día, brindarme su amistad y por estar conmigo cuando más se necesitaba, muchas gracias.

Agradezco al CONACYT por la beca brindada por el proyecto número 4940 de problemas nacionales 2017 durante la realización de este trabajo de tesis de licenciatura.

Ing. Luis Gradilla de Ciencias de la Tierra, CICESE por su ayuda con las imágenes SEM.

## **PRESENTACIONES**

Castro-Bertin, D., Castro-Ceseña, A.B., Bernáldez-Sarabia J., Luque-Morales P.A., Gomez-Aparicio L.S., Licea-Navarro A. POSTER: “Biopolymer-zinc oxide dressings for wound healing applications”. V Simposio Internacional de Nanociencias y Nanotecnología, CNyN-UNAM, México, 02 de abril 2019.

# CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>ix</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>xv</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	<b>xvii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
Cicatrización de heridas.....	3
Andamios.....	5
Gelatina .....	5
Alginato.....	6
Nanopartículas de ZnO.....	8
Moringa oleifera .....	9
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>9</b>
<b>3. HIPOTESIS</b> .....	<b>13</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
Materiales .....	15
Preparación del extracto acuoso de M. oleifera.....	15
Preparación del material gelatina-ZnO .....	15
Preparación del material alginato-Ca-PEGMA.....	16
Incorporación de los compuestos bioactivos ZnO y M. oleifera .....	16
Determinación de la microestructura de los andamios .....	17
Actividad antioxidante de los materiales por ABTS •+.....	18
Actividad anti-inflamatoria (relacionada a remoción de óxido nítrico) de los materiales compuestos .....	19
Liberación de los compuestos bioactivos, ZnO y M. oleifera .....	19
Actividad antimicrobiana.....	20

Absorción de agua de los materiales compuestos.....	20
Ensayo de inhibición de la actividad de la colagenasa .....	21
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>22</b>
Actividad antioxidante y anti-inflamatoria de nanopartículas (NPs) de óxido de zinc (ZnO) .....	22
Apariencia y microestructura de los materiales compuestos por microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	24
Capacidad antioxidante y anti-inflamatoria de los materiales compuestos .	28
Liberación de los compuestos bioactivos ZnO y M. oleifera .....	31
Actividad antimicrobiana del material compuesto ZnO – M. oleifera .....	33
Ensayo de inhibición de colagenasa de los compuestos bioactivos ZnO y M.O.....	35
Absorción de agua del material compuesto .....	37
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>39</b>
<b>8. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>40</b>
<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>41</b>
<b>10. ANEXO 1.....</b>	<b>48</b>

## INDICE DE FIGURAS

- Fig. 1.** Estructura química de los bloques G, M y cadena alterna de G-M. Tomada de Lee y Mooney, 2012..... 7
- Fig. 2.** Mecanismo de entrecruzamiento de alginato y catión  $Ca^{2+}$ . Tomada de Abdul Khalil et al., 2017..... 7
- Fig. 3.** Diagrama de proceso de fabricación de materiales compuestos alginato-Ca-PEGMA-ZnO-M.O. Síntesis de NPs de ZnO (a). Incorporación de compuestos bioactivos (b). Dispersión de NPs de ZnO en solución (c). Enmoldamiento (d). Congelamiento y liofilización (e)..... 17
- Fig. 4.** Actividad antioxidante de ZnO en  $H_2O_d$ . Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n=4/grupo)..... 22
- Fig. 5.** Actividad anti-inflamatoria de ZnO en  $H_2O_d$ . Las barras de verticales representan la desviación estándar de las medias (n=4 /grupo)..... 24
- Fig. 6.** Imágenes de los andamios de gelatina-ZnO y alginato-ZnO. SEM muestra la microestructura de la superficie de los materiales. Andamio de gelatina blanco (A), material gelatina-ZnO (B), alginato-PEGMA (C), alginato-PEGMA-ZnO (D)..... 26
- Fig. 7.** Imágenes de materiales compuestos alginato:gelatina-ZnO 5mg/ml. (A) Alginato:gelatina(25:75)-ZnO, (B) alginato:gelatina(50:50)-ZnO alginato:gelatina(75:25) – ZnO (C) y alginato:gelatina(100:0) – ZnO (D). ..... 27
- Fig. 8.** Fotografías de materiales con los compuestos bioactivos. Alginato-PEGMA (a), Alginato-PEGMA – ZnO (b), Alginato-PEGMA-M.O (c) y Alginato-PEGMA -M.O-ZnO (d)..... 27
- Fig. 9.** Actividad antioxidante de los materiales compuestos. Alginato-Ca-PEGMA (blanco), ZnO=alginato-PEGMA-ZnO, M.O=alginato-PEGMA-M. oleifera, M.O-ZnO=alginato-PEGMA-M. oleifera-ZnO. Las barras de verticales representan la desviación estándar de las medias (n=4 /grupo)..... 29

**Fig. 10.** Porcentaje de remoción de NO en el medio. alginato-Ca-PEGMA. PEGMA= Alginato-Ca-PEGMA, ZnO= Alginato-Ca-PEGMA-ZnO, M.O = Alginato-Ca-PEGMA-M. oleifera, M.O-ZnO= Alginato-Ca-PEGMA-M.O-ZnO. Las barras verticales representan las desviaciones estándar de las medias (n=4/ grupo). ..... **31**

**Fig. 11.** Porcentaje de liberación de los compuestos bioactivos incorporados en la matriz alginato-Ca-PEGMA. PEGMA= alginato-Ca-PEGMA, ZnO= alginato-Ca-PEGMA-ZnO, M.O= alginato-Ca-PEGMA-M. oleifera, M.O-ZnO= alginato-Ca-PEGMA-M.O-ZnO. Las barras verticales representan las desviaciones estándar de las medias (n=3)..... **33**

**Fig. 12.** Actividad antimicrobiana de los materiales compuestos por método de difusión en agar. Utilizando apósito comercial alginato-Ag como control positivo (C+), alginato-Ca-PEGMA (blanco), ZnO=alginato-ZnO, M.O=alginato-M. oleifera, M.O-ZnO=alginato-M. oleifera-ZnO. Diámetro de zonas de inhibición. Ensayo contra *P. aureginosa* (**A, A'**). *E. coli*. (**B, B'**) *K. pneumoniae*. (**C, C'**) Actividad contra *B. subtilis* (**D, D'**). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias (n=3). ..... **366**

**Fig. 13.** Ensayo de inhibición de la collagenasa de los materiales compuestos. ZnO=Alginato-ZnO, M.O= alginato-M. oleifera, M.O-ZnO= alginato-M. oleifera-ZnO. .... **37**

**Fig. 14.** Ensayo de absorción de agua de los materiales compuestos. Las barras verticales representan las desviaciones estándar de las medias (n=3)..... **38**

## INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Proceso normal de cicatrización de una herida. Tomada de Falanga, 2005.</i> .....	<b>3</b>
---	----------

## INTRODUCCIÓN

Una herida puede ser un daño interno o externo, el cual se produce al golpear o cortar algún un tejido, como la piel, por ejemplo. Cuando se produce una herida sobre la piel, el tejido queda expuesto a diversos patógenos que pueden causar infección y alterar el proceso de cicatrización (Dunnill et al., 2015). Las heridas pueden clasificarse como agudas o crónicas, de acuerdo al tiempo de cicatrización de la herida (Mayet et al., 2014). Una herida aguda cicatriza dentro de un periodo de tiempo corto y no se alteran las etapas de cicatrización (coagulación, inflamación, producción de matriz extracelular y remodelación de tejido). Mientras que, una herida crónica se define cuando no ocurren normalmente las fases de cicatrización debido a una prolongación en la inflamación, retrasando la cicatrización de la herida por meses o incluso años (Frykberg y Banks, 2015).

Los tratamientos tradicionales como gasas o algodón, no promueven de manera significativa el proceso de cicatrización de heridas crónicas, donde las fases de cicatrización son prolongadas (Khorasani et al., 2018). Actualmente, los andamios son una alternativa para facilitar el proceso de cicatrización. Un andamio es una estructura tridimensional de un determinado material, que provee soporte y actúa como barrera física para la protección de una herida (O'Brien y Fergal 2011; Rubio-Elizalde et al., 2019). Para la fabricación de andamios, se buscan materiales que presenten propiedades que promuevan el proceso de cicatrización. Una de las características más importantes, es la biocompatibilidad del material, para no generar una respuesta inadecuada en el sitio de la herida (Liang, et al., 2016). Existe una variedad de materiales aptos para su aplicación como andamios, donde la elección del mismo dependerá de las características propias de la herida a tratar. Los materiales sintetizados a partir de fuentes naturales, como plantas, son conocidos como biopolímeros. El alginato es un biopolímero, que posee alta biocompatibilidad y biodegradabilidad, así como propiedades hemostáticas, haciéndolo un material apropiado para su aplicación en cicatrización de heridas (Cheng et al., 2017).

Para mejorar el efecto de un andamio, pueden incorporarse compuestos con bioactividad, la cual promueva y mejore el proceso cicatrización (Mayet et al., 2014). Se ha encontrado que extractos de plantas poseen compuestos químicos que exhiben propiedades analgésicas, anti-inflamatorias y antioxidantes (Anwar et al., 2006). Por ejemplo, la planta *Moringa oleifera* ha sido reconocida y ampliamente utilizada por sus propiedades terapéuticas, tales como actividad antimicrobiana, anti-inflamatoria y promoción de la proliferación de fibroblastos (Rubio-Elizalde et al., 2019). Esas propiedades se atribuyen a los compuestos fenólicos y flavonoides del extracto de la planta (Vongsak et al., 2013).

Recientemente, las nanopartículas de óxidos metálicos tienen gran importancia debido a potenciales aplicaciones en diversas áreas. En particular, Las nanopartículas de ZnO poseen propiedades como biocompatibilidad, no toxicidad, y actividad antimicrobiana, haciéndolas candidatos adecuados para aplicaciones biomédicas (Jamdagni et al., 2016).

En este proyecto de tesis se propone el desarrollo y caracterización de andamios a base de alginato-*M. oleifera* y nanopartículas de ZnO para su aplicación en cicatrización de heridas.

## MARCO TEÓRICO

### Cicatrización de heridas

El proceso de cicatrización consiste en cuatro etapas altamente integradas: hemostasis, inflamación, proliferación y remodelamiento del tejido. Las fases deben ocurrir en la secuencia adecuada y en un tiempo específico para que el proceso se lleve a cabo completamente (Guo y DiPietro, 2010). La primera fase de hemostasis ocurre inmediatamente después de la herida, con procesos de constricción vascular (Tabla 1). Enseguida, al iniciar el proceso de inflamación de la herida, inicia la infiltración secuencial de neutrófilos, macrófagos, y linfocitos, dando inicio a la cascada secuencial de cicatrización (Mayet et al., 2014).

**Tabla 1. Proceso normal de cicatrización de una herida.** Tomado de Falanga, 2005.

Fase	Eventos celulares y fisiológicos
Hemostasis	Constricción vascular, agregación plaquetaria, desgranulación Formación de coágulo de fibrina.
Inflamación	Reclutamiento de células, infiltración de neutrófilos y monocitos y diferenciación de macrófagos
Proliferación	Inicio de la re-epitelización, Angiogénesis, Síntesis de colágeno Formación de matriz extracelular (MEC)
Remodelado	Depósito de colágeno en herida Maduración vascular Formación de cicatriz

Muchos factores pueden interferir en las fases del proceso de cicatrización, provocando que el tejido no se repare. Los factores que influyen en el proceso, pueden ser locales o sistémicos. Los factores locales como la oxigenación, infección e insuficiencia venosa afectan directamente en las características de la herida. Mientras que los factores sistémicos, se relacionan con el estado de salud del paciente, que influye en el proceso de cicatrización de heridas (Guo y DiPietro, 2010). La prolongación en el proceso, puede provocar una cicatrización tardía o una herida crónica que no cicatriza, lo cual, generalmente ocurre en condiciones patológicas como la diabetes o insuficiencia venosa, ocasionando heridas crónicas, donde se ve obstaculizada la cicatrización, provocando úlceras y contaminaciones fisiológicas graves (Mayet et al., 2014). Las heridas crónicas comparten características y comportamientos comunes, como inflamación prolongada, exceso en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), de proteasas y células senescentes (Frykberg y Banks, 2015).

La falla en el proceso de cicatrización de heridas crónicas se ha atribuido, en parte, al desequilibrio en los niveles de las proteasas, por ejemplo, metaloproteinasas de matriz (MMP) como colagenasa y gelatinasa, que se han encontrado estar elevadas en un ambiente de herida crónica. (Eming et al., 2014).

Si los niveles de las proteasas exceden a sus inhibidores, existe una degradación de los componentes de la matriz y de los factores de crecimiento requeridos para la formación de la matriz extracelular (MEC), atrayendo un mayor número de células inflamatorias, prolongando así, el ciclo de inflamación en la herida (McCarthy y Percival, 2013).

Las células del sistema inmunológico producen ROS, como defensa contra diversos microorganismos, sin embargo, en heridas crónicas la producción de ROS incrementa, excediendo los niveles óptimos y provocando estrés oxidativo, lo que genera un daño celular y deterioro en la cicatrización de la herida (Dunhill et al., 2015).

Las concentraciones tóxicas de ROS y la presencia de colonias bacterianas productoras de biopelículas en la herida, son considerados factores importantes en

el desarrollo de las heridas crónicas (Dhall et al., 2014). Sin embargo, una infección microbiana, puede ser otro factor que contribuya a la prolongación de la cicatrización de una herida y volverla crónica, por la producción continua de mediadores inflamatorios, reducción de fibroblastos y competencia con las células por los nutrientes y el oxígeno (Shreml et al., 2010). Por lo tanto, los niveles de ROS, deben estar en equilibrio para que actúe como agentes antimicrobianos y como moléculas de señalización, ayudando a eliminar microorganismos presentes en la herida (Eming et al., 2014).

### **Andamios**

Los andamios son estructuras tridimensionales que proveen soporte para la formación de un nuevo tejido, cubren la herida, y actúan como barrera física contra infecciones externas, además son una alternativa para promover la cicatrización de heridas. Diversos materiales son utilizados para la preparación de andamios, su uso depende de la función a llevar a cabo, así como del tipo de herida. Los materiales a utilizarse, deben presentar características imprescindibles, como biodegradabilidad, biocompatibilidad, no toxicidad, y propiedades mecánicas que lo hagan apto para su aplicación en una herida (O'Brien y Fergal 2011).

Asimismo, la composición y las propiedades del andamio, juegan una función importante en la modificación del microentorno de la herida, donde por medio de su estructura tridimensional pueden facilitar la unión, proliferación y diferenciación celular (Zhong et al., 2010).

### **Gelatina**

La gelatina es un producto de la hidrólisis parcial del colágeno, la cual se caracteriza por ser biocompatible, no inmunogénica y biodegradable. La gelatina puede formar estructuras tridimensionales porosas que proporcionan sitios de adhesión celular, por ello, ha sido ampliamente utilizada como apósito en cicatrización de heridas (Yang et al., 2018). Además, la aplicación de la gelatina como andamio para las

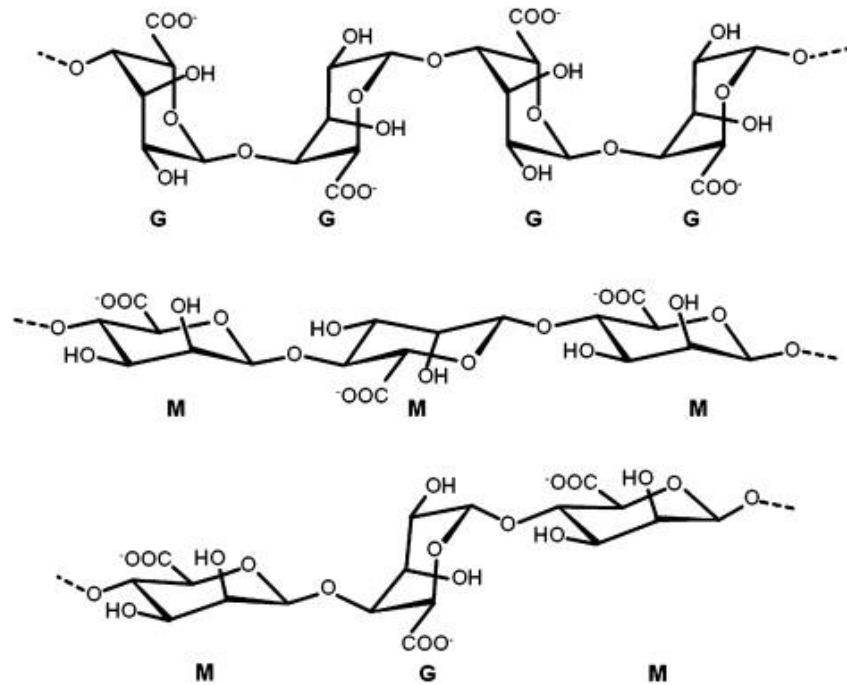
heridas ha mostrado mejorar la unión celular, permitiendo la conexión y señalización celular (Kim et al., 2014). Sin embargo, la alta solubilidad de la gelatina en medio acuoso presenta una desventaja para su aplicación como biomaterial, de manera que los materiales de gelatina se entrecruzan para mejorar su estabilidad y sus propiedades mecánicas que permitan su aplicación como andamios (Yeh et al., 2012).

## **Alginato**

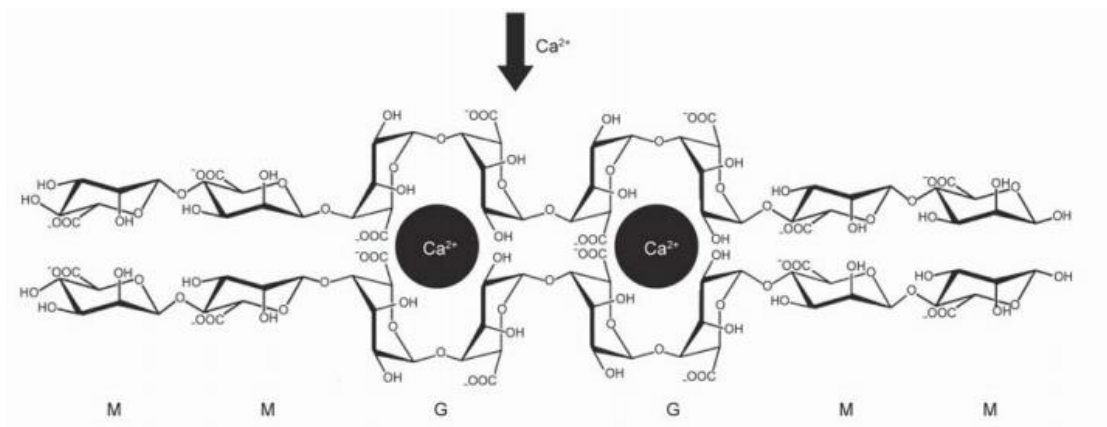
El alginato es un polímero aniónico que comúnmente se extrae de algas pardas (*Phaeophyceae*), incluyendo *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera*, mediante tratamiento con soluciones alcalinas. El alginato es soluble en soluciones acuosas, a temperatura ambiente, y forma geles estables mediante la adición de cationes divalentes, como el calcio, ( $\text{Ca}^{2+}$ ). El alginato es un polímero natural con amplias aplicaciones debido a sus propiedades como hidrofiliidad, biocompatibilidad, bajo costo y baja toxicidad (Lee y Mooney, 2012).

El alginato se compone de bloques de residuos alternos de ácido gulurónico (G) y manurónico (M) unidos (Koga et al., 2018). Los bloques se componen de residuos G consecutivos, residuos M consecutivos y residuos M y G alternos (**Fig. 1**). Los alginatos extraídos de diferentes fuentes difieren en el contenido de M y G (Qin, 2007).

Solo los bloques G del alginato interactúan con los cationes divalentes, por ejemplo,  $\text{Ca}^{2+}$  para formar hidrogeles (**Fig. 2**) La composición (M/G), la longitud del bloque G, son factores que afectan las propiedades físicas del alginato y los hidrogeles que puedan formar (George y Abraham, 2006).



**Fig. 1. Estructura química de los bloques G, M y cadena alterna de G-M.** Tomada de Lee y Mooney, 2012.



**Fig. 2. Mecanismo de entrecruzamiento de alginato y catión  $\text{Ca}^{2+}$ .** Tomada de Abdul Khalil et al., 2017.

El uso de alginato en apósitos, se debe a su capacidad para la formación de geles al absorber los exudados de la herida, limitando las secreciones de la herida lo que reduce la contaminación bacteriana (Boateng et al., 2008).

### **Nanopartículas de ZnO**

El óxido de zinc (ZnO) es un material inorgánico, que tiene propiedades físicas y químicas que permiten su aplicación en diversas áreas. Las propiedades del ZnO se pueden modificar al reducir su tamaño a la escala nanométrica, ya que las nanopartículas de ZnO (NPs de ZnO) muestran propiedades físicas, químicas y estructurales diferentes (Ahmed, et al., 2017). Por ejemplo, cuando el tamaño de la partícula se reduce a la escala nanométrica, el ZnO muestra actividad antibacteriana importante contra un amplio espectro de especies bacterianas (Sirelkhatim et al., 2015).

Las NPs de ZnO son utilizadas principalmente como dispersoras de luz UV en protectores solares, pastas dentales y cosméticos (Serpone et al. 2007). Sin embargo, las NPs ZnO tienen, además, amplias aplicaciones en biomedicina debido a su biocompatibilidad y sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y anti-inflamatorias, y por lo tanto, como agente para promover la cicatrización de heridas (Yadav et al., 2018; Mishra et al., 2012).

La actividad antimicrobiana de NPs de ZnO incluye bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. Esa actividad está relacionada con el tamaño de partícula, es decir, a menores tamaños de partícula, se muestran mayores porcentajes de actividad antimicrobiana (Jamdagni et al., 2016). Las NPs de ZnO promueven una serie de mecanismos que le permiten actuar como agente antimicrobiano. Los mecanismos principales son la disrupción de la membrana celular, así como el estrés oxidativo inducido por la producción de ROS. Sin embargo, las NPs también pueden iniciar una cascada de eventos como la inhibición de enzimas, la interrupción de la formación de biopelículas y la desnaturalización de proteínas en las bacterias (Happy et al., 2018).

Por otro lado, se ha demostrado su capacidad de re-epitelización, al liberar el ion  $Zn^{+2}$  en la superficie de la herida produciendo un aumento de los queratinocitos en el medio y promoviendo la cicatrización (Kumar et al., 2012).

### ***Moringa oleifera***

La planta *Moringa oleifera* Lam, es miembro de la familia *Moringaceae*. Es nativa del norte de la India y se cultiva en zonas tropicales del mundo (Verma et al., 2009). Las hojas y flores de la planta se han utilizado como suplemento por su alto valor nutritivo, demostrando diversas propiedades farmacológicas (Chumark et al., 2008).

Las hojas de *M. oleifera* contienen altos niveles de vitaminas, minerales y fitoquímicos, carotenoides, aminoácidos, esteroides, glucósidos, flavonoides y fenoles, los cuales se relacionan con sus propiedades anti-inflamatorias, antimicrobianas y antioxidantes (Mbikay, 2012). Por lo tanto, la influencia en el proceso de cicatrización de heridas se atribuye a la presencia de los compuestos bioactivos en el extracto (Siddhuraju y Becker, 2003).

### **ANTECEDENTES**

Rubio-Elizalde et al. (2019), fabricaron un andamio a base de alginato-PEGMA e incorporaron extractos acuosos de *Moringa oleifera* (M.O) y *Aloe vera* (A.V). Incorporaron el PEGMA al material de alginato para mejorar su estabilidad en medio acuoso. Caracterizaron el material con base en su porosidad, absorción de agua, liberación de los extractos, viabilidad celular, actividad anti-inflamatoria y antimicrobiana. Obtuvieron dos materiales porosos alginato-A.V-M.O 2%(m/v) y alginato-A.V-M.O1%(m/v), donde variaron la proporción de *M. oleifera*. El extracto de *A. vera* contribuyó a aumentar la capacidad de absorción de agua, mientras que la *M. oleifera* proporcionó capacidad antioxidante, mejoró las propiedades anti-inflamatorias del material y aportó al material alginato-PEGMA actividad

antimicrobiana contra *S. aureus*. Sin embargo el material alginato-PEGMA-A.V-M.O no mostró actividad antimicrobiana contra *E. coli*. Las propiedades antimicrobianas las atribuyeron a la incorporación del extracto de *M. oleifera*.

Chopra et al. (2015), fabricaron un hidrogel a base de alginato/goma acacia e incorporaron NPs de ZnO. Midieron la encapsulación y liberación de las NPs, la absorción de agua del material y su actividad antimicrobiana contra la bacteria *Pseudomonas aureginosa*. Tanto el hidrogel como las NPs de ZnO mostraron actividad antimicrobiana en un intervalo de concentraciones de 15 µg/ml- 1000 µg/ml.

Mohandas et al. (2015), prepararon un material poroso de alginato-quitosano/NPs ZnO y evaluaron su porosidad, capacidad hemostática, citocompatibilidad con fibroblastos humanos y la actividad antimicrobiana contra *E.coli*, *S. aureus*, *Candida albicans* y *S. aureus* resistente a metacilina (MRSA). La porosidad del material (60-70%), no se afectó por la incorporación del ZnO. Con concentraciones 0.05 %-1 % (m/m) de ZnO, las diferentes muestras presentaron actividad antimicrobiana contra todas las cepas analizadas.

Khalid et al., (2017), fabricaron un apósito de celulosa y NPs de ZnO para heridas por quemaduras. Incorporaron el apósito en una solución de NPs de ZnO (1%) y midieron la actividad antimicrobiana del material por el método difusión en agar, contra las bacterias *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *S. aureus* y *Pseudomonas aureginosa*. El apósito mostró actividad contra todas las cepas, *E. coli* (90%) *C. freundii* (90%), *P. aureginosa* (87.4 %), y *S. aureus* (94.3 %).

Ali et al., (2016) impregnaron un material de celulosa con solución de NPs de ZnO variando las concentraciones a 1, 5 y 10 mg de ZnO y analizaron la actividad antimicrobiana del material y de las NPs de ZnO. Tanto las NPs como el material

ZnO-celulosa mostraron actividad contra *E. coli* y *S. aureus*, a mayor concentración de ZnO mayor actividad antimicrobiana contra ambas cepas.

Raguvaran et al. (2017), caracterizaron un hidrogel a base de alginato/goma acacia/ZnO (SAGA-ZnO), y midieron su biocompatibilidad en fibroblastos, actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas aureginosa* y *Bacillus cereus*. Los resultados mostraron una mayor actividad antimicrobiana en la solución de NPs ZnO que la actividad del material SAGA-ZnO, en un intervalo de concentraciones de 1.25 - 10 mg/ml. La citotoxicidad disminuyó conforme bajaba la concentración de ZnO en el material.

Gong et al. (2019) sintetizaron una película de alginato-quitosano y nanopartículas de ZnO para promover la cicatrización. Los autores incorporaron las NPs de ZnO por sus propiedades antimicrobianas ya reportadas anteriormente. Por XRD, lograron observar la presencia de ZnO en la película. El ZnO fue incorporado en solución a 1 mg/ml, a la mezcla de alginato-quitosano. La película se formó secando por 12 h la solución en el molde. La actividad antimicrobiana se realizó contra *S. aureus* y *E. coli*. El ZnO mostró únicamente actividad contra *S. aureus*, mientras que el material alginato-quitosano mostró actividad contra ambas bacterias. Midieron la biocompatibilidad del material compuesto con células madre mesenquimales. El material obtenido no presentó toxicidad contra las células, obteniendo un 86.3 % de viabilidad celular

Los trabajos consultados, incluyen materiales a base de la misma matriz de alginato y otros biopolímeros donde se han incorporado nanopartículas de ZnO con potencial aplicación como apósitos en heridas infectadas, así como extractos de plantas que promuevan la cicatrización de heridas. Los estudios anteriores, muestran el potencial antimicrobiano de los materiales con NPs de ZnO, sin embargo, no se han evaluado otras propiedades de las nanopartículas de ZnO, por ejemplo, su efecto antioxidante y anti-inflamatorio que podrían promover la cicatrización de una herida.

Asimismo, la adición de un extracto acuoso como *M. oleifera* podría proporcionar otras propiedades como sitios de adhesión y aumento de la proliferación celular, haciendo al material apto para su uso como andamio en cicatrización de heridas.

## HIPOTESIS

De acuerdo a las características reportadas de las nanopartículas de ZnO, el ZnO incrementará la capacidad antimicrobiana del material compuesto obtenido contra diferentes bacterias, *E.coli*, *P.aureginosa*, *K. pnemoniae* y *B. subtilis*, mientras que la *M. oleifera* proporcionará propiedades que promueven el proceso de cicatrización de heridas. Por lo tanto, el sistema biopolímero-*M. oleifera*-ZnO, poseerá propiedades que lo harán adecuado para su aplicación como andamio para cicatrización de heridas.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Preparar andamios compuestos a base de un biopolímero, *M. oleifera* y ZnO para aplicación en cicatrización de heridas.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar el ZnO en términos de su actividad antioxidante y anti-inflamatoria.
- Incorporar ZnO a una matriz polimérica de alginato y/o gelatina y *M. oleifera*.
- Evaluar la microestructura de los andamios por microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés).
- Determinar la capacidad de absorción de agua del material compuesto.
- Determinar la rapidez de liberación de los compuestos bioactivos *M. oleifera* y ZnO de los andamios
- Caracterizar el material compuesto biopolímero-M.O-ZnO en términos de sus actividades antioxidantes, anti-inflamatoria y antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa*, *Bacillus subtilis* y *Klebsiella pneumoniae*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Hojas secas de *M. oleifera* marca Stevia San Martín, sal sódica de ácido algínico de peso molecular 120,000 - 190,000 g/mol, (Sigma Aldrich, No. cat. 180947). Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), metil éter metacrilato de polietilenglicol (PEGMA) Mn~500 (No. cat. 447943), gelatina de piel de porcino (tipo A), Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), nitroprusiato de sodio (SNP), enzima colagenasa de *Clostridium histolyticum* (ChC), N-[3-(2-Furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) , buffer TES y reactivo de Griess se adquirieron de Sigma-Aldrich.

Las nanopartículas (NPs) de ZnO biogénicas, utilizando hueso de aguacate como agente reductor, fueron proporcionadas por el grupo de investigación del Dr. Priscy Luque Morales (véase síntesis y caracterización en **Anexo 1**).

### Preparación del extracto acuoso de *M. oleifera*

Las hojas secas de *M. oleifera* se trituraron usando una licuadora hasta obtener un polvo. El polvo se colocó en agua destilada a 75 °C, durante 5 min. Posteriormente se filtró la suspensión, utilizando un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  para obtener el extracto acuoso. El extracto se congeló a -80 °C y se liofilizó (Rubio-elizalde, et al. 2019). El extracto liofilizado se almacenó a 4 °C hasta su uso.

### Preparación del material gelatina-ZnO

Se preparó una solución de gelatina 0.75% (m/v) en agua destilada, en agitación constante y a una temperatura de 50 °C (**Fig. 3c**). Se agregaron las NPs de ZnO (5 mg/ andamio) y se dispersó la solución por medio de sonicación por 15 min (**Fig. 3d**). Se colocó la solución en moldes de poliestireno, se congelaron a -80°C por 24

h y liofilizaron (Labconco Free Zone, 1L) por 24h. Posteriormente, los andamios se desmoldaron y entrecruzaron mediante deshidratación térmica a 140°C por 24 h y 80 kPa de vacío (Castro-Ceseña et al., 2016).

Para la preparación de los materiales alginato:gelatina-ZnO (5 mg/ml) se utilizaron diferentes proporciones de los dos polímeros: Alginato:gelatina (25:75)-ZnO, 50:50-ZnO, alginato:gelatina (75:25) – ZnO y alginato– ZnO (100:0) y se siguió el procedimiento descrito anteriormente.

### **Preparación del material alginato-Ca-PEGMA**

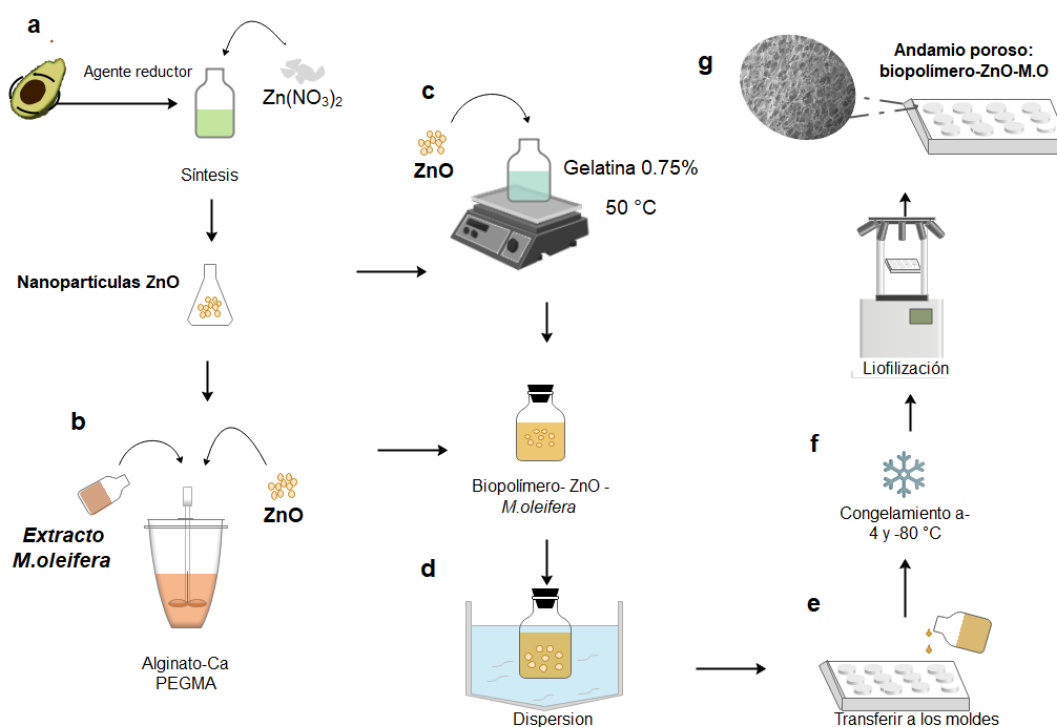
Se preparó una solución de alginato de sodio 3% (m/v) en agua destilada. Se le añadió PEGMA 0.75% (v/v) como plastificante. La solución de alginato-PEGMA se entrecruzó con CaCl<sub>2</sub> 1.5 % (m/v), añadiéndolo 1:1 (alginato-PEGMA:CaCl<sub>2</sub>) y mezclando con un homogenizador manual, obteniendo una solución final de alginato 1.5% (m/v), CaCl<sub>2</sub> 0.75 % (m/v), PEGMA 0.375% (v/v). Las soluciones obtenidas se vertieron en moldes de poliestireno y se congelaron a -20 °C durante 48 h para su posterior liofilización durante 24 h (Rubio-Elizalde et al., 2019).

### **Incorporación de los compuestos bioactivos ZnO y *M. oleífera***

Las NPs de ZnO biogénicas fueron sintetizadas utilizando extracto del hueso de aguacate como agente reductor (**Fig. 3a**).

La concentración del extracto de *M. oleífera* se eligió con base en un estudio previo (Rubio-Elizalde, et al., 2019) donde se muestra que a 1% (m/v), el extracto muestra actividad antimicrobiana contra *S. aureus*. La concentración de ZnO, se determinó con base en resultados preliminares de pruebas antimicrobianas, donde los materiales con 5 mg de ZnO por andamio, presentaron actividad antibacteriana contra *E. coli* (Ali et al., 2016).

Ambos compuestos (M. O 1% (m/v) y ZnO 5mg/andamio) se agregaron a la solución ya entrecruzada Ca-alginato-PEGMA (**Fig. 3c**). Posteriormente, se dispersaron las NPs de ZnO en la solución Ca-alginato-PEGMA-M.O-ZnO por medio de sonicación por 15 min. Se vertieron las soluciones en moldes de poliestireno, se congelaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se liofilizaron (**Fig. 3e**) para obtener un material poroso (**Fig. 3f**).



**Fig. 3. Diagrama de proceso de fabricación de materiales compuestos alginato-Ca-PEGMA-ZnO-M.O y gelatina - ZnO. Síntesis de NPs de ZnO (a). Incorporación de compuestos bioactivos (b, c). Dispersión de NPs de ZnO en solución (d). Enmoldamiento (e). Congelamiento y liofilización (f), apósito poroso (g).**

### Determinación de la microestructura de los andamios

La microestructura de los materiales se analizó por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) EVO/MA15 ZEISS, usando un voltaje de 15 kV, bajo condiciones de presión variable. Los materiales se visualizaron en vista superior y

lateral a diferentes magnificaciones (100x, 50x), con el fin de observar su porosidad y su estructura tridimensional. Asimismo, se verificó la incorporación de ZnO en los materiales mediante espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDX, por sus siglas en inglés).

### **Actividad antioxidante de los materiales por ABTS •+**

Se realizó el ensayo ABTS (Re, et al. 1999) para determinar la capacidad antioxidante de los materiales. Modificando la metodología anterior, el radical ABTS<sup>+</sup>, se disolvió en agua destilada. Primeramente, los andamios se cortaron en 8 pedazos y se sumergieron en 1800 µl de ABTS<sup>+</sup>, las soluciones se sonicaron por 4 min y se centrifugaron a 12,000 rpm por 2 min para un tiempo total de incubación de 6 min. Se tomaron 200 µl de cada muestra, se colocaron en una placa de 96 pozos para posteriormente leer la absorbancia a 740 nm en el lector de placas Epoch.

La capacidad antioxidante se calculó por medio del porcentaje de inhibición de la absorbancia utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición de la oxidación (\%)} = \left[ \frac{Abs_{control} - Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \right] \times 100$$

Donde:  $Abs_{control}$  y  $Abs_{muestra}$  son valores de la absorbancia del control y la muestra a los 6 minutos respectivamente.  $Abs_{control}$  corresponde a la solución ABTS<sup>+</sup> con 600 µl de agua destilada.

Se obtuvo una curva estándar, usando una solución de Trolox (0-100 mol/ml) en etanol absoluto. El porcentaje de inhibición de los materiales, se comparó con el estándar Trolox y los resultados se expresaron en términos de Capacidad Antioxidante Equivalente en Trolox® (TEAC, por sus siglas en inglés) en nmol equivalentes de Trolox por cada mg de andamio.

### **Actividad anti-inflamatoria (relacionada a remoción de óxido nítrico) de los materiales compuestos**

La actividad anti-inflamatoria de los materiales se determinó por medio de la capacidad de los materiales para remover óxido nítrico (NO), utilizando el ensayo de nitroprusiato de sodio (SNP) (Pardau et al., 2017). Se cortaron los andamios en 8 pedazos, se sumergieron en 1800  $\mu$ l de SNP (5mM) incubándose a la luz por 60 min, se agitaron con vortex y se centrifugaron por 2 min a 12,000 rpm. Se tomó 100  $\mu$ l de sobrenadante de cada muestra, se colocaron en placa de 96 pozos y se añadió 100  $\mu$ l de reactivo de Griess 1X incubando por 15 min. Se leyó la absorbancia a 540 nm en el lector de placas Epoch. La remoción de óxido nítrico de las muestras se calculó:

$$\text{Remoción de NO (\%)} = \left[ \frac{Abs_{control} - Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \right] \times 100$$

Donde:  $Abs_{control}$  es la absorbancia del reactivo de Griess con SNP y  $Abs_{muestra}$  es la absorbancia de reactivo de Griess con la muestra.

### **Liberación de los compuestos bioactivos, ZnO y *M. oleifera***

Cada muestra por triplicado, fue sumergida en agua destilada, por diversos intervalos de tiempo, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 min. Se tomó cada alícuota de liberación correspondiente a cada tiempo y se agregó nuevamente agua destilada en cada intervalo. Las alícuotas fueron almacenadas a 4°C, para posteriores análisis. La liberación de los compuestos bioactivos se analizó mediante un ensayo de actividad antioxidante ABTS (Re, et al. 1999) con las alícuotas obtenidas.

## **Actividad antimicrobiana**

La actividad antimicrobiana de los andamios, se realizó por medio del método de difusión en agar (Collins, Lyne, y Grange, 1989), contra las bacterias *E.coli*, *P. aureginosa*, *K. pneumoniae* y *B.subtilis*.

Siguiendo la metodología descrita por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2012). Las cepas bacterianas se cultivaron en medio LB y se sembraron para la preparación del inóculo en medio líquido. Se midió la turbidez a 625 nm con un espectrofotómetro, hasta obtener una absorbancia entre 0.08-0.12, que corresponde a  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml. Se optó por utilizar el valor menor de absorbancia, para evitar alta concentración de bacterias en las placas. Los inóculos se transfirieron a frascos con 100 ml de medio para obtener una concentración final de  $1 \times 10^6$  UFC / ml.

Se colocaron los materiales compuestos a las placas con medio LB y se agregó el medio inoculado con las cepas respectivamente. Las placas se incubaron por 24 h a 37°C, y posteriormente se midieron las zonas de inhibición obtenidas para determinar la actividad antimicrobiana. Cada ensayo se realizó por triplicado.

## **Absorción de agua de los materiales compuestos**

Para medir la absorción de agua de los materiales, los andamios (por triplicado) se pesaron para obtener su masa inicial. Posteriormente, se sumergieron en 2 ml de agua destilada a 37 °C, incubándose a diferentes tiempos, 15, 30, 60, 90 y 120 min. En cada intervalo de tiempo, se retiró el exceso de agua de las muestras con un pañuelo, se pesaron para registrar el peso final y se añadió nuevamente 2 ml de agua destilada (Rubio-Elizalde et al., 2019).

La cantidad de absorción de agua se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Absorción de agua (\%)} = \left[ \frac{M_t - M_o}{M_o} \right] \times 100$$

Donde:  $M_t$  es la masa de la muestra al tiempo t (15, 30, 60, 90 y 120 min) y  $M_o$  la masa inicial de la muestra (t=0).

### Ensayo de inhibición de la actividad de la colagenasa

Para la medición de inhibición de actividad de la colagenasa se utilizaron las alícuotas de liberación de los compuestos activos en el tiempo 15 min, dado que se obtuvo el mayor porcentaje de extracto liberado. La muestra se colocó con la enzima colagenasa de *Clostridium histolyticum* (ChC) en buffer TES 50 mM y se incubó a 37 °C por 20 min. Se preparó una solución 2mM de sustrato N-[3-(2-Furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) en el mismo buffer. El ensayo se realizó con 60 µL de buffer, 30 µL de muestra y 10 µl de enzima en cada prueba incubando por 20 minutos, se agregaron 20 µL de sustrato a la mezcla. Como control negativo se utilizó agua en lugar de sustrato. Se midió el decremento de la densidad óptica (OD) a 335 nm en el lector de placas Epoch, por 20 min iniciada la reacción. Las velocidades se calcularon por los cambios en la absorbancia durante los primeros 10 minutos de reacción. La actividad de inhibición de colagenasa se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición de actividad colagenasa (\%)} = \frac{\text{Vel. inicial}_{control} - \text{Vel. inicial}_{muestra}}{\text{Vel. inicial}_{control}}$$

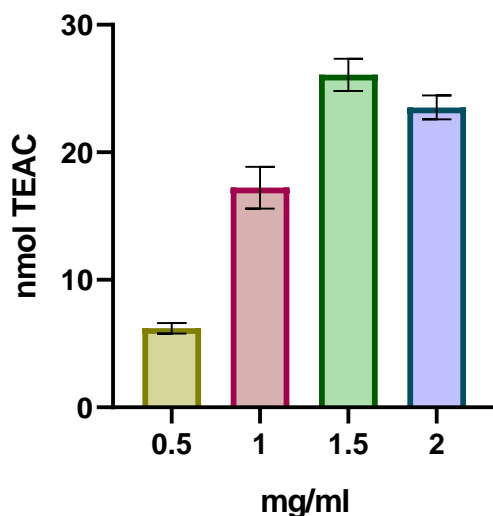
donde:  $\text{Vel. inicial}_{control}$  es la velocidad de inicial de reacción de la colagenasa y el sustrato (FALGPA) en ausencia del inhibidor (muestra) y  $\text{Vel. inicial}_{muestra}$  es la velocidad inicial de reacción de la colagenasa en presencia del inhibidor, en este caso la muestra, es decir, las NPs de ZnO y/o el extracto de *M. oleifera* (Wittenauer et al., 2015).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Actividad antioxidante y anti-inflamatoria de nanopartículas (NPs) de óxido de zinc (ZnO)

El ensayo por ABTS<sup>•+</sup> es un método fácil y rápido para estimar la actividad antioxidante de una muestra. La actividad antioxidante se determina como la capacidad de las partículas en estudio para disminuir el color del ABTS<sup>•+</sup> al reaccionar con el radical y reducirlo, el grado de decoloración se expresa como porcentaje de inhibición de la oxidación (Zare et al., 2017). Se analizó la actividad antioxidante de las nanopartículas de ZnO biogénicas, con la finalidad de evaluar su capacidad antioxidante, antes de incorporarlas al material.

Para todas las concentraciones evaluadas (**Fig. 4**), las NPs de ZnO presentaron actividad antioxidante. Como era esperado, se observa que la actividad antioxidante incrementó conforme aumentó la concentración de ZnO.



**Fig. 4.** Actividad antioxidante de ZnO en H<sub>2</sub>O. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias (n=4/grupo).

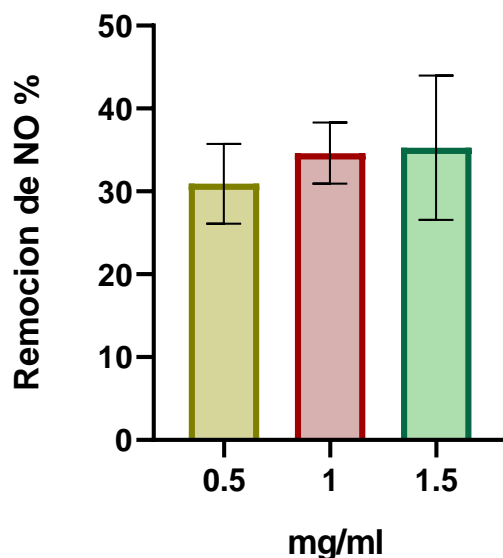
Al evaluar concentraciones las concentraciones más altas (1.5 y 2 mg/ml), la mayor actividad se observa en 1.5 mg/ml correspondiente a 26.07 nm TEAC. Se mantuvo la proporcionalidad hasta esa concentración, ya que a 2 mg/ml se logra ver una disminución en la actividad.

La capacidad antioxidante de las NPs de ZnO se puede deber a una donación de electrones del átomo de oxígeno, que reaccionan con los radicales libres presentes en el medio (Das et al., 2013). Sin embargo, en estudios anteriores se ha demostrado que la actividad antioxidante de las NPs de ZnO biogénicas, se relaciona con el tipo de extracto utilizado como agente reductor, ya que depende de los compuestos presentes en el extracto (Kumar et al., 2014; Rajakumar et al., 2018). Esto concuerda con los resultados obtenidos, dado que a una concentración de 0.5 mg/ml de NPs de ZnO se obtuvo una actividad de antioxidante de 8.1% (**Fig. 4**), mientras que en un estudio anterior se muestra 60% de actividad antioxidante para 0.5 mg/ml de NPs ZnO sintetizadas a partir de la hoja de *Andrographis paniculata* (Rajakumar et al., 2018), asimismo, con NPs de ZnO sintetizadas a partir de *Polygala tenuifolia* se obtuvo un 45.01% de actividad antioxidante a la misma concentración de ZnO (Nagajyothi et al., 2015).

Por otro lado, la actividad anti-inflamatoria, se midió en relación a la remoción de óxido nítrico (NO) en el medio, debido a que el NO es regulador y modulador en las respuestas inflamatorias (Pardau et al., 2017).

La capacidad de remoción de NO de las nanopartículas de ZnO, se determinó por medio del ensayo con SNP, que al donar NO reacciona con el reactivo de Griess para formar un complejo de color rosado, el cual es interrumpido al incorporar especies removedores de NO, en este caso la *M. oleifera* y las NPs de ZnO. Al disminuir la absorbancia a 540 nm, mayor es la remoción de NO en el medio y mayor será su capacidad anti-inflamatoria (Rubio-Elizalde, et al., 2019). Por lo tanto, se observa que las NPs de ZnO, presentan capacidad para remover NO, lo cual puede relacionarse directamente con la capacidad anti-inflamatoria de las NPs evaluadas,

ya que las concentraciones analizadas presentan remoción de NO en el medio (**Fig. 5**): 30.91% para 0.5 mg/ml, 34.62% en 1 mg/ml y 35.26% en 1.5 mg/ml respectivamente.



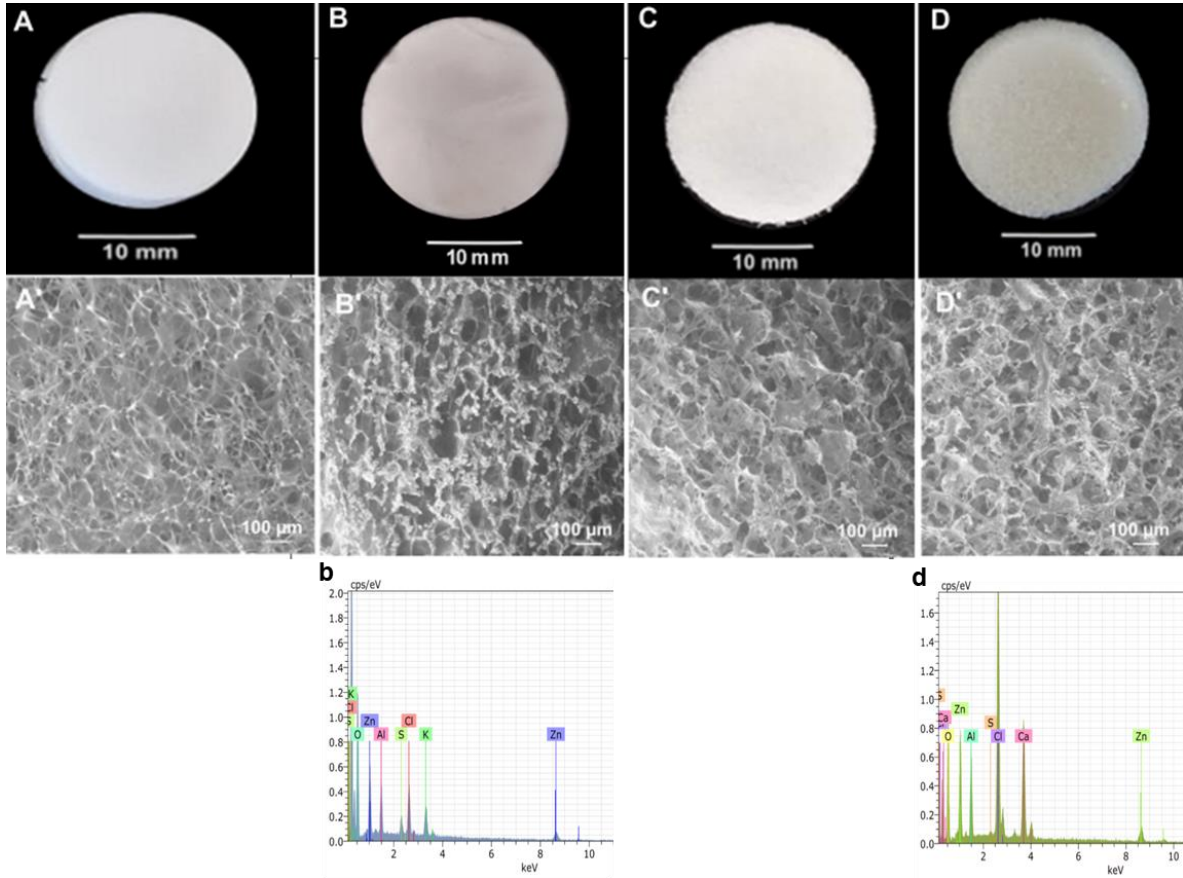
**Fig. 5. Actividad anti-inflamatoria de ZnO en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> relacionada con la capacidad de remoción de NO.** Las barras de verticales representan la desviación estándar de las medias (n=4 /grupo).

### **Apariencia y microestructura de los materiales compuestos por microscopía electrónica de barrido (SEM)**

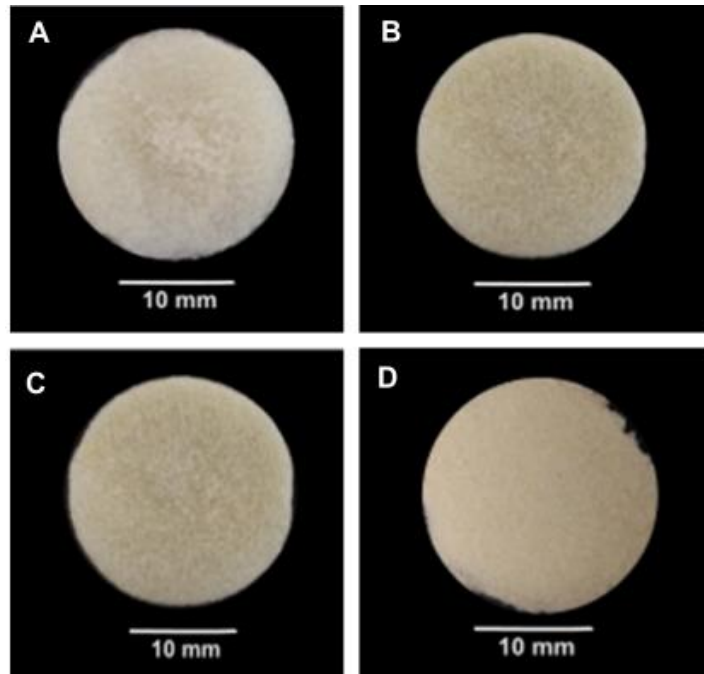
Se evaluaron dos polímeros diferentes, alginato y gelatina como material para incorporar el ZnO y obtener un material compuesto adecuado, para utilizarse como apósito para cicatrización de heridas. Todos los materiales obtenidos se muestran en la fig. 6. Primero se fabricaron los materiales con gelatina 0.75%(m/v), incorporando 3 y 5 mg/ml de ZnO. Se obtuvieron materiales flexibles (**Fig.6A**). Al observar la microestructura superficial por SEM, se observó que al incorporar el ZnO, este modifica la microestructura del material, ya que el material de gelatina sin ZnO no mostraba porosidad (**Fig. 6A**). Otra característica del material, fue una ligera reducción de tamaño al incorporar ZnO, con un diámetro promedio de 11 mm, con

respecto a 13 mm del material sin ZnO. Sin embargo, se descartó utilizar gelatina como polímero, dado que las NPs de ZnO no se distribuían homogéneamente en el material, quedando como residuo en el fondo del molde. Como alternativa, se optó combinar alginato y gelatina (**Fig. 7**) para formar los materiales compuestos, variando la proporción de los dos polímeros y manteniendo las concentraciones de ZnO. Los materiales resultantes fueron diferentes según la proporción. En el material alginato-gelatina (25:75)-ZnO (**Fig. 7A**) se produjeron dos fases en el material, correspondientes a los dos polímeros, además, se observa la aglomeración del ZnO en la superficie (**Fig. 7A**) debido a la dispersión deficiente en el material. Los mejores materiales se obtuvieron en las condiciones con mayor porcentaje de alginato, ya que, en el material de gelatina, las NPs de ZnO se precipitaban y aglomeraban (**Fig. 7B**). El material de alginato-ZnO resultó ser quebradizo y desmoronable debido a la falta de PEGMA en el material (**Fig. 7D**). De manera que, la combinación de los dos polímeros y ZnO no generó un material apto para su aplicación como andamio, utilizando las condiciones de preparación que aquí se mencionan.

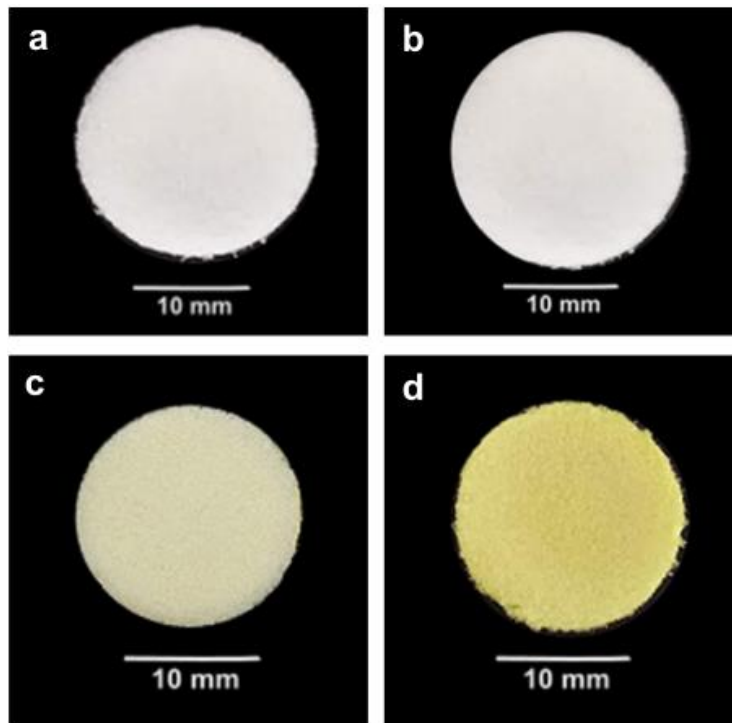
Por ese motivo, se optó por utilizar alginato-Ca-PEGMA como material, el cual se ha reportado ser un buen candidato como apósito de heridas (Rubio-Elizalde, et al., 2019). Utilizando las mismas concentraciones previas de ZnO, el material final obtenido (**Fig. 8a**), fue un material blando y flexible. Al incorporar el extracto de *M. oleifera* (M.O) al material alginato-PEGMA, el material se torna de color café (**Fig. 8c**) y modifica su estructura, haciéndolo más quebradizo. Mientras que, al combinar alginato-PEGMA-M.O-ZnO, se obtiene un material de color amarillo (**Fig. 8d**), lo que puede deberse a una interacción entre el ZnO y M.O, ya que ningún material anterior contiene ese color. Además, resultó ser un material, desmoronable y más quebradizo, comparado con los materiales alginato-M.O y alginato-ZnO, por lo tanto, la adición de M.O-ZnO en esas concentraciones no permite una estructura adecuada para su uso como andamio.



**Fig. 6. Imágenes de los andamios de gelatina-ZnO y alginato-ZnO.** SEM muestra la microestructura de la superficie de los materiales. Andamio de gelatina blanco (A), material gelatina-ZnO (B), alginato-PEGMA (C), alginato-PEGMA-ZnO (D) Espectro EDX muestra la presencia de Zn en material gelatina-ZnO (b), alginato-ZnO (d).



**Fig. 7. Imágenes de materiales compuestos alginato:gelatina-ZnO 5mg/ml. (A) Alginato:gelatina (25:75)-ZnO, (B) alginato:gelatina (50:50)-ZnO alginato:gelatina (75:25) – ZnO (C) y alginato:gelatina (100:0) – ZnO (D).**



**Fig. 8. Fotografías de materiales con los compuestos bioactivos. Alginato-PEGMA (a), Alginato-PEGMA – ZnO (b), Alginato-PEGMA-M.O (c) y Alginato-PEGMA -M.O-ZnO (d).**

## Capacidad antioxidante y anti-inflamatoria de los materiales compuestos

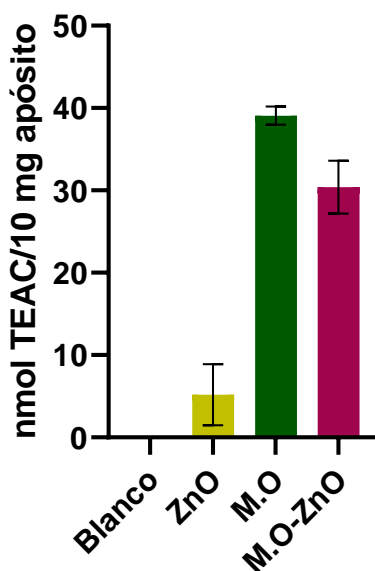
La evaluación de la actividad antioxidante de los materiales, se determinó mediante el método de eliminación de radicales libres ABTS. La oxidación de ABTS con persulfato de potasio (KPS) genera un catión  $ABTS^{•+}$ , el cual es reducido en presencia de sustancias antioxidantes, es decir, sustancias con la capacidad de interactuar con radicales libres (Skotti et al., 2014). El compuesto ABTS absorbe a 734 nm y, entre mayor es la capacidad antioxidante de los materiales, menor es la absorbancia obtenida.

Al evaluar la capacidad antioxidante de los materiales, se confirma que, el material alginato-PEGMA (blanco) no posee actividad antioxidante, por lo tanto, la actividad mostrada en las diferentes condiciones (**Fig. 9**) se atribuyen a los compuestos ZnO y *M. oleifera* (M.O) incorporados. La actividad antioxidante del material con ZnO corresponde a 5.14 nm TEAC por mg de andamio, siendo muy inferior a la capacidad antioxidante de los materiales con M.O, con 39.2 y 30.4 nm TEAC /mg de andamio, para M.O y M.O-ZnO, respectivamente. Estos resultados podrían deberse tanto a los compuestos fenólicos del extracto de M.O, los cuales se han reportado su relación con la actividad antioxidante (Skotti et al., 2014), como con el extracto utilizado para la síntesis de las NPs de ZnO, que no contienen compuestos con alta actividad antioxidante ya que estudios previos demuestran que la capacidad antioxidante de las NPs de ZnO biogénicas se relaciona con el tipo de extracto utilizado para su síntesis (Kumar et al., 2014). Por otro lado, en la combinación alginato-ZnO-M.O (**Fig. 9**), se observa una disminución en la actividad antioxidante, comparándolo con la actividad del material alginato-M.O, donde se esperaría que la capacidad antioxidante fuera mayor a esta, dado que ambos compuestos bioactivos poseen actividad antioxidante. Estos resultados sugieren, que la interacción entre ZnO y M.O interfiere en la actividad antioxidante del material, disminuyéndola.

Los radicales funcionan como moléculas señalizadoras pero, el exceso de estos en una herida puede causar daño tisular, fase inflamatoria extendida y, disminución de

la producción de colágeno y fibroblastos. De manera que, al añadir un agente antioxidante se puede proteger el colágeno y los glucosaminoglicanos de la oxidación, lo que acelera el cierre de la herida (Ali, et al. 2016; Sen 2008).

La capacidad antioxidante del material se relaciona con la capacidad para eliminar esos radicales libres tóxicos (especies reactivas de oxígeno), terminando así con el daño oxidativo en las células. Por lo tanto, con base en los resultados, la capacidad antioxidante de nuestros materiales, podrían reducir los niveles de radicales libres (ROS) en el medio, mejorando el proceso de cicatrización de una herida.



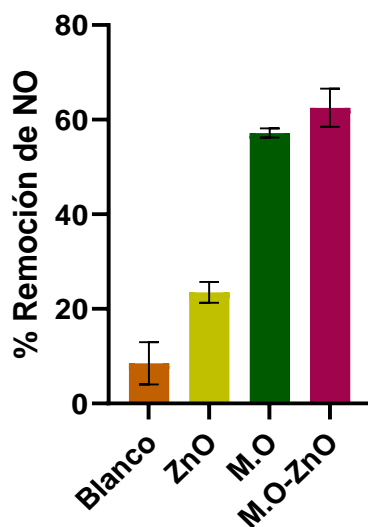
**Fig. 9. Actividad antioxidante de los materiales compuestos.** Alginato-Ca-PEGMA (blanco), ZnO=alginato-PEGMA-ZnO, M.O=alginato-PEGMA-M. oleifera, M.O-ZnO=alginato-PEGMA-M. oleifera-ZnO. Las barras de verticales representan la desviación estándar de las medias (n=4 /grupo).

La medición de la actividad anti-inflamatoria de los materiales, se realizó por medio del ensayo de remoción de óxido nítrico (NO), debido a que el NO es una molécula señalizadora, presente en condiciones de inflamación excesiva. El exceso de NO al reaccionar con oxígeno puede formar especies nitrógeno altamente reactivas, generando daño celular (Pardau et al., 2017). En este ensayo, los materiales compuestos, se colocaron con nitroprusiato de sodio (SNP), que es un donador de

NO, el cual al reaccionar con reactivo de Griess, forma un complejo de color rosado, que en presencia de un removedor de NO (materiales compuestos), la formación del complejo se interrumpe. Por lo tanto, la disminución de la absorbancia a 540 nm, se refleja como la capacidad de remoción de NO de los materiales, así como la actividad anti-inflamatoria.

En el ensayo de remoción de NO de los materiales compuestos, todas las muestras mostraron un porcentaje de remoción de NO (**Fig. 10**), lo que nos indica que todos los materiales poseen actividad anti-inflamatoria, dado que, la actividad anti-inflamatoria está relacionada con la remoción de NO en el medio, el cual actúa como mediador y regulador en la respuesta inflamatoria. La actividad de 8.5% que muestra el blanco (alginato-PEGMA), puede deberse a la incorporación del PEGMA en la matriz, ya que se han reportado en trabajos anteriores (Ackland et al., 2010), propiedades anti-inflamatorias para el polietilenglicol (PEG). Para el resto de los materiales, la actividad anti-inflamatoria es proporcionada por la matriz y la incorporación de los compuestos bioactivos ZnO y *M. oleifera*.

La cantidad de NO que remueve el material con 5 mg de ZnO es baja, tomando en cuenta que la matriz sola posee 8.5%. Por otro lado, al incorporar 1% (m/v) de M.O en el material, se incrementa el porcentaje hasta un 62.5%. Del mismo modo, la capacidad de remoción que brinda el ZnO no fue significativa, debido a que el porcentaje del material M.O-ZnO es mayor que el material solo con M.O, con un porcentaje de remoción de 62.5% y 57.1% respectivamente (**Fig. 10**). Por lo tanto, es la incorporación del extracto M.O el que proporciona la mayor capacidad de remoción de NO al material.



**Fig. 10. Porcentaje de remoción de NO en el medio. alginato-Ca-PEGMA.** PEGMA= Alginato-Ca-PEGMA, ZnO= Alginato-Ca-PEGMA-ZnO, M.O = Alginato-Ca-PEGMA-M. oleifera, M.O-ZnO= Alginato-Ca-PEGMA-M.O-ZnO. Las barras verticales representan las desviaciones estándar de las medias (n=4/ grupo).

La remoción de NO de los materiales observada en este estudio, podría ser beneficiosa para proteger los tejidos contra el daño oxidativo, modulando la respuesta inflamatoria, mejorando el proceso de cicatrización de la herida.

### **Liberación de los compuestos bioactivos ZnO y *M. oleifera***

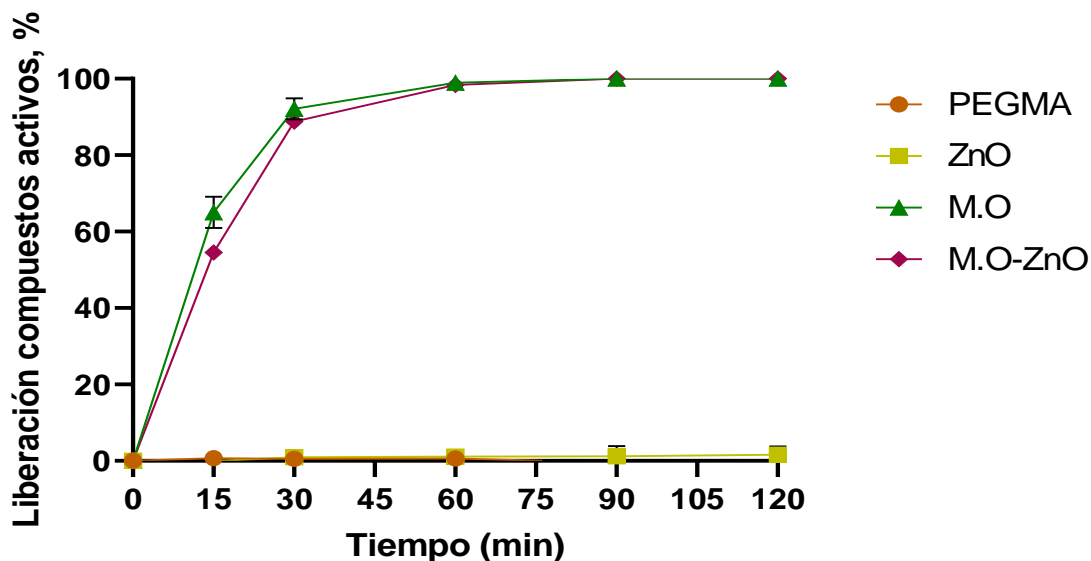
La liberación de ZnO y M.O de los materiales compuestos, se evaluó para determinar la rapidez de liberación de los compuestos bioactivos en medio acuoso. Como se muestra en la Fig. 11, para ningún intervalo de tiempo, se detectó ZnO en el medio, inclusive después de un periodo de 180 min. Esto proporciona evidencia de una posible interacción entre el ZnO y la matriz de alginato-PEGMA, al no liberarse ZnO tan fácilmente al medio acuoso. Tal interacción, podría interferir en las propiedades del material, al impedir la liberación del ZnO. Sin embargo, se esperaría que este compuesto se libere al degradarse la matriz alginato-PEGMA.

De acuerdo a un trabajo anterior (Ui-Islam et al., 2013), se reportó la liberación del

zinc ( $Zn^{+2}$ ) de ciertos materiales donde las NPs de ZnO, se incorporaron y dispersaron en la solución del material. La liberación se midió cada 24 h durante siete días, de tal forma que, para nuestros materiales, sería razonable evaluar la liberación del ZnO en un periodo de tiempo mayor, para lograr determinar la cantidad de ZnO liberada en el medio.

Por otro lado, los materiales con *M. oleifera* si liberaron el extracto, hasta los 90 min de ensayo (**Fig. 11**). En los primeros 15 min, se liberó más del 30% de M.O en ambos materiales. En los 30 min, el material que solo contiene M.O, liberó mayor cantidad de extracto que el de M.O-ZnO, lo que nos indica que el ZnO podría estar interfiriendo en la liberación de la M.O, al interactuar con el extracto. Esa tendencia se mantuvo hasta los 90 min de ensayo, ya que la mayor cantidad de M.O liberada, se presentó en el material que no contiene ZnO.

Después de 2h de liberación, no hubo incremento en el porcentaje. De modo que, a los 90 min, se obtuvo una liberación total en los materiales M.O y M.O-ZnO, que corresponde a un 65% y 50% respectivamente, lo que coincide con lo reportado en un trabajo anterior (Rubio-Elizalde et al., 2019).



**Fig. 11. Porcentaje de liberación de los compuestos bioactivos incorporados en la matriz alginato-Ca-PEGMA.** PEGMA= alginato-Ca-PEGMA, ZnO= alginato-Ca-PEGMA-ZnO, M.O= alginato-Ca-PEGMA-M. oleifera, M.O-ZnO= alginato-Ca-PEGMA-M.O-ZnO. Las barras verticales representan las desviaciones estándar de las medias (n=3).

### Actividad antimicrobiana del material compuesto ZnO – *M. oleifera*

La actividad antimicrobiana de los materiales compuestos se evaluó contra las cepas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa* y *Klebsiella pneumoniae* como gram negativas e incluyendo a *Bacillus subtilis* como una gram positiva.

Los andamios alginato-Ca-PEGMA (blanco), y alginato-ZnO no mostraron actividad contra ninguna cepa evaluada (**Fig. 12**). El resultado si es preciso para el andamio blanco, ya que por sí solo, se conoce que el material no tiene ningún efecto reportado (Rubio-Elizalde et al., 2019). Por otro lado, se esperaba que al incorporar el ZnO al material, éste, mostrara efecto antimicrobiano contra las bacterias evaluadas, puesto que, estudios anteriores (Khalid et.al., 2017; Raguvaran et al., 2017; Khan et al., 2018) reportan que, las nanopartículas de ZnO presentan actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias, incluyendo las cepas analizadas en este ensayo. Asimismo, se esperaba que las NPs de ZnO complementaran el material, brindando actividad antimicrobiana contra *E. coli*, dado

que, el extracto *M. oleifera* carece de efecto antimicrobiano para esta bacteria. Sin embargo, en estudios anteriores (Kumar et al., 2014; Rajakumar et al., 2018) se ha demostrado que, las propiedades de las NPs de ZnO biogénicas, está relacionada con el tipo de extracto utilizado como agente reductor, de manera que, la ausencia de actividad antimicrobiana de las NPs de ZnO biogénicas, se puede atribuir a las propiedades del hueso de aguacate utilizado como agente reductor.

Los resultados positivos fueron contra las bacterias *K. pneumoniae* y *B. subtilis* (**Fig. 12, C y D**), donde únicamente los materiales M.O y M.O-ZnO mostraron actividad antimicrobiana. La actividad que presenta el material M.O-ZnO, se atribuye totalmente al extracto *M. oleifera* incorporado, en vista de que el material de ZnO carece de actividad. Las zonas de inhibición contra *K. pneumoniae* de M.O y M.O-ZnO fueron alrededor de 20.6 y 19.6 mm respectivamente, En *B. subtilis* fueron alrededor de 23.6 y 22 para cada material, siendo ligeramente mayor la actividad antimicrobiana del material solo con M.O para ambas cepas. Esta disminución de actividad en el material de M.O-ZnO, también se observó, en resultados de otros ensayos, como antioxidante y anti-inflamatorio.

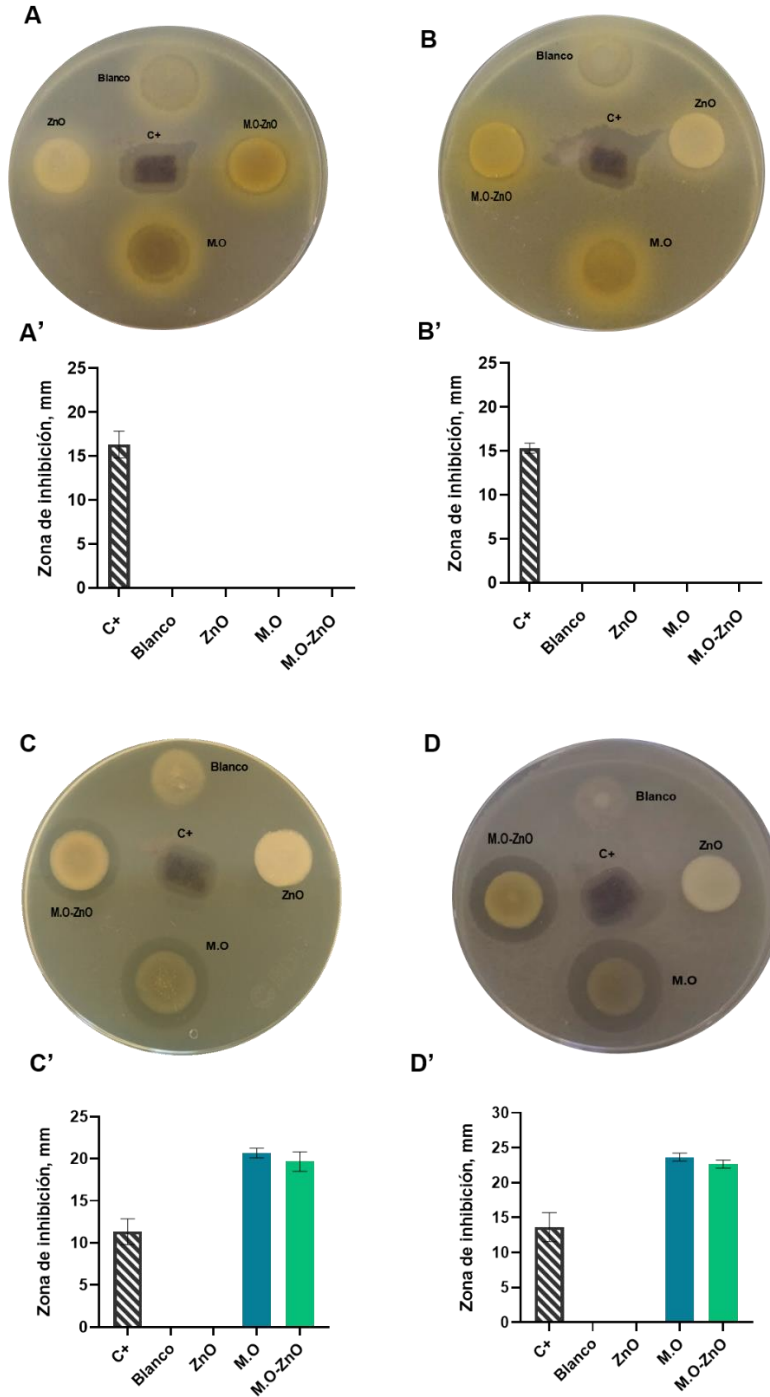
Debido a que el andamio que contiene únicamente ZnO, no presentó actividad antimicrobiana, a pesar de utilizar una concentración alta de ZnO se consideró que las NPs de ZnO sintetizadas a partir de hueso de aguacate, no contenían actividad antimicrobiana, al menos bajo las condiciones evaluadas en el ensayo. Sin embargo, con el ensayo de liberación de los compuestos bioactivos (**Fig. 11**), se observó que, el ZnO no se libera en medio acuoso, ya que ninguna alícuota de liberación mostró presencia de ZnO en un tiempo total de 180 min. Por lo tanto, la escasa liberación de ZnO, podría estar relacionada con la falta de actividad antimicrobiana de los materiales con ZnO, esto, a causa de una posible interacción entre el ZnO y la matriz de alginato, lo que impediría su liberación e interacción con el medio de cultivo.

Con base en lo anterior, es necesario modificar la síntesis de las NPs de ZnO y encontrar las mejores condiciones para su aplicación como compuesto bioactivo en andamios para cicatrización de heridas.

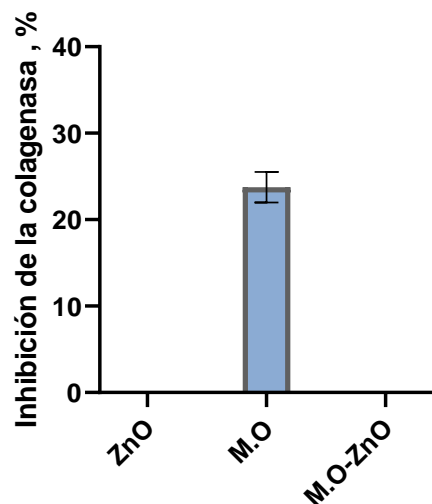
### **Ensayo de inhibición de colagenasa de los compuestos bioactivos ZnO y M.O**

Se evaluó la capacidad de inhibición de los compuestos ZnO y M.O, contra la actividad de la colagenasa, debido a, que la colagenasa al ser parte de la familia de las metaloproteinasas, está presente en las etapas de remodelación del tejido en una herida. En un ambiente de estrés oxidativo o de inflamación, hay un aumento en los niveles de metaloproteinasas en el medio, impidiendo la formación del nuevo tejido (Wittenaver et al., 2015). El ensayo se realizó con las alícuotas de liberación de ZnO y M.O en el material. Como se observa en la Fig. 13, el extracto de M.O fue la única muestra que tuvo actividad contra la enzima, sin embargo, la muestra M.O-ZnO no mostró actividad, aun cuando está reportado que el ZnO también posee actividad de inhibición contra las metaloproteasas (Toledano et al., 2012). En base a esto y como se mostró en otros resultados de este trabajo, al incorporar ZnO con M.O, este podría estar interaccionando con los compuestos del extracto, modificando sus propiedades de manera negativa.

La ausencia en la actividad del ZnO contra la enzima, podría atribuirse a que no hay ZnO en la muestra analizada, ya que se encontró en los ensayos anteriores que el ZnO no se libera en el medio.



**Fig. 12. Actividad antimicrobiana de los materiales compuestos por método de difusión en agar.** Utilizando apósito comercial alginato-Ag como control positivo (C+), alginato-Ca-PEGMA (blanco), ZnO= alginato-Ca-PEGMA-ZnO, M.O= alginato-Ca-PEGMA-M. oleifera, M.O-ZnO= alginato-Ca-PEGMA-M.oleifera-ZnO. Diámetro de zonas de inhibición. Ensayo contra *P. aureginosa* (A, A'). *E. coli*. (B, B') *K. pneumoniae*. (C, C') Actividad contra *B. subtilis* (D, D'). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias (n=3).

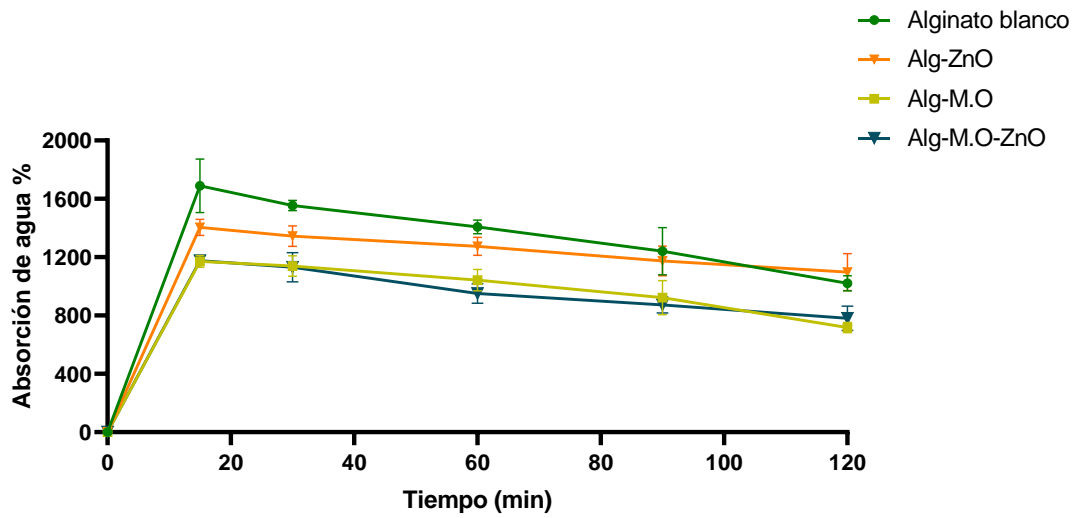


**Fig. 13. Ensayo de inhibición de la colagenasa de los materiales compuestos.** ZnO=Alginato-ZnO, M.O= alginato-M. oleífera, M.O-ZnO= alginato-M. oleífera-ZnO. La barra vertical representa la desviación estándar de las medias (n=3).

### Absorción de agua del material compuesto

Se evaluó la absorción de agua de los materiales compuestos, debido a que es una característica importante de los andamios, porque se relaciona con la capacidad de los materiales, para absorber los exudados de una herida.

En todos los materiales compuestos, se observó una disminución en el porcentaje de absorción de agua conforme aumentaba el tiempo. El mayor porcentaje de absorción lo tiene el material Alg-ZnO con 1097% (**Fig. 14**), mientras que los dos materiales con M.O (Alg-M.O, Alg-M.O-ZnO) contienen 717 y 782% respectivamente. Eso puede deberse, a una disminución de masa en el material, por la liberación del extracto de M.O, como, por la degradación propia del material, ya que la estructura de los materiales con M.O mostró ser menos resistente comparado con el material Alg-ZnO. El blanco (alginato-Ca-PEGMA) presentó ligeramente menor capacidad de absorción de agua, con respecto al material con ZnO, siendo 1020%. El blanco mostró un porcentaje similar comparado con un mismo material de Alginato-Ca (1515 % de absorción de agua) de un trabajo anterior (Rubio-Elizalde et al., 2019).



**Fig. 14. Ensayo de absorción de agua de los materiales compuestos.** Las barras verticales representan las desviaciones estándar de las medias ( $n=3$ ).

## CONCLUSIONES

Las nanopartículas de ZnO (NPs de ZnO) sintetizadas de hueso de aguacate, contienen propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias, pero carecen de actividad antimicrobiana bajo las condiciones evaluadas en este trabajo.

La incorporación de ZnO en la matriz de alginato-Ca-PEGMA, no modificó la microestructura porosa del material. Sin embargo, al combinar ZnO con *M. oleifera* en el material, se modifica la estructura, haciéndolo quebradizo.

Las NPs de ZnO no se liberaron de la matriz alginato-Ca, a causa de una posible interacción entre el ion  $Zn^{+2}$  y la estructura del alginato. Mientras que, la liberación del extracto M.O ocurre rápidamente al ser un extracto acuoso.

La adición del extracto M.O en los materiales, proporcionó la mayor actividad antioxidante, anti-inflamatoria (remoción de NO) y antimicrobiana contra *K. pneumoniae* y *B. subtilis*. Propiedades que se atribuyen a los compuestos fitoquímicos del extracto.

Al combinar NPs de ZnO biogénicas y M.O en la matriz alginato-Ca, hay un efecto negativo en las propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias del material, disminuyendo, lo que puede atribuirse a, que el ZnO interactúa con los compuestos del extracto M.O, interfiriendo en sus propiedades.

## RECOMENDACIONES

- Analizar nuevas condiciones para la incorporación de las NPs de ZnO, para obtener la liberación del compuesto en el medio.
- Realizar más caracterizaciones al material alginato-Ca-ZnO-M.O para conocer la posible interacción entre los compuestos bioactivos.
- Evaluar diferentes concentraciones de ZnO y M.O para lograr una estructura adecuada del material.
- Considerar otros compuestos bioactivos, que promuevan la actividad antimicrobiana del material.

## REFERENCIAS

- Abdul Khalil, H. P. S., Tye, Y. Y., Saurabh, C. K., Leh, C. P., Lai, T. K., Chong, E. W. N. y Syakir, M. I. (2017). Biodegradable polymer films from seaweed polysaccharides: A review on cellulose as a reinforcement material. *Express Polymer Letters*, 11(4), 244–265.
- Ackland, G. L., Gutierrez Del Arrollo, A., Yao, S. T., Stephens, R. C., Dyson, A., Klein, N. J. y Gourine, A. V. (2010). Low-molecular-weight polyethylene glycol improves survival in experimental sepsis. *Critical Care Medicine*, 38(2), 629–636.
- Ahmed, S., Annu, Chaudhry, S. A., y Ikram, S. (2017). A review on biogenic synthesis of ZnO nanoparticles using plant extracts and microbes: A prospect towards green chemistry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 166, 272–284.
- Ali, A., Ambreen, S., Maqbool, Q., Naz, S., Shams, M. F., Ahmad, M. y Zia, M. (2016). Zinc impregnated cellulose nanocomposites: Synthesis, characterization and applications. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 98, 174–182.
- Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M. y Gilani, A. H. (2006). *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy Research*, 21(1), 17–25.
- Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N. y Eccleston, G. M. (2008). Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8), 2892–2923.
- Castro-Ceseña, A. B., Camacho-Villegas, T. A., Lugo-Fabres, P. H., Novitscaya, E. E., McKittrick, J. y Licea-Navarro, A. (2016). Effect of strach on the mechanical and *in vitro* properties of collagen-hydroxyapatite sponges for applications in dentistry. *Carbohydrate Polymers*, 148, 78-85.
- Cheng, F., Lui, C., Wei, X., Yan, T., Li, H., He, J. y Huang, Y. (2017). Preparation and characterization of 2,2,6,6,-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO)-

- oxidized cellulose nanocrystal/alginate biodegradable composite dressing for hemostasis applications. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(5), 3819-3828.
- Chin, C., Jalil, J., Ng, P. Y., y Ng, S. (2018). Development and formulation of *Moringa oleifera* standardised leaf extract film dressing for wound healing application. *Journal of Ethnopharmacology*, 212, 188–199.
- Chopra, M., Bernela, M., Kaur, P., Manuja, A., Kumar, B., y Thakur, R. (2015). Alginate/gum acacia bipolymeric nanohydrogels—Promising carrier for Zinc oxide nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 827–833.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012) CLSI Document M07-A9. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard. 19th Edition, CLSI, Wayne.
- Collins, P. H., Lyne, P. M., y Grange, J. M. (1989). Collins and Lyne's microbiological methods. (6th ed.). London: Butterworth & Co (Publishers) Ltd.
- Das, D., Nath, B. C., Phukon, P., Kalita, A. y Dolui, S. K. (2013). Synthesis of ZnO nanoparticles and evaluation of antioxidant and cytotoxic activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 556–560.
- Eming, S. A., Martin, P. y Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling and translation. *Science Translational Medicine*, 6(265).
- Frykberg, R. G. y Banks, J. (2015). Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in Wound Care*, 4(9), 560–582.
- George, M. y Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. *Journal of Controlled Release*, 114(1), 1–14.
- Gong, C., Luo, Y. y Pan, Y. (2019). Novel synthesized zinc oxide nanoparticles loaded alginate-chitosan biofilm to enhanced wound site activity and anti-septic abilities for the management of complicated abdominal wound

- dehiscence. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 192, 124–130.
- Guo, S., y DiPietro, L. (2010). Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219–229.
- Happy Agarwal, Soumya Menon, Venkat Kumar, S. y Rajeshkumar, S. (2018). Mechanistic study on antibacterial action of zinc oxide nanoparticles synthesized using green route. *Chemico-Biological Interactions*, 286, 60–70.
- Jamdagni, P., Khatri, P. y Rana, J. (2018). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using flower extract of *Nyctanthes arbor-tristis* and their antifungal activity. *Journal of King Saud University - Science*, 30(2), 168–175.
- Khalid, A., Khan, R., Ul-Islam, M., Khan, T. y Wahid, F. (2017). Bacterial cellulose-zinc oxide nanocomposites as a novel dressing system for burn wounds. *Carbohydrate Polymers*, 164, 214–221.
- Khan, S. A., Noreen, F., Kanwal, S., Iqbal, A. y Hussain, G. (2018). Green synthesis of ZnO and Cu-doped ZnO nanoparticles from leaf extracts of *Abutilon indicum*, *Clerodendrum infortunatum*, *Clerodendrum inerme* and investigation of their biological and photocatalytic activities. *Materials Science and Engineering: C*, 82, 46–59.
- Kim, P., Yuan, A., Nam, K., Jiao, A. y Kim, D. (2014). Fabrication of poly(ethylene glycol): gelatin methacrylate composite nanostructures with tunable stiffness and degradation for vascular tissue engineering. *Biofabrication*, 6(2), 024112
- Koga, A. Y., Pereira, A. V., Lipinski, L. C. y Oliveira, M. R. (2018). Evaluation of wound healing effect of alginate films containing Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) gel. *Journal of Biomaterials Applications*, 32(9), 1212–1221.
- Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L. y Debut, A. (2014). Green Approach for Fabrication and Applications of Zinc Oxide Nanoparticles. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2014, 1–7.

- Lee, K. Y. y Mooney, D. J. (2001). Hydrogels for Tissue Engineering. *Chemical Reviews*, 101(7), 1869–1880.
- Lee, K. Y. y Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106–126.
- Mayet, N., Choonara, Y. E., Kumar, P., Tomar, L. K., Tyagi, C., Du Toit, L. C. y Pillay, V. (2014). A Comprehensive Review of Advanced Biopolymeric Wound Healing Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(8), 2211–2230.
- Mbikay, M. (2012). Therapeutic Potential of Moringa oleifera Leaves in Chronic Hyperglycemia and Dyslipidemia: A Review. *Frontiers in Pharmacology*, 3.
- McCarty S.M y Percival S.L. (2013). Proteases and delayed wound healing. *Advances in Wound Care*, 2, 438–447.
- Mishra, Y. K., Chakravadhanula, V. S. K., Hrkac, V., Jebril, S., Agarwal, D. C., Mohapatra, S. y Adelung, R. (2012). Crystal growth behaviour in Au-ZnO nanocomposite under different annealing environments and photoswitchability. *Journal of Applied Physics*, 112(6), 064308.
- Mohandas, A., Jayakumar, R., Sudheesh Kumar, P., Lakshmanan, V. y Biswas, R. (2015). Exploration of alginate hydrogel/nano zinc oxide composite bandages for infected wounds. *International Journal of Nanomedicine*, 53.
- Nagajyothi, P. C., Cha, S. J., Yang, I. J., Sreekanth, T. V. M., Kim, K. J. y Shin, H. M. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory activities of zinc oxide nanoparticles synthesized using Polygala tenuifolia root extract. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 146, 10–17.
- O'Brien, Fergal J. (2011) Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today*, 100(3), 88-95.
- Padmavathy N. y Vijayaraghavan R. (2008). Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. *Science and Technology Advanced Materials* 9(3):035.

- Pardau M., Pereira A.S, Apostolides, Z., Serem, J. C. y Bester, M. J. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory properties of Ilex guayusa tea preparations: a comparison to Camellia sinensis teas. *Food & Function*, 8(12), 4601–4610.
- Raguvaran, R., Manuja, A., Manuja, B. K., Riyesh, T., Singh, S., Kesavan, M. y Dimri, U. (2017). Sodium alginate and gum acacia hydrogels of zinc oxide nanoparticles reduce hemolytic and oxidative stress inflicted by zinc oxide nanoparticles on mammalian cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 967–972.
- Rajakumar, G., Thiruvengadam, M., Mydhili, G., Gomathi, T. y Chung, I. (2017). Green approach for synthesis of zinc oxide nanoparticles from Andrographis paniculata leaf extract and evaluation of their antioxidant, anti-diabetic, and anti-inflammatory activities. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(1), 21–30.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rubio-Elizalde, I., Bernáldez-Sarabia, J., Moreno-Ulloa, A., Vilanova, C., Juárez, P., Licea-Navarro, A. y Castro-Ceseña, A. B. (2019). Scaffolds based on alginate-PEG methyl ether methacrylate-Moringa oleifera-Aloe vera for wound healing applications. *Carbohydrate Polymers*, 206, 455–467.
- Schreml, S., Szeimies, R., Prantl, L., Karrer, S., Landthaler, M. y Babilas, P. (2010). Oxygen in acute and chronic wound healing. *British Journal of Dermatology*, 163(2), 257–268.
- Sen, C. K. y Roy, S. (2008). Redox signals in wound healing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1780(11), 1348–1361.
- Serpone N., Dondi D. y Albini. A. (2007). Inorganic and organic UV filters: their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganic Chimica Acta* 360:794–802.

- Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M. y Mohamad, D. (2015). Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Letters*, 7(3), 219–242.
- Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M. y Tarantilis, P. A. (2014). Total phenolic content, antioxidant activity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops & Products*, 53, 46–54.
- Sudheesh Kumar, P. T., Lakshmanan, V., Anilkumar, T., Ramya, C., Reshmi, P., Unnikrishnan, A., . . . Jayakumar, R. (2012). Flexible and Microporous Chitosan Hydrogel/Nano ZnO Composite Bandages for Wound Dressing: In Vitro and In Vivo Evaluation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 4(5), 2618–2629.
- Toledano, M., Yamauti, M., Osorio, E. y Osorio, R. (2012). Zinc-Inhibited MMP-Mediated Collagen Degradation after Different Dentine Demineralization Procedures. *Caries Research*, 46(3), 201–207.
- Ul-Islam, M., Khattak, W. A., Ullah, M. W., Khan, S. y Park, J. K. (2013). Synthesis of regenerated bacterial cellulose-zinc oxide nanocomposite films for biomedical applications. *Cellulose*, 21(1), 433–447.
- Verma, A. R., Vijayakumar, M., Mathela, C. S. y Rao, C. V. (2009). In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9), 2196–2201.
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y. y Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, 44, 566–571.
- Wittenauer, J., Mäcke, S., Sußmann, D., Schweiggert-Weisz, U. y Carle, R. (2015). Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. *Fitoterapia*, 101, 179–187.

- Yadav, E., Singh, D., Yadav, P. y Verma, A. (2018). Ameliorative effect of biofabricated ZnO nanoparticles of *Trianthema portulacastrum* Linn. on dermal wounds via removal of oxidative stress and inflammation. *RSC Advances*, 8(38), 21621–21635.
- Yang, G., Xiao, Z., Long, H., Ma, K., Zhang, J., Ren, X. y Zhang, J. (2018). Assessment of the characteristics and biocompatibility of gelatin sponge scaffolds prepared by various crosslinking methods. *Scientific Reports*, 8(1).
- Yeh, M., Liang, Y., Hu, C., Cheng, K., Hung, Y., Young, J. y Hong, P. (2012). Studies on a Novel Gelatin Sponge: Preparation and Characterization of Cross-Linked Gelatin Scaffolds Using 2-Chloro-1-Methylpyridinium Iodide as a Zero-Length Cross-Linker. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 23(7), 973–990.
- Zare, M., Namratha, K., Byrappa, K., Surendra, D., Yallappa, S. y Hungund, B. (2018). Surfactant assisted solvothermal synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antimicrobial and antioxidant properties. *Journal of Materials Science & Technology*, 34(6), 1035–1043.
- Zhong, S. P., Zhang, Y. Z., & Lim, C. T. (2010). Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2(5), 510–525.

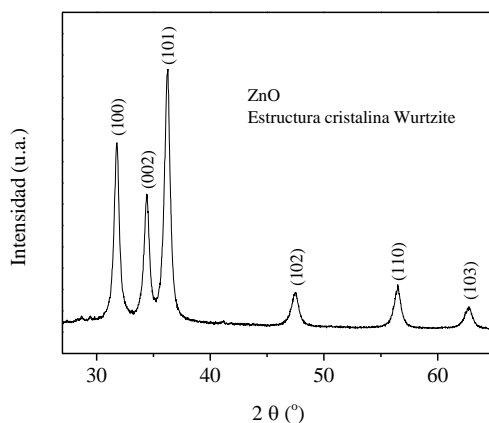
## ANEXO 1

### Síntesis de nanopartículas de ZnO

Para la síntesis del material se utiliza extracto natural de hueso de aguacate, donde se prepara una solución de 50 ml al 2% (m/v), se coloca en agitación por una hora a temperatura de 60 °C, después de esto se filtran en papel Whatman número 4 (20-25  $\mu\text{m}$ ). Al extracto obtenido se les añaden 2g de nitrato de zinc, se deja en parrilla de agitación por 1 h. La solución se coloca a baño maría previamente preparado a una temperatura de 60 °C por un tiempo de 15 horas para la eliminación de agua. Las muestras son calcinadas a 400 °C por 1 hora.

### Caracterización de ZnO biogénicas

Difracción de rayos X:



FT-IR:

