



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  

---

SEDE BOGOTÁ

# **Evaluación fisicoquímica de la liberación de un extracto acuoso de propóleos del departamento del Huila en soportes de colágeno tipo I**

**Leonardo Fernández Rodríguez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades en Microbiología  
Bogotá D.C., Colombia

2015



# **Evaluación fisicoquímica de la liberación de un extracto acuoso de propóleos del departamento del Huila en soportes de colágeno tipo I**

**Leonardo Fernández Rodríguez**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Microbiología**

Director:

QF. Ph. D Juan Camilo Marín Loaiza

Codirectora:

QF. Ph. D Marta Raquel Fontanilla Duque

Línea de investigación:

Biología celular

Grupo de Investigación:

Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades en Microbiología

Bogotá D.C., Colombia

2015



*A Dios por la oportunidad de vivir cada día intensamente, a mi familia que ha sido mi apoyo y sustento y a todas las personas que han sido parte de esta hermosa aventura.*





# Agradecimientos:

A mi familia, Martha mi madre, Yolanda, mi tía, Miguel Ángel mi hermano, empezando por el simple hecho de estar en mi vida y de ahí en adelante no existen palabras para agradecer por su amor, consejo y apoyo incondicionales a lo largo de toda mi vida.

Agradezco al Profesor Juan Camilo Marín por toda la colaboración y asesoría durante la realización de esta tesis.

Al profesor Benjamín Rojano, Director del Laboratorio Ciencias de los Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Verónica Villacorta y Felipe Alzate por su colaboración.

Al profesor Diego Mantovani, a Lucie Levesque, Pascal Chevalier y todo el equipo del Laboratorio de Biomateriales y Bioingeniería de la Universidad Laval (Quebec, Canadá) por la colaboración durante mi intercambio académico.

A mis compañeros de trabajo en el grupo de investigación Edward Suesca, Ronald Jiménez, Diana Millán, Ana Milena Bermeo, Sergio Casadiegos, Diana Nieto, María Elisa Soto, Rosa Helena Bustos, y Liliana Gil, por sus valiosos aportes en la realización de este proyecto; a Adriana Flórez por todas las horas de trabajo compartido que tanto he disfrutado.

Al posgrado de Microbiología, a Socorrito por su enorme paciencia, cariño y diligencia en todas las labores que emprende.

A la universidad Nacional de Colombia (al Posgrado de Microbiología, a la Facultad de Ciencias y a la Dirección de investigación Sede Bogotá) y al gobierno de Canadá por el apoyo financiero recibido.

Finalmente, y de manera muy especial quiero expresar mi agradecimiento a la profesora Marta Fontanilla por haberme aceptado en el grupo, por creer en mis capacidades, por su apoyo continuo y por sus consejos y actitud hacia la vida que tanto me han influenciado.

## Resumen

En el presente trabajo se asoció un extracto acuoso de propóleos a soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno y se evaluó fisicoquímicamente la liberación de los metabolitos secundarios con la finalidad de estudiar su posible uso como alternativa terapéutica en los procesos de sanación de heridas. Una muestra de propóleos del municipio de Gigante en el departamento del Huila fue utilizada para elaborar un extracto acuoso y su contenido de fenoles totales y compuestos flavonoides se determinaron por los métodos de Folin-Ciocalteu y por la formación de complejos con Cloruro de Aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) respectivamente; Se encontró que el contenido de fenoles totales en el extracto fue de  $2,249 \pm 0,034$  miligramos equivalentes de Ácido Gálico por gramo de propóleos ( $\text{mgAG/g}_{\text{prop}}$ ) y de  $0,382 \pm 0,023$  ( $\text{mgQ/g}_{\text{prop}}$ ) en el caso de los compuestos flavonoides. La citotoxicidad del extracto acuoso de propóleos se determinó de acuerdo a la norma ISO 10993-5, sobre la línea celular de fibroblastos L929 encontrándose que concentraciones menores o iguales a 20% v/v no presentan citotoxicidad. La asociación del extracto acuoso de propóleos al 20% v/v con los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno presenta una liberación de metabolitos secundarios de manera programada y controlada. El extracto de propóleos demostró poseer actividad antioxidante de acuerdo con las metodologías FRAP y ORAC resultado que puede atribuirse en parte al contenido de fenoles encontrado. En contexto de la beca “Futuros Líderes de las América” se realizó un intercambio académico con el grupo de Biomateriales y Bioingeniería de la Universidad Laval (Quebec, Canadá) donde se asoció el extracto acuoso de propóleos al 20% v/v en soportes tipo hidrogel elaborados con plulano-dextrano y se analizó el perfil de liberación de los metabolitos secundarios encontrándose que estos soportes entregan de manera inmediata todo el contenido de extracto asociado; igualmente se encontró que características físicas de este soporte como su baja resistencia al estrés mecánico lo hacen una alternativa menos favorable que los soportes de colágeno en un posible uso a nivel biológico. La proliferación celular de la línea de fibroblastos 3T3 en soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno es afectada por la presencia del extracto acuoso de propóleos al 20% v/v, sin embargo su contenido de fenoles y flavonoides puede aportar actividad antiinflamatoria y antibiótica así como actividad antioxidante en el lugar de aplicación lo que podría compensar la disminución del crecimiento celular. Los resultados obtenidos sugieren que la asociación de extractos acuosos de propóleos con soportes de colágeno tipo I con partículas de gelatina-colágeno puede llegar a constituirse en una herramienta terapéutica que impacte de manera positiva el proceso de sanación de heridas.

**Palabras clave:** *Soporte de colágeno, extracto de propóleos, actividad antioxidante, citotoxicidad, cicatrización de heridas, proliferación celular.*

---

## Abstract

In this work an aqueous extract of propolis was associated with type I collagen scaffolds with gelatin-collagen microparticles and the release of secondary metabolites was physiochemically evaluated in order to study its possible use as therapeutic alternative in process of wound healing. A sample of propolis from the municipality of Gigante (Huila, Colombia) was used to produce an aqueous extract and its contents of total phenols and flavonoids compounds were determined by the methods of Folin-Ciocalteu and by complexation with aluminum chloride ( $\text{AlCl}_3$ ) respectively. It was found that the total phenol content in the extract was  $2,249 \pm 0,034$  milligrams equivalents of Gallic Acid per gram of propolis ( $\text{mgAG/g}_{\text{prop}}$ ) and  $0,382 \pm 0,023$  milligrams equivalent of Quercetin per gram of propolis ( $\text{mgQ/g}_{\text{prop}}$ ) for the flavonoid compounds. The cytotoxicity of aqueous propolis extract was determined according to ISO standard 10993-5 using the cell line of fibroblasts L929 showing that concentrations equal or less than 20% v/v do not exhibit cytotoxicity. The association of the aqueous extract of propolis 20% v/v with type I collagen scaffolds with gelatin-collagen microparticles exhibit a release of the secondary metabolites in a programmed and controlled manner. The propolis extract proved to have antioxidant activity according to the FRAP and ORAC assays, these results can be attributed in part to the content of phenols found. In context of the scholarship "Future Leaders of the Americas" an academic exchange with the group of Biomaterials and Bioengineering at the Laval University (Quebec, Canada) was accomplished. In this part of the work, the aqueous extract of propolis 20% v/v was associated to pullulan-dextran scaffolds (hydrogel) and the release profile showed that the metabolites were delivered immediately into the media; It was also found in this scaffold that physical characteristics such as low resistance to mechanical stress do a less favorable alternative compared with collagen scaffolds in a possible use at biological level. The proliferation assay using the cell line of fibroblasts 3T3 on type I collagen scaffolds with gelatin-collagen microparticles associated with propolis extract 20% v/v reveled that this system affect in a significant manner the cell growth; however their content of phenols and flavonoids can provide anti-inflammatory and antibiotic activity as well as antioxidant activity at the application site; these advantages could compensate decrease in cell growth. The results suggest that the association of aqueous extracts of propolis with supports collagen type I collagen-gelatin particles could be a therapeutic tool that positively impact the healing process of wounds.

**Keywords:** Support collagen, propolis extract, antioxidant activity, cytotoxicity, wound healing, cell proliferation.

# Contenido

pág.

Resumen.....	IX
Abstract.....	X
Lista de Figuras.....	XIII
Lista de Abreviaturas.....	XIV
Introducción.....	1
1. Marco Teórico.....	4
1.1. La piel: generalidades.....	4
1.2. Reparación de heridas de la piel.....	6
1.3. Cierre de heridas.....	7
1.4. Biología del cierre de heridas.....	7
1.4.1. Inflamación.....	7
1.4.2. Formación de nuevo tejido.....	7
1.4.3. Remodelamiento tisular.....	8
1.5. Ingeniería de Tejidos en la regeneración.....	9
1.5.1. Colágeno.....	10
1.5.2. Soportes de pululano-dextrano.....	11
1.6. Especies Reactivas de Oxígeno.....	12
1.7. Propóleos y el tratamiento de heridas.....	13
2. Objetivos.....	16
2.1. Objetivo general.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. Métodos.....	17
3.1. Propóleos.....	17
3.2. Establecimiento de un método para obtener el extracto acuoso de propóleos.....	17
3.3. Cultivo líneas celulares (L929 y 3T3).....	17
3.4. Ensayo de citotoxicidad de los extractos.....	18
3.5. Asociación del extracto a los soportes de colágeno.....	19
3.6. Evaluación <i>in vitro</i> de la liberación de metabolitos del extracto de propóleos asociados a los soportes de colágeno.....	19
3.6.1. Determinación de fenoles totales.....	19

---

3.6.2. Determinación de compuestos flavonoides.....	20
3.6.3. Método FRAP.....	20
3.6.4. Método ORAC.....	20
3.7. Elaboración de soportes de pululano-dextrano.....	21
3.8. Asociación del extracto a los soportes de pululano-dextrano.....	21
3.9. Evaluación <i>in vitro</i> de la liberación de metabolitos del extracto de propóleos asociados a los soportes de pululano-dextrano.....	21
3.10. Ensayo de proliferación en soportes de colágeno previamente asociados con extracto de propóleos.....	22
3.11. Ensayo de microscopía de fluorescencia.....	22
3.12. Análisis estadístico.....	23
4. Resultados.....	24
4.1. Estandarización de un método para la obtención de un extracto acuoso de propóleos.....	24
4.2. Citotoxicidad inducida por los extractos de propóleos.....	24
4.3. Evaluación <i>in vitro</i> de la liberación de los metabolitos del extracto de propóleos asociados a los soportes de colágeno.....	25
4.3.1. Determinación de fenoles totales.....	25
4.3.2. Determinación de compuestos flavonoides.....	26
4.3.3. Evaluación de la actividad antioxidante del extracto de propóleos mediante el método FRAP.....	27
4.3.4. Evaluación de la actividad antioxidante del extracto de propóleos mediante el método ORAC.....	28
4.4. Ensayos de liberación de los metabolitos del extracto de propóleos asociados a los soportes de pululano-dextrano.....	29
4.4.1. Determinación de fenoles totales.....	29
4.4.2. Determinación de compuestos flavonoides.....	31
4.5. Ensayo de proliferación celular en soportes de colágeno impregnados con extracto de propóleos.....	33
5. Discusión.....	36
6. Conclusiones y recomendaciones.....	41
A. Anexo: Descripción del Municipio de Gigante en el departamento del Huila.....	43
Bibliografía.....	45

## Lista de figuras

pág.

<b>Figura 1-1.</b> Estructura de la piel.....	5
<b>Figura 1-2.</b> Aspecto del propóleos.....	13
<b>Figura 1-3.</b> Algunos productos con propóleos en Colombia.....	15
<b>Figura 4-1.</b> Porcentaje de Viabilidad Celular de fibroblastos L929 expuestos a diferentes concentraciones del extracto de propóleos.....	25
<b>Figura 4-2.</b> Liberación de Fenoles Totales del extracto de propóleos al 20% v/v asociado a soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno.....	26
<b>Figura 4-3.</b> Liberación de Compuestos Flavonoides del extracto de propóleos al 20% v/v asociado a soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno.....	27
<b>Figura 4-4.</b> Actividad antioxidante evaluada por la metodología FRAP para el extracto de propóleos 20% v/v asociado a soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno.....	28
<b>Figura 4-5.</b> Actividad antioxidante determinada por la metodología ORAC para el extracto de propóleos 20% v/v asociado a soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno.....	29
<b>Figura 4-6.</b> Liberación de Fenoles Totales del extracto de propóleos al 20% v/v asociado a soportes de pululano-dextrano.....	30
<b>Figura 4-7.</b> Comparación de los perfiles de liberación de Fenoles Totales del extracto de propóleos al 20% v/v asociado con dos tipos diferentes de soportes.....	31
<b>Figura 4-8.</b> Liberación de Compuestos Flavonoides del extracto de propóleos al 20% v/v asociado a soportes de pululano-dextrano.....	32
<b>Figura 4-9.</b> Comparación de los perfiles de liberación de Compuestos Flavonoides del extracto de propóleos al 20% v/v asociado con dos tipos diferentes de soportes.....	33
<b>Figura 4-10.</b> Proliferación celular con extracto de propóleos al 20% v/v asociado a soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina colágeno.....	34
<b>Figura 4-11.</b> Microscopía de fluorescencia para el ensayo de proliferación celular con extracto de propóleos al 20% v/v asociado a soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno.....	35
<b>Figura A-1.</b> Mapa geográfico y político del municipio de Gigante en el Departamento del Huila.....	44

---

## Abreviaturas

AAPH: 2, 2<sup>o</sup>-azobis (2-aminopropano diclorhidrato).

ATCC: American Type Culture Colletion.

BSA: albumina sérica bovina.

°C: grados centígrados.

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono.

cm<sup>2</sup>: centímetros cuadrados.

Dapi: 4',6-diamino-2-fenilindol

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno.

mgAG/g<sub>prop</sub>: miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de propóleos.

mgQ/g<sub>prop</sub>: miligramos equivalentes de quercetina por gramo de propóleos.

mL: mililitros.

μL: microlitros.

mm: milímetros.

Mm: milimolar.

MTT: bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol.

NCTC: National Collection of Type Cultures.

nm: nanómetros.

PBS: solución buffer fosfatos.

SFB: suero fetal bovino.

SGC: soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno.

Trolox: ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico.

TPTZ: 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina

# Introducción

La piel es el órgano más extenso del cuerpo y tiene múltiples funciones entre las que se encuentran la protección de órganos y tejidos, la sensibilidad a estímulos tales como el dolor, el calor, el frío, la presión y el tacto, la síntesis de sustancias químicas como la vitamina D, la excreción de sustancias como el agua y la regulación de la temperatura corporal.

Al encontrarse la piel en constante contacto con el medio ambiente es susceptible de sufrir lesiones como cortaduras y quemaduras que comprometen su integridad, eventos ante los cuales este órgano posee la capacidad de repararse; sin embargo, dicha reparación puede ser limitada por la extensión y gravedad de la herida. A esto debe sumarse el hecho de que la edad, postración en cama y enfermedades como la diabetes y lesiones vasculares obstaculizan la apropiada cicatrización de las heridas haciéndolas crónicas.

Aunque el tratamiento convencional ideal de las heridas de piel es el autoinjerto, cuando el área lesionada es grande el tejido propio disponible es muy reducido; adicionalmente, durante su obtención se crean nuevas heridas en la zona donante que aumentan la morbilidad. La ingeniería de tejidos ha desarrollado sustitutos de piel bioactivos, con el propósito de superar los inconvenientes descritos.

La elevada producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en una herida, induce un estado de estrés oxidativo desfavorable para la cicatrización porque contribuye a que la respuesta inflamatoria se vuelva crónica (*Soneja et al., 2005; Eming et al., 2007; Schafer and Werner, 2008*). Por esta razón, es importante desarrollar productos que además de promover la cicatrización ayuden a controlar el estrés oxidativo. El Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos de la Universidad Nacional de Colombia ha desarrollado soportes de colágeno tipo I, que solos o sembrados con células mejoran la cicatrización de heridas mucosas de espesor parcial y heridas de piel de espesor total en conejos. Esos soportes fueron modificados para incluir en su interior micropartículas de gelatina-colágeno (SGC), con el fin de convertirlos en un sistema de liberación controlada capaz de liberar sostenidamente sustancias bioactivas que contribuyan al proceso de regeneración de heridas de piel.

---

Debido a las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de la *Calendula officinalis*, los SGC fueron cargados con un extracto hidroglicólico de la flor de esta planta (Jiménez, 2013; Jiménez et al., 2015) y evaluados en un modelo animal lagomorfo de heridas cutáneas de espesor total (Millan, 2014). Nuestros resultados indican que los soportes cargados con el extracto liberan polifenoles al medio de manera sostenida durante 14 días; igualmente, que estos se integran menos que los soportes sin extracto al lecho de la herida y que la cicatrización observada es similar a las de las heridas que se dejan cerrar por segunda intención usadas como control. La no integración de los SGC cargados a la herida puede deberse a que su degradación es menor que la de los soportes sin extracto, debido a que el extracto de *C. officinalis* aumenta la acción entrecruzante del glutaraldehído empleado para estabilizar a los soportes.

Popularmente los propóleos se han usado como antimicrobiano (antibacteriano, antiviral, antifúngico, antiprotazoario), antioxidante, antiinflamatorio, inmunomodulador y anticancerígeno (Gregory et al., 2002; Pillai et al., 2010; Barroso et al., 2012). Sus actividades antioxidante y antimicrobiana lo convierten en un buen candidato para aplicar en heridas crónicas de piel. En Colombia, el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) reconoce el uso de los propóleos en preparaciones expectorantes como coadyuvante en el tratamiento de trastornos respiratorios leves, dejando a un lado su potencial empleo en otros campos de la salud y en los cuales este trabajo espera hacer un aporte.

El objetivo principal de ésta tesis fue asociar un extracto acuoso de propóleos a soportes de Colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno, y evaluar fisicoquímicamente su liberación. Para tal fin, se elaboró un extracto acuoso de propóleos determinando su contenido de fenoles y flavonoides totales. Posteriormente, se realizaron pruebas *in vitro* de citotoxicidad para establecer la concentración óptima a la cual podían ser asociados a los soportes. Finalmente, se evaluó *in vitro* la liberación de fenoles y flavonoides totales, así como la actividad antioxidante de los metabolitos secundarios liberados por los soportes de colágeno tipo I asociados con micropartículas de gelatina-colágeno.

Adicionalmente, gracias a la beca Futuros Líderes de las Américas ofrecida por el gobierno de Canadá y con el apoyo de la Universidad Nacional de Colombia se desarrolló un intercambio académico con el Grupo de Biomateriales y Bioingeniería la Universidad de Laval (Quebec, Canadá), en la que se realizaron dos actividades. La primera fue evaluar la liberación de un extracto de propóleos incorporado en un soporte de polisacáridos elaborado con pululano y dextrano; la

---

segunda, establecer la proliferación de fibroblastos 3T3 sembrados en SGC cargados con un extracto acuoso de propóleos.

# 1. Marco Teórico

## 1.1. La piel: generalidades

La piel está constituida por dos capas: **epidermis** y **dermis**. La epidermis está formada por un epitelio estratificado, mientras que la dermis está compuesta por tejido conjuntivo vascularizado cuyo grosor varía a lo largo del cuerpo. Dependiendo del grosor de la epidermis, la piel se puede clasificar en piel fina (la mayoría de la superficie corporal), o piel gruesa (como en la palma de manos y pies); el espesor cutáneo puede variar entre 0.5 mm en áreas como los párpados hasta más de 5 mm en regiones como la espalda, esa diferencia se debe principalmente a la profundidad de la dermis. La región donde la dermis y la epidermis se unen se denomina **unión dermoepidérmica**. Bajo la dermis se localiza una capa laxa, rica en grasa y tejido areolar llamada **hipodermis** o aponeurosis superficial (*Thibodeau and Patton, 2000*).

En la epidermis se encuentran los siguientes tipos de células:

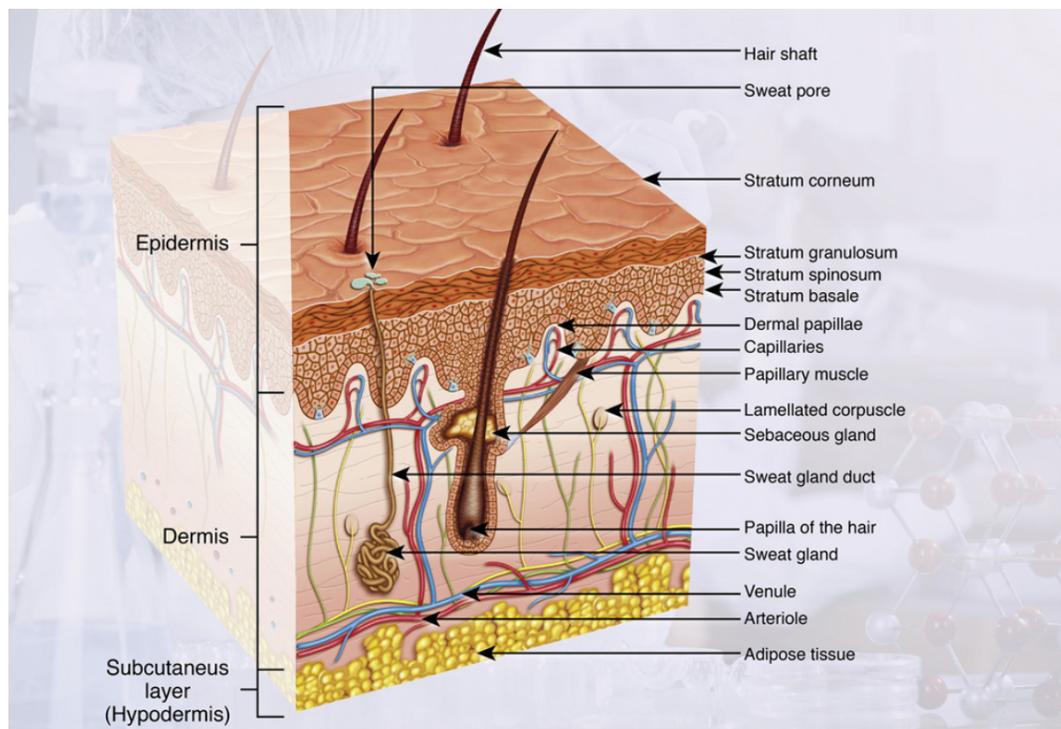
- **Queratinocitos:** Contienen queratina; se organizan por capas o estratos y constituyen más del 90% de las células epiteliales.
- **Melanocitos:** Dan coloración a la piel y sirven para filtrar la luz ultravioleta; pueden constituir hasta el 5% de las células epidérmicas.
- **Células de Langerhans:** Son las células de defensa (dendríticas), que hacen parte de la respuesta inmune innata (*Brohem et al., 2010; Mathes et al., 2014*).

Los queratinocitos que conforman la epidermis se distribuyen hasta en cinco (5) estratos o capas; estas son (*Thibodeau and Patton, 2000; Mathes et al., 2014*):

- **Estrato basal:** Es la capa más profunda del epitelio. Está constituido por células cilíndricas que se autorrenuevan todo el tiempo y que al dividirse asimétricamente producen células que progresivamente migran a las capas más externas hasta que se desprenden de la piel.

- **Estrato espinoso:** Está formado por ocho a diez capas de queratinocitos de forma irregular; los cuales se unen entre sí por medio de los desmosomas, que confieren a las células la apariencia de tener púas (de ahí su nombre).
- **Estrato granuloso:** Estrato en el que se inicia la queratinización de las células. En esta capa los queratinocitos contienen gránulos de **queratohialina**, de ahí su nombre. También, poseen altos niveles de enzimas lisosómicas y usualmente carecen de núcleos.
- **Estrato lúcido:** Capa clara conformada por queratinocitos translúcidos, que contienen **eleidina**, un precursor de la queratina. Estas células habitualmente no poseen núcleos.
- **Estrato córneo:** Es la capa más superficial y en su parte más externa, está constituida por células planas muertas que continuamente se desprenden de la piel. En esta capa los queratinocitos contienen **queratina** adquirida durante la queratinización llevada a cabo durante su migración a través de los diferentes estratos del epitelio. Las células se encuentran unidas entre sí por desmosomas, constituyendo una **barrera** física que protege al cuerpo de la pérdida de humedad y de contaminantes químicos y microbiológicos.

Adicionalmente, se conoce como **estrato germinativo** al conjunto de células del estrato espinoso y el estrato basal (**Figura 1-1**).



**Figura 1-1.** Estructura de la piel. Tomado de (*Mathes et al., 2014*).

---

La piel como órgano tiene múltiples e importantes funciones para ayudar a mantener la homeostasia, entre estas se encuentran las siguientes (*Thibodeau and Patton, 2000*):

- **Protección:** Actúa como una barrera mecánica que previene la deshidratación y el paso de microorganismos; así como, los efectos nocivos de la radiación ultravioleta y los traumas mecánicos.
- **Sensibilidad:** Posee receptores sensoriales que captan estímulos como el dolor, el calor, el frío, la presión y el tacto.
- **Excreción:** Debido a que posee glándulas sudoríparas y sebáceas se puede generar sobre la superficie de la piel una película constituida por ácidos grasos, ceras, agua, amoníaco, urea y cuyas funciones abarcan: acción antibacteriana, antifúngica, lubricación, hidratación, neutralización de sustancias irritantes y algunos tóxicos.
- **Síntesis de vitamina D:** En ella se produce colecalciferol, que al transportarse al hígado es usado como precursor de la vitamina D.
- **Inmunidad:** La piel es una barrera natural que hace parte de la inmunidad innata. En ella se encuentran células fagocíticas encargadas de la destrucción de microorganismos y de la presentación de antígenos a los linfocitos T ayudadores.
- **Homeostasia de la temperatura corporal:** La piel tiene un papel fundamental en la disminución de la temperatura del cuerpo cuando aumenta debido a las actividades musculares y metabólicas; esto se logra por fenómenos físicos tales como evaporación, conducción y convección.

## 1.2. Reparación de heridas de la piel

Cuando la continuidad de la piel se pierde se induce el proceso de reparación, el cual es un mecanismo de supervivencia que busca restablecer la homeostasis de la zona lesionada, removiendo los tejidos dañados o destruidos y restaurando la continuidad perdida (*Enoch and Leaper, 2007; Beldon, 2010*).

La reparación de heridas puede ocurrir por regeneración o por reparación, dependiendo del tipo de lesión. Si la herida afecta a la epidermis, ocurre regeneración es decir se forma un tejido con las mismas características morfológicas y funcionales del tejido original. Si hay pérdida de tejido dermal junto con anexos (folículos pilosos, glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas), ocurre reparación

---

que conlleva a la formación de tejido cicatrizal que difiere del tejido original (*Beldon, 2010; Stroncek, 2007*).

### **1.3. Cierre de heridas**

El cierre de las heridas se puede clasificar en cierre por primera y cierre por segunda intención. En el cierre por primera intención, la herida es cerrada dentro de las 24 horas posteriores a su apertura juntando sus bordes con dispositivos mecánicos como suturas. En el cierre por segunda intención, los bordes de las heridas no pueden ser unidos debido a la extensión de la lesión (*Enoch and Leaper, 2007; Stroncek and Reichert, 2007; Beldon, 2010*).

### **1.4. Biología del cierre de heridas**

El cierre de heridas es un proceso dinámico que involucra mediadores solubles, células sanguíneas, matriz extracelular y células parenquimales. Este proceso se puede dividir en tres fases que se sobreponen: inflamación, formación de nuevo tejido y remodelamiento tisular (*Singer and Clark, 1999; Stroncek and Reichert 2007; Gurtner et al., 2008*).

#### **1.4.1. Inflamación**

Se presenta cuando se produce la lesión con el propósito de evitar la pérdida de sangre, la pérdida de fluidos y para eliminar el tejido dañado y posibles contaminantes. En este proceso intervienen componentes solubles de la sangre (cascada de la coagulación, citoquinas, quininas) y células del sistema inmune. Se caracteriza por la formación de un tapón de plaquetas fijadas en una matriz de fibrina que sirve como soporte temporal para la infiltración de neutrófilos, monocitos-macrófagos, células endoteliales y fibroblastos (*Enoch and Leaper, 2007; Eming et al., 2007; Barrientos et al., 2008; Shaw and Martin, 2009; Martin, 2015*).

#### **1.4.2. Formación de nuevo tejido**

Ocurre entre los días dos a diez posteriores a la generación de la lesión. En esta etapa se observa migración y proliferación celular en el coágulo de fibrina; hay procesos de angiogénesis (formación de vasos sanguíneos) (*Shaw and Martin, 2009*) y reemplazo de la matriz de fibrina por tejido de

granulación, el cual permite la migración de queratinocitos con lo cual eventualmente se restaurará la barrera epitelial (*Gurtner et al., 2008; Martin, 2015*).

Los mediadores solubles tales como factores de crecimiento, citoquinas y quimoquinas, juegan un papel fundamental en la promoción y regulación de los procesos de reparación de heridas. Entre estos mediadores se encuentran la familia de factores de crecimiento epidermal (EGF), la familia de factores de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor estimulante de crecimiento de colonias de granulocitos (GM-CSF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), la familia de interleuquinas (IL) y la familia de factores de necrosis tumoral (TGF- $\alpha$ ) (*Barrientos et al., 2008*). En esta etapa, fibroblastos estimulados por los macrófagos se diferencian a miofibroblastos, células contráctiles que promueven el cierre de la herida y que con los fibroblastos sintetizan la nueva matriz extracelular constituyente principal de la cicatriz madura (*Gurtner et al., 2008*).

### **1.4.3. Remodelamiento tisular**

Este proceso comienza aproximadamente de dos a tres semanas después de que se ha producido la lesión y puede prolongarse hasta más de un año (*Williamson and Harding, 2004*). Durante esta fase los mecanismos activados en los procesos iniciados anteriormente se van deteniendo, de tal manera que la mayoría de las células endoteliales, macrófagos y miofibroblastos salen del área de la herida o inician procesos de apoptosis (muerte celular programada), dejando un tejido constituido principalmente por colágeno, otras proteínas de matriz extracelular y pocas células. Así mismo, se puede observar recambio del colágeno III de la matriz por colágeno tipo I en procesos catalizados por metaloproteinasas secretadas por células endoteliales, macrófagos y fibroblastos (*Gurtner et al., 2008*). Al final del restablecimiento de la continuidad, la resistencia a la tensión del tejido cicatrizal es aproximadamente 80% de la resistencia exhibida por el tejido original sano (*Williamson and Harding, 2004*).

Cuando todos los procesos mencionados anteriormente se realizan de una manera ininterrumpida la reparación es exitosa y tales heridas se denominan “heridas agudas”, pero algunas veces estos mecanismos se alteran, con lo cual el proceso de sanación falla y la reparación es muy lenta o no se completa, a estas heridas se les denominan “crónicas” (*Beldon, 2010*).

## 1.5. Ingeniería de Tejidos en la regeneración

La ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa constituyen un campo interdisciplinario que utiliza los conceptos de la bioingeniería, las ciencias de la vida y las ciencias clínicas para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan y mejoren la función de un tejido (*Patrick et al., 1998*). Para lograr este propósito, se usan células (p.e. fibroblastos, condrocitos), soportes naturales (p.e. colágeno, alginato) o sintéticos (p.e. ácido lacto-glicólico), y moléculas con bioactividad (*Langer and Vacanti, 1993*), que solos o combinados buscan mejorar la reparación (*Vacanti and Langer, 1999; Glowacki and Mizuno, 2007*).

Cuando ocurren pérdidas de continuidad de la piel como quemaduras, heridas crónicas o agudas, es importante evitar la pérdida de electrolitos, la infección local y la aparición de tejido de mala calidad responsable de las secuelas retractiles e hipertróficas (*Herford et al., 2010; Lamy et al., 2015*). El mejor material para el cierre de heridas es la propia piel del paciente (autoinjerto); para obtenerla, en una zona donante se toma una porción de piel de espesor parcial, epidermis y una delgada capa de dermis, la cual se coloca sobre la herida desbridada. El autoinjerto está limitado por la disponibilidad de zonas donantes y por la morbilidad que se genera al remover el injerto (*Schullz et al., 2000*). Sustitutos de piel desarrollados por la ingeniería de tejidos, pueden solucionar los inconvenientes de los autoinjertos naturales al convertirse en una fuente alterna de tejido; algunos de ellos, ya han sido aprobados por las autoridades regulatorias de varios países y están siendo aplicados en pacientes. Entre estos se encuentran: Biobrane<sup>TM</sup> constituido por láminas de silicona, Nylon<sup>®</sup> y colágeno; Integra<sup>®</sup> elaborado a partir de colágeno tipo I y condroitin sulfato recubierto con una capa de silicona; Transcyte<sup>®</sup> compuesto de láminas de silicona, Nylon<sup>®</sup> y colágeno con fibroblastos neonatales; Apligraf<sup>®</sup> constituido por una lámina de queratinocitos neonatales y una capa de colágeno con fibroblastos neonatales; Dermagraft<sup>®</sup> que posee una matriz de ácidos poliglicólicos con fibroblastos neonatales; AlloDerm<sup>®</sup> y Graftjacket<sup>®</sup> constituidos por dermis cadavérica acelular; EpiCell<sup>TM</sup> que es un cultivo autólogo de queratinocitos; Laserskin<sup>TM</sup> compuesto por una capa de queratinocitos autólogos unido a una capa de ácido hialurónico con perforaciones laser, y Matriderm<sup>®</sup> matriz tridimensional compuesta de colágeno tipo I, III, V y elastina todas de origen bovino (*Jones et al., 2002; Limová, 2010; Dantzer, 2011; Nyame et al., 2014; Cook et al., 2014*).

Es importante resaltar que independiente de la composición o procedencia de elaboración de los sustitutos de piel, cuando reemplazan a la dermis se espera que cumplan con los siguientes requisitos funcionales: (1) Proteger la herida tanto de infecciones como de la pérdida de fluidos; (2)

Proporcionar un soporte estable y biodegradable para la síntesis de nuevo tejido; (3) Permitir la migración, adhesión y proliferación celular y (4) Proporcionar integridad mecánica (*Van der Veen et al., 2010; Limová, 2010; Dantzer, 2011*). Por otro lado, la evolución de este tipo de tecnologías ha permitido abordar campos de estudio complementarios, tales como modelos alternativos al uso de animales para pruebas cosméticas, modelos de estudio de radiación sobre la piel y modelos para el estudio de la absorción y desarrollo de medicamentos (*Brohem et al., 2010; Mathes et al., 2014; Flaten et al., 2015*).

En Colombia, el Grupo de Ingeniería de Tejidos de la Universidad Nacional de Colombia trabaja en el desarrollo de sustitutos de tejido conectivo blando a partir de soportes de colágeno tipo I, con el fin de que se pueda suplir localmente la demanda de sustitutos de mucosa oral y piel. Estos productos han sido evaluados preclínicamente en modelos de heridas de mucosa oral y de piel, mostrando una acción benéfica en las heridas en que se colocan (*Bello et al., 2004, Espinosa et al., 2010; Fontanilla and Espinosa, 2012, Millán D., 2014*). Los soportes de colágeno I fueron modificados mediante la inclusión de micropartículas de gelatina-colágeno (GC), para que liberen controladamente sustancias bioactivas que estimulen la regeneración. También, fueron cargados con un extracto hidroglicólico de flor de caléndula (*Jiménez, 2013; Jiménez et al., 2015*) y usados como injerto en un modelo lagomorfo de herida cutánea de espesor total (*Millán et al., Manuscrito en revisión*). Los resultados de la evaluación preclínica de los soportes modificados cargados con extracto de caléndula, muestran que no hay diferencias entre las heridas en las que se empleó y heridas que cerraron por segunda intención; probablemente, porque los polifenoles presentes en el extracto aumentan el entrecruzamiento del colágeno producido por el glutaraldehído, disminuyendo su biodegradabilidad y por ende su bioactividad. Por el contrario, los soportes sin el extracto mejoraron la cicatrización sugiriendo su potencial uso como sistema controlado de liberación para otros compuestos.

### **1.5.1. Colágeno**

La matriz extracelular de los vertebrados, responsable de conferir integridad estructural, está constituida principalmente por la familia de proteínas del colágeno. Hasta el momento se han descrito 29 tipos, los cuales se distinguen con números romanos (Colágeno I hasta colágeno XXIX). Los colágenos se clasifican en fibrilares, de membrana basal, fibrilares asociadas con triples hélices interrumpidas, de cadena corta, fibrilares de anclaje, multiplexinas, y asociados a membrana con triples hélices interrumpidas (*Brinckmann et al., 2005; Stein et al., 2009; Parenteau-Bareil et al.,*

2010).

El colágeno está relacionado con el cierre de heridas, la homeostasis, la coagulación y la inflamación (Olczyk et al. 2013). A nivel celular promueve el crecimiento, la diferenciación, la migración, la adhesión y la agregación; de la misma manera tiene un papel importante en señalización celular, angiogénesis y expresión de citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento (Stein et al, 2009; Shoseyov et al. 2010; Olczyk et al. 2013).

De los diferentes tipos de colágeno reportados el colágeno tipo I es el más abundante constituyendo hasta el 30% en peso de las proteínas corporales y el 90% del colágeno total en el cuerpo humano (Abraham et al., 2008). Se encuentra en la Matriz Extra Celular (MEC) de huesos, tendones, aorta, pulmón y piel confiriendo resistencia mecánica a la tensión y contribuyendo a proporcionar estructura a los tejidos. El colágeno tipo I es un heterodímero constituido por dos péptidos o cadenas  $\alpha 1$  y una cadena  $\alpha 2$ , con un peso promedio de 300 KDa y abundante contenido de prolina e hidroxiprolina (Stein et al., 2009; Shoseyov et al. 2010).

Como biomaterial, el colágeno ha sido utilizado extensamente debido a su afinidad con el agua, baja antigenicidad, muy buena compatibilidad celular, degradabilidad, porosidad, estabilidad mecánica y habilidad para promover la regeneración tisular (Abraham et al., 2008; Kirubanandan and Sehgal, 2010). Comúnmente se aísla de piel y tendones bovinos, piel porcina, colas de rata, animales marinos como esponjas y medusas e incluso a partir de plantas modificadas genéticamente como colágeno recombinante (Ma et al., 2003; Parenteau-Bareil et al., 2010; Herford et al., 2010; Kirubanandan and Sehgal, 2010; Shoseyov et al., 2010).

### 1.5.2. Soportes de pululano-dextrano

En la actualidad un amplio campo de estudio en la Ingeniería de Tejidos se desarrolla alrededor de la creación de biomateriales que tengan aplicación como soportes; entre estos se pueden destacar los hidrogeles, redes poliméricas que pueden hincharse en presencia de agua o fluidos corporales, logrando productos que se asemejan a la matriz extracelular (Kirschner and Anseth, 2013; Cutiongco et al., 2014).

El pululano y el dextrano son polisacáridos usados por la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria como excipientes por su baja inmunogenicidad, reactividad, adhesividad, formación de

cubiertas y degradabilidad enzimática (Autissier et al., 2007; Le Visage et al., 2012). El pululano, es un polisacárido lineal producido por la fermentación del hongo *Aureobasidium pullulan*, que se usa a nivel farmacéutico como expansor plasmático y en la manufactura de lágrimas artificiales. El dextrano, es un polisacárido constituido por subunidades de glucosa que se obtiene en fermentaciones bacterianas, muy empleado en la industria farmacéutica para hacer cápsulas (Autissier et al. 2010). Estos materiales pueden formar soportes tridimensionales estables con tamaño de poro ajustable, al ser entrecruzados con diferentes agentes (Chaouat et al. 2006; Fricain et al. 2013; Cutiongco et al., 2014). Existen reportes de evaluaciones de soportes de pululan y dextran en cultivos de líneas celulares e incorporación de factores de crecimiento (Autissier et al., 2007; Laverghner et al. 2012; Purnama et al. 2013).

## 1.6. Especies Reactivas de Oxígeno

El oxígeno es un elemento fundamental para la vida, hace parte de moléculas bioactivas y actúa como aceptor final de electrones durante la respiración aeróbica. Debido al carácter electronegativo del oxígeno, algunas de las moléculas formadas durante el metabolismo se hacen inestables dando lugar a la formación de compuestos intermedios de corta duración con capacidad para reaccionar con otras moléculas, estos compuestos se conocen como Especies Reactivas de Oxígeno (ERO). Entre las ERO se encuentran el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), el anión súper óxido ( $\text{O}_2^-$ ) y el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), importantes durante la respuesta inflamatoria debido a que ayudan a destruir microorganismos invasores, degradar tejido dañado y favorecer la quimiotaxis (Venereo, 2002; Soneja et al., 2005; Bickers and Athar, 2006; Maldonado et al., 2010; Rojano et al., 2012).

En condiciones normales las ERO son controladas por moléculas antioxidantes como el alfa-tocoferol, vitamina E, ácido ascórbico, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa, catalasa y quinona reductasa. Sin embargo, la concentración de éstas moléculas en el organismo es limitada y cuando la producción de ERO es abundante, esta línea de defensa se satura. Se produce entonces, un exceso de ERO que puede ser lesivo para los seres vivos porque desencadena un proceso que se conoce como estrés oxidativo; el cual, está relacionado con enfermedades crónicas como aterosclerosis, osteoartritis, diabetes y también cáncer (Venereo, 2002; Soneja et al., 2005; Bickers and Athar, 2006; Mesa et al., 2010; Maldonado et al. 2010; Rojano et al. 2012).

A nivel de la piel existen variados factores que pueden estimular la producción de ERO entre los que

pueden encontrarse la exposición a sustancias químicas, radiación ionizante y luz U.V. Las ERO puede inducir la desnaturalización de proteínas, alterar procesos de apoptosis e influenciar la liberación de mediadores proinflamatorios, como las citoquinas, que participan en inflamación y en el proceso de cierre de heridas. Igualmente, modulan la actividad catalítica de las metaloproteasas encargadas de degradar macromoléculas de la matriz extra celular. El estrés oxidativo en la piel puede llevar a patologías como reacciones alérgicas, vitíligo, neoplasia cutánea y dificultad en la reparación del tejido como es el caso de las úlceras varicosas (*Nelson and Melendez, 2004; Bickers and Athar, 2006; Maldonado et al. 2010*).

## 1.7. Propóleos y el tratamiento de heridas

La palabra propóleos se deriva del griego *pro* (en defensa de) y *polis* (ciudad); se utiliza para denominar a una sustancia elaborada por la abeja obrera de la especie *Apis mellifera* para recubrir y suavizar las paredes de la colmena, tapar criaturas muertas evitando así su descomposición y en la entrada de la colmena para protegerla del ingreso de intrusos (*Ramos and Miranda, 2007; Wilson et al., 2015*). El propóleos es una sustancia resinosa fuertemente adhesiva cuyo color cambia con respecto a la época del año, que resulta de la masticación que las abejas hacen de las resinas recolectadas de las grietas de la corteza y brotes de las hojas. Después de la adición de enzimas salivares que se produce durante la masticación, las abejas le adicionan cera para darle su composición final, usualmente no contiene polen o si lo tiene es en poca cantidad (*Burdock, 1998; Ramos and Miranda, 2007; Wilson et al., 2015*). Generalmente, el propóleos está constituido por resinas (50%), ceras (30%), aceites esenciales aromáticos (10%), polen (5%) y otras sustancias (5%) (*Burdock, 1998; Ramos and Miranda, 2007*). Su apariencia es la de una resina de consistencia dura de color variable (**Figura1-2**).



**Figura 1-2.** Aspecto del propóleos. Tomado de <https://apibio.ro/despre-albine/2015-07-10-18-56-28/propolisul>.

---

La composición química de los propóleos varía con respecto a la flora de la región de recolección de las resinas e incluso de la época del año; no obstante, se han reportado más de 300 constituyentes entre los que se encuentran alcoholes, aldehídos, aminoácidos, ácidos alifáticos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, flavonoides, ácidos grasos, ácidos cumáricos prenilados, ácidos cafeoilquínicos, lignanos, ácidos diterpénicos, triterpenos, esteroides, azúcares y sustancias inorgánicas (Marcucci, 1995; Ramos and Miranda, 2007; Kalogeropoulos et al., 2009. Wilson et al., 2015). El propóleos se ha utilizado desde la antigüedad por exhibir actividad antibacteriana (Marcucci, 1995; Koru et al., 2007. Wilson et al., 2015), antiviral, antifúngica, citotóxica, antiprotozoaria, antioxidante (Ramos and Miranda, 2007; Moreira et al., 2008; Kalogeropoulos et al., 2009; Rodríguez et al., 2012; Angel, 2012), antiinflamatoria (Cardile et al., 2003; Barroso et al., 2012; Funakoshi et al., 2015), inmunomoduladora y anticancerígena (Ramos and Miranda, 2007; Chan et al., 2012; Pardo et al., 2015). Por sus propiedades antibacterianas, antiinflamatorias, cicatrizantes y antioxidantes, posiblemente atribuidas a la presencia de compuestos fenólicos como los flavonoides, ácidos fenólicos y también terpenos, ha sido empleada en el tratamiento de heridas (Gregory et al., 2002; Ramos and Miranda, 2007; Pillai et al., 2010; Barroso et al., 2012; Rodríguez et al., 2012).

A pesar del creciente uso de esta sustancia por sus propiedades farmacológicas, los entes reguladores colombianos no han establecido una legislación que permita establecer sus atributos de calidad y uso terapéutico. Sin embargo, múltiples son los esfuerzos realizados desde la academia, con el objetivo de tratar de determinar la composición de los propóleos en varias zonas de Colombia y su actividad farmacológica. (Moreno et al., 2009; Palomino et al., 2009; Palomino, 2009; Martínez 2009; Palomino, 2010; Angel, 2012; Talero et al., 2012); no obstante, en otros países latinoamericanos tales como Brasil (Ministerio de Agricultura de Brasil APACAME, 1999), Argentina (Norma IRAM-INTA del Instituto Argentino de Normalización; 2004) y Cuba (norma Ramal del Ministerio de Agricultura; 1994) ya se han hecho adelantos al respecto.

En Colombia el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) acepta el propóleos con fines terapéuticos, indicando su uso como expectorante y coadyuvante en el tratamiento de trastornos respiratorios leves; razón por la cual, se comercializa a nivel de tiendas naturistas y droguerías en forma de jarabes y jaleas, donde generalmente se encuentra en combinación con extractos de otras plantas con actividad farmacológica similar tales como Eucalipto (*Eucalyptus globulus* L.), Saúco (*Sambucus nigra* L.) y Totumo (*Crescentia cujete* L.)(INVIMA) **(Figura1-3)**.



**Figura 1-3.** Algunos productos con propóleos en Colombia. Tomado de: <https://www.jgb.com.co/marcas-jgb/productos-naturales/propoleo/>

<https://latiendanaturista.files.wordpress.com/2014/11/mielertertos.jpg>

[http://www.tiendanaturistacolombiana.com/shopping/product\\_info.php?manufacturers\\_id=14&products\\_id=100](http://www.tiendanaturistacolombiana.com/shopping/product_info.php?manufacturers_id=14&products_id=100)

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

Asociar un extracto de propóleos a soportes de Colágeno tipo I y evaluar fisicoquímicamente su liberación.

### **2.2. Objetivos específicos**

- 2.2.1. Obtener un extracto acuoso de propóleos.
- 2.2.2. Evaluar el contenido de fenoles, flavonoides totales y la actividad antioxidante del extracto de propóleos obtenido.
- 2.2.3. Evaluar la citotoxicidad del extracto de propóleos.
- 2.2.4. Asociar el soporte de colágeno tipo I con el extracto acuoso de propóleos.
- 2.2.5. Evaluar la liberación del extracto acuoso de propóleos asociado a los soportes de colágeno tipo I.

## **3. Métodos**

### **3.1. Propóleos**

El propóleos como materia prima no se consigue a nivel comercial; en el mercado solo se encuentra en los productos que lo contienen en determinadas proporciones. Por esta razón, la muestra de propóleos utilizada en éste trabajo se obtuvo de la Concentración Agropecuaria Jorge Villamil Ortega del Municipio de Gigante, Huila (aproximadamente 200g colectados por la técnica de raspado). La información detallada de esta región del país se encuentra en el Anexo 1.

### **3.2. Establecimiento de un método para obtener el extracto acuoso de propóleos**

Se pesaron 50 g de propóleos y se incorporaron a 250 mL de agua desionizada. Con la finalidad de optimizar la liberación de la fracción soluble de la muestra, se disminuyó el tamaño de partícula del propóleos por medio de una licuadora en modalidad de pulsos con el fin de evitar el aumento de la temperatura. La suspensión obtenida se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente, se dejó reposar durante dos horas y se filtró empleando una membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ . El filtrado de color ámbar oscuro se almacenó en un frasco de vidrio recubierto con papel aluminio y se refrigeró a 4 °C.

### **3.3. Cultivo líneas celulares (L929 y 3T3)**

Para los ensayos de citotoxicidad se utilizó la línea celular de fibroblastos L929 (National Collection of Type Cultures (NCTC) clone 929, American Type Culture Collection (ATCC) número: CCL-1<sup>TM</sup>). Los ensayos de proliferación fueron hechos con la línea celular de fibroblastos 3T3 (NCTC clone 3T3, ATCC número CRL-1658<sup>TM</sup>). Ambos tipos de fibroblastos fueron cultivados en medio

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco®) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10%, (Gibco®), penicilina (100UI/mL), estreptomina (100µg/mL)(Gibco®), anfotericina B (0,5µg/mL) (Gibco®), vitaminas 1X (Gibco®) y piruvato de sodio 1X (Gibco®), en aire 95% y CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C, con cambio de medio cada tercer día.

### 3.4. Ensayos de citotoxicidad de los extractos

La evaluación de la citotoxicidad del extracto acuoso de propóleos, se realizó de acuerdo con la norma ISO 10993-5: Evaluación biológica de dispositivos médicos, parte 5: pruebas de citotoxicidad *in vitro*. Los ensayos fueron hechos tres veces, cada uno por triplicado, de la siguiente manera:

**Día 1.** Se suspendieron  $1 \times 10^5$  células/mL en medio de cultivo; se colocaron 100µL de esta suspensión celular en cada pozo de una placa de cultivo de 96 pozos y se incubó por 24 horas (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C, humedad > 90%). Cada pozo se observó bajo un microscopio de luz invertida para comprobar la adhesión de las células a la superficie de la placa.

**Día 2.** Cumplidas 24 horas de incubación, el medio de cultivo se removió de los pozos reemplazándose con diferentes concentraciones del extracto acuoso (0%, 5%, 10%, 15%, 20% y 25%), un control negativo (silicona 0,2g/mL), un control positivo (dimetil sulfóxido (DMSO) 25%) y un blanco (DMEM). Las células fueron incubadas por 24 horas (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C, humedad > 90%).

**Día 3.** El sobrenadante de cada pozo fue retirado y la viabilidad celular determinada mediante la reducción de 50µL/pozo de solución MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol). Después de 2 horas de incubación (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C, humedad > 90%), el formazán precipitado se solubilizó con 100µL de DMSO y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 570nm. Se utilizó la siguiente ecuación para determinar el porcentaje de viabilidad (1):

$$\text{Viabilidad \%} = \frac{100 \times \text{DO (A)}}{\text{DO (B)}} \quad (1)$$

Donde:

DO (A): Es la densidad óptica <sub>570nm</sub> de las muestras.

DO (B): Es la densidad óptica <sub>570nm</sub> del blanco (DMEM).

### **3.5. Asociación del extracto a los soportes de colágeno**

Se elaboraron soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno (5mg/mL) siguiendo la metodología desarrollada y estandarizada por el grupo (*Jiménez, 2013; Jiménez et al., 2015*). Porciones de 1 cm<sup>2</sup> de los soportes se colocaron en cajas de cultivo de 24 pozos (Costar<sup>®</sup>) y se sumergieron en 500 µL del extracto durante 2 horas a 37 °C; transcurrida la impregnación, los soportes se congelaron y liofilizaron por 24 horas.

Para evaluar la proliferación celular se cortaron fragmentos circulares de 8 mm de diámetro de los soportes, los cuales fueron colocados en cajas de cultivo de 48 pozos (Costar<sup>®</sup>) y sumergidos en 300 µL de extracto (2 horas a 37°C). Posteriormente, el exceso de extracto fue eliminado por evaporación en la cabina de flujo laminar.

### **3.6. Evaluación *in vitro* de la liberación de metabolitos del extracto de propóleos asociados a los soportes de colágeno**

Se colocaron soportes asociados con el extracto acuoso de propóleos en pozos separados (Placas de 24 pozos / placa, Costar<sup>®</sup>) que contenían 1 mL de solución Buffer de Acetatos (0,02 M; pH 5,2). Las muestras fueron incubadas a 37 °C con agitación constante (80 rpm), se tomaron alícuotas de cada uno de los sobrenadantes a diferentes tiempos (6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas) y los metabolitos liberados a los medios determinados. Cada análisis se realizó por triplicado.

#### **3.6.1. Determinación de fenoles totales**

La cuantificación de fenoles totales se realizó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (*Singleton and Rossi, 1965*); en este ensayo se mide la reducción de este reactivo ocasionada por los compuestos fenólicos del extracto, evidenciada por la formación de un complejo azul cuya absorbancia es medida a 730nm. Para la cuantificación, se construyó una curva de calibración utilizando como estándar ácido gálico en un intervalo de concentraciones entre 5 y 250 µg/mL. En el ensayo 50µL de muestra fueron mezclados con 150µL de agua supra- pura, 100µL del reactivo Folin-Ciocalteu y 200µL de carbonato de sodio (NaCO<sub>3</sub>) al 20%, dejándose incubar la mezcla durante 30 minutos antes de realizar la lectura.

### 3.6.2. Determinación de compuestos flavonoides

La cantidad total de flavonoides se determinó por la metodología colorimétrica con tricloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) (Kumazawa *et al.*, 2004), haciendo algunas modificaciones. En el ensayo 50  $\mu\text{L}$  de muestra fueron mezclados con 350  $\mu\text{L}$  de solución de etanol 50% y 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  5% dejándose incubar la mezcla durante 60 minutos antes de realizar la lectura a 420 nm. Para la elaboración de la curva de calibración se utilizó quercetina como patrón en un intervalo de concentraciones entre 5 y 500  $\mu\text{g/mL}$ .

### 3.6.3. Método FRAP

Se usó metodología descrita (Benzie & Strain, 1996), con algunas modificaciones, para evaluar la reducción del átomo de hierro (III) presente en la molécula 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) a hierro (II) evidenciada por la generación de una coloración morada, que es cuantificada coloriméricamente a 590 nm. En el ensayo, 50  $\mu\text{L}$  de extracto se mezclaron con 50  $\mu\text{L}$  de buffer acetato 0,3  $\mu\text{M}$  pH 3,6 y 900  $\mu\text{L}$  del reactivo FRAP (2,5 mL de solución TPTZ 10  $\mu\text{M}$  en HCl 40 mM; 2,5 mL de  $\text{FeCl}_3$  20  $\mu\text{M}$  y 25 mL de buffer acetato 0,3  $\mu\text{M}$  pH 3,6). La lectura de las muestras se llevó a cabo después de 30 minutos de incubación. La curva de calibración se construyó utilizando como patrón ácido ascórbico.

### 3.6.4. Método ORAC

En este ensayo se evaluó la capacidad del extracto para evitar la degradación de la Fluoresceína del daño oxidativo generado por radicales peroxilo, estos últimos formados por la descomposición térmica del 2, 2"-azobis (2-aminopropano diclorhidrato) (AAPH). El radical  $\text{ROO}^\cdot$ , en presencia del antioxidante, capta un átomo de hidrógeno manteniendo intacta la molécula de fluoresceína. En este ensayo se utilizaron condiciones controladas de temperatura y pH (37°C; 7,4); así como, fluoresceína (0,01M) en solución buffer de fosfatos (PBS)(75 mM) y AAPH 0,6 M en PBS (75mM). La solución de trabajo fue elaborada con 2929  $\mu\text{L}$  de la solución de fluoresceína, 50  $\mu\text{L}$  de AAPH y 30  $\mu\text{L}$  de extracto. El efecto antioxidante se determinó usando las diferencias de áreas bajo la curva de decaimiento de la fluoresceína entre el blanco y la muestra: Los valores obtenidos fueron expresados en micromoles ( $\mu\text{M}$ ) equivalentes de Trolox/litro de extracto con respecto a la ecuación (2):

$$ORAC = \frac{AUC - AUC^{\circ}}{AUC_{Trolox} - AUC^{\circ}} F[Trolox] \quad (2)$$

Donde  $AUC$  es el área bajo la curva de la muestra,  $AUC^{\circ}$  el área bajo la curva para el control,  $AUC_{Trolox}$  el área bajo la curva para el trolox y  $F$  el factor de dilución de los extractos (Romero *et al.*, 2010).

### 3.7. Elaboración de soportes de pululano-dextrano

La elaboración de los soportes de pululano-dextrano, se realizó siguiendo el procedimiento utilizado por el Laboratorio de Biomateriales y Bioingeniería de la Universidad Laval de Quebec, Canadá (Purnama *et al.* 2015) con algunas modificaciones. Se pesaron 9 g de pululano (Hayashibara), 3 g de dextrano (Sygma) y 14 g de cloruro de sodio (NaCl); posteriormente se incorporó 40 mL de agua para formar una suspensión homogénea a la cual se le adicionó hidróxido de sodio (NaOH) 1M para llevar a medio básico y el agente intercalante trimetafosfato sódico (Sigma). Toda la mezcla se vertió en un molde y se llevó a incubación durante 20 min a 50 °C; el producto obtenido se lavó con PBS pH 7,4 durante 12 horas con agitación constante y luego con agua desionizada durante 24 horas; El soporte purificado se llevó a congelación (-20 °C) y se liofilizó por 48 horas; finalmente el soporte obtenido se cortó en porciones de 1 cm<sup>2</sup>.

### 3.8. Asociación del extracto a los soportes de pululano-dextrano

Teniendo en cuenta la concentración óptima en la que el extracto de propóleos se podía utilizar, porciones de 1 cm<sup>2</sup> de los soportes de pululano-dextrano se colocaron en cajas de cultivo de 24 pozos (Costar<sup>®</sup>) y se sumergieron en 500 µL del extracto durante 2 horas a 37 °C. Al finalizar la incubación los soportes impregnados se congelaron y liofilizaron por 24 horas.

### 3.9. Evaluación *in vitro* de la liberación de metabolitos del extracto de propóleos asociados a los soportes de pululano-dextrano

El ensayo de liberación del extracto en los soportes de pululano-dextrano se realizó en concordancia con el ensayo de liberación en soportes de colágeno (apartado 3.6.1 del presente capítulo); a las

muestras obtenidas se les determinó la cantidad de fenoles totales y compuestos flavonoides (apartado 3.6.2. y 3.6.3. del presente capítulo).

### **3.10. Ensayo de proliferación en soportes de colágeno previamente asociados con extracto de propóleos**

Para evaluar la proliferación de fibroblastos de la línea celular 3T3, se colocaron soportes de colágeno asociados con el extracto de propóleos en pozos separados de tres cajas de cultivo de 48 pozos (Costar®). En cada uno de ellos se sembraron 500 µL de una suspensión celular ( $15 \times 10^3$  células / mL en medio de cultivo) y se incubó (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C y humedad > 90%). En cada una de las cajas se incluyeron controles positivos (Fibroblastos 3T3 creciendo directamente en la superficie del pozo) y negativos (medio de cultivo). Para el análisis se tomó una caja de cultivo en los días 1, 3 y 7, se retiró el medio de cultivo de los pozos, se adicionó en su lugar una solución de resazurina 10% en medio de cultivo y se incubó (3 horas, 37 °C). Al final de ese lapso se tomaron 200 µL por pozo y cada una de las muestras se colocó en pozos separados de cajas de cultivo de 96 pozos (Costar®), con el fin de medir la fluorescencia de la rezofurina, metabolito de la resazurina, con una longitud de onda de excitación de 544 nm y de emisión de 590 nm. Estos análisis fueron hechos tres veces cada uno por triplicado.

### **3.11. Ensayo de microscopia de fluorescencia**

Los soportes utilizados para el ensayo de proliferación se utilizaron para tomar micrografías de fluorescencia, las cuales sirvieron para evidenciar la adhesión y proliferación de la línea celular 3T3 a los soportes de colágeno. Para esto, se lavaron cuidadosamente con PBS hasta la completa eliminación de toda la coloración proveniente de la resazurina, se taparon con 500 µL de formaldehído en PBS y se incubaron por 20 min. Después de la incubación se retiró el formaldehído, se lavó suavemente con PBS y en cada pozo se adicionaron 500 µL de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) 3% y saponina 0,1% en PBS durante 10 min con el objeto de permeabilizar las células. La mezcla de BSA-saponina fue reemplazada por una solución de Dapi (4',6-diamino-2-fenilindol) (1:3000) y rodamina-faloidina (1:300) en PBS con BSA 3% y saponina 0,1% incubándose a 37 °C durante una hora; Transcurrido este tiempo las muestras se lavaron con solución 0,05% de Tween 20 en PBS. Los soportes así tratados fueron colocados en láminas portaobjetos, se agregó Fluoromoun G y se colocó una lámina cubreobjetos y se llevaron al microscopio de fluorescencia.

### **3.12. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos en de los ensayos de liberación de los metabolitos del extracto de propóleos en los soportes de colágeno y pululano-dextrano y los resultados del ensayo de proliferación celular se realizó mediante un análisis de varianza (Anova) con un nivel de confianza de  $p < 0,05$ .

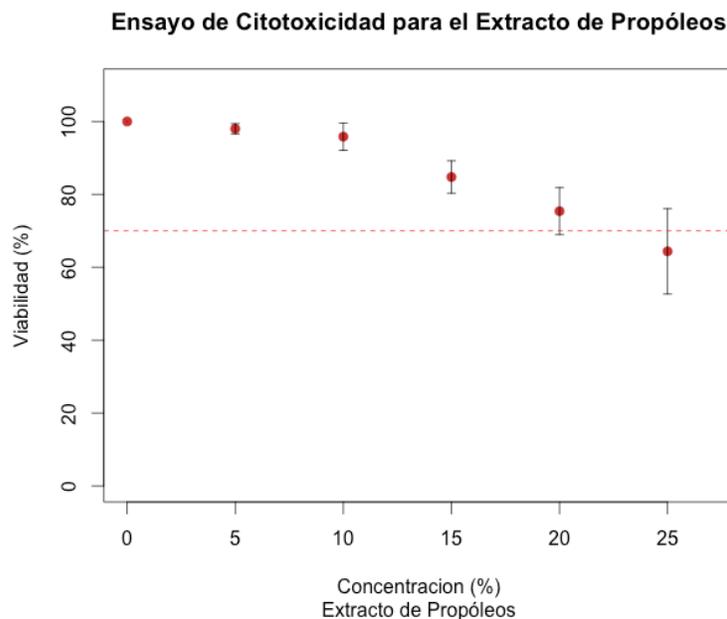
## **4. Resultados**

### **4.1. Estandarización de un método para la obtención de un extracto acuoso de propóleos**

Para la obtención del extracto acuoso de propóleos se siguió el procedimiento descrito en el capítulo de métodos (3.2.). Sin embargo, con respecto a las metodologías descritas para extractos alcohólicos (Kumazawa, 2004; Moreira, 2008; Palomino, 2009; Angel, 2012) éste trabajo introdujo dos modificaciones importantes: i) La reducción del tamaño de partícula de la muestra de propóleos para mejorar su solubilidad mediante el licuado de la muestra en una licuadora operada con pulsos para evitar el calentamiento de la muestra; ii) La sedimentación de la suspensión previo al proceso de filtración con el fin de evitar la rápida saturación del filtro. Como resultado del proceso de extracción modificado se obtuvo un extracto color ámbar translúcido, pH = 4,34, soluble en los medios de cultivo y reactivos utilizados en la presente tesis.

### **4.2. Citotoxicidad inducida por los extractos de propóleos**

En la **Figura 4-1** se evidencia que el aumento de la concentración de propóleos está relacionado con la disminución de la viabilidad celular. La norma ISO 10993-5 establece que valores inferiores al 70% de viabilidad celular son un parámetro indicativo de citotoxicidad. El ensayo demostró que la concentración máxima a la cual el extracto de propóleos puede utilizarse *in vitro* sin producir citotoxicidad menor del 70%, es 20% v/v. Por lo cual, ésta fue la concentración del extracto empleada para impregnar los soportes de colágeno I con micropartículas de gelatina-colágeno.



**Figura 4-1. Porcentaje de Viabilidad Celular de fibroblastos L929 expuestos a diferentes concentraciones del extracto de propóleos.** Se muestran porcentajes de viabilidad de fibroblastos L929 incubados con diferentes concentraciones de extracto de propóleos (0%, 5%, 10%, 15%, 20% y 25% v/v). (----): límite de citotoxicidad (70% de Viabilidad) según la norma ISO 10993-5.  $n = 3$ . Las barras de error representan la desviación estándar de las medidas.

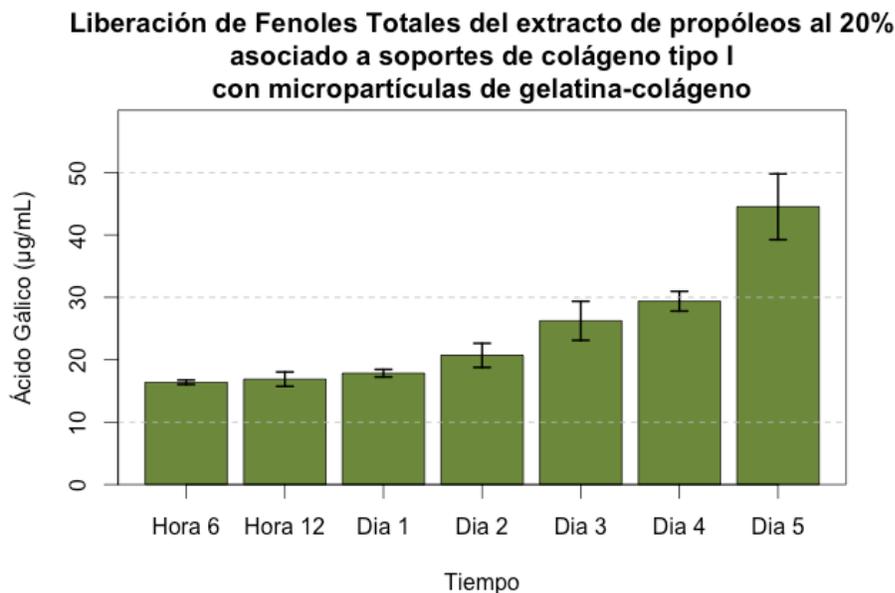
### 4.3. Evaluación *in vitro* de la liberación de metabolitos del extracto de propóleos asociados a los soportes de colágeno

#### 4.3.1. Determinación de fenoles totales

Inicialmente, se utilizó la ecuación obtenida a partir de la curva de calibración para establecer la concentración de fenoles totales en el extracto de propóleos no diluido; encontrándose, que en una solución de 50g/250mL de agua esta era de  $449,83 \pm 10,55 \mu\text{gAG/mL}$  que equivale a  $2,249 \pm 0,034$  miligramos equivalentes de Ácido Gálico por gramo de propóleos ( $\text{mgAG/g}_{\text{prop}}$ ).

En la **Figura 4-2** se observa el patrón de liberación de compuestos fenólicos a partir del extracto de propóleos al 20% v/v asociado a los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno. Como se puede ver, la concentración de ácido gálico en la que se expresa la actividad antioxidante de estos compuestos no se relaciona linealmente con el tiempo, sino que semeja la fase lag de una curva de crecimiento de un cultivo bacteriano, en la que se aprecia un aumento a partir

del segundo día y la cual sugiere una relación exponencial entre estas dos variables.

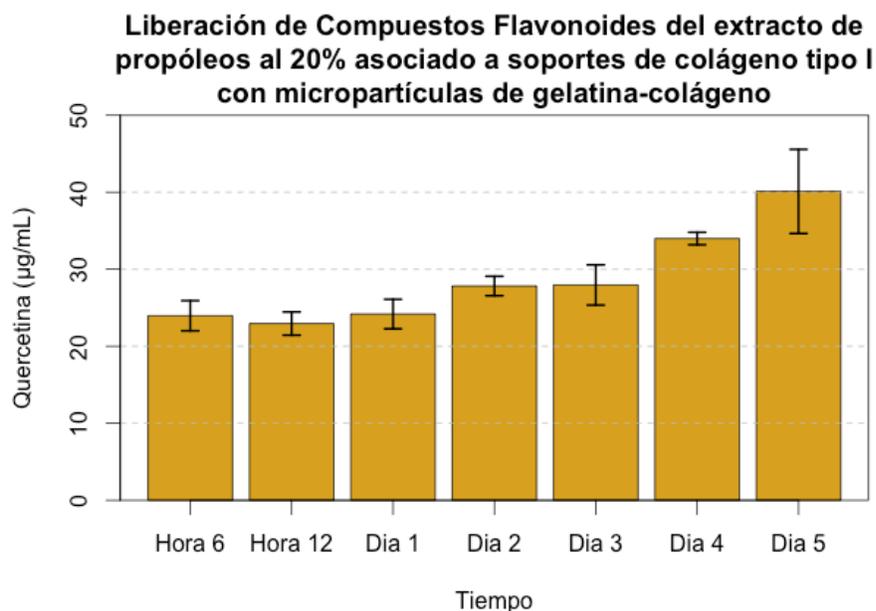


**Figura 4-2. Liberación de Fenoles Totales del extracto de propóleos al 20% v/v asociado a soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno.** Concentración de compuestos fenólicos del extracto de propóleos al 20% v/v liberados por los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno en función del tiempo. Los resultados se expresan como microgramos equivalentes de ácido gálico por mL de solución ( $\mu\text{gAG/mL}$ ).  $n = 3$ . Las barras de error representan la desviación estándar de las medidas.

#### 4.3.2. Determinación de compuestos flavonoides

Igual que la determinación de fenoles totales, empleando la ecuación de la gráfica descrita por la curva de calibración se encontró que la concentración de compuestos flavonoides en el extracto de propóleos no diluido (50g/200mL) es de  $76,362 \pm 4,686 \mu\text{gQ/mL}$  que equivale a  $0,382 \pm 0,023$  miligramos equivalentes de Quercetina por gramo de propóleos ( $\text{mgQ/g}_{\text{prop}}$ ).

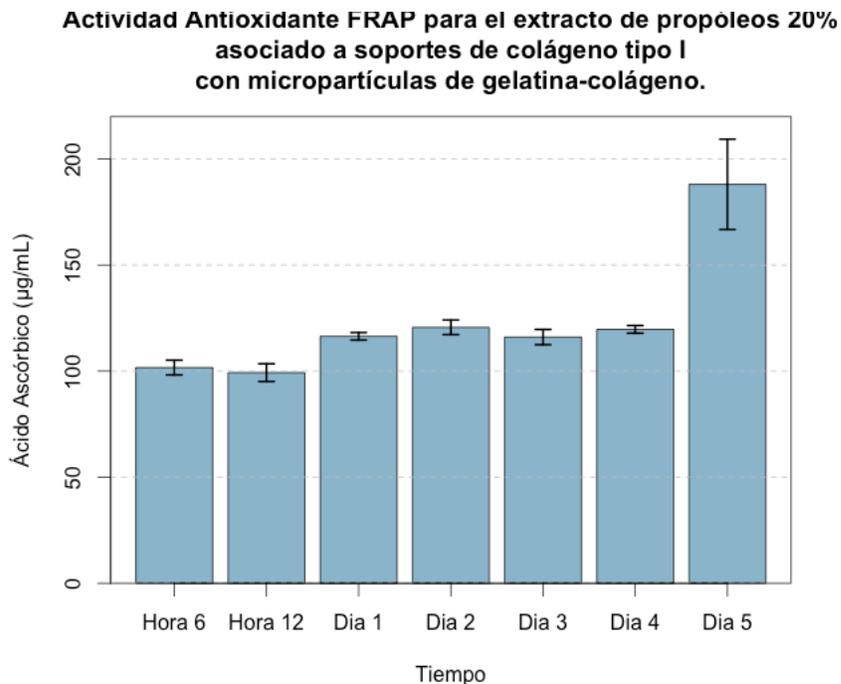
La **Figura 4-3** permite apreciar que se asociaron compuestos flavonoides a los soportes y que éstos empiezan a ser liberados al medio a partir del segundo día, con un patrón de liberación similar al mostrado por los fenoles totales.



**Figura 4-3. Liberación de Compuestos Flavonoides del extracto de propóleos al 20% v/v asociado a soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno.** Concentración de compuestos flavonoides del extracto de propóleos al 20% v/v liberados por los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno en función del tiempo. Los resultados se expresan como microgramos equivalentes de quercetina por mL de solución ( $\mu\text{gQ/mL}$ ).  $n = 3$ . Las barras de error representan la desviación estándar de las medidas.

### 4.3.3. Evaluación de la actividad antioxidante del extracto de propóleos mediante el método FRAP

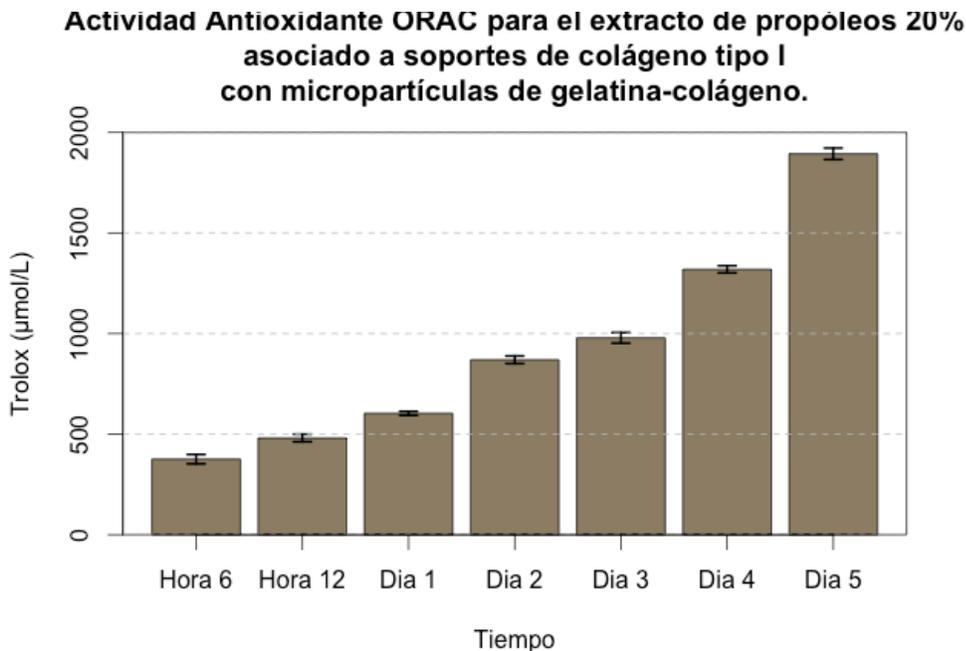
La **Figura 4-4** muestra el resultado obtenido en la evaluación de la actividad antioxidante a través de la metodología FRAP. Se puede ver que el extracto de propóleos al 20% v/v contiene sustancias capaces de reducir el ion  $\text{Fe}^{+3}$  que pueden ser detectadas en el medio desde las 6 horas, momento en que se hizo la primera medición. La concentración de éstas sustancias se mantiene igual durante las primeras 12 h, aumenta en el primer día y se mantiene sin variar significativamente durante cuatro días para llegar a su máximo valor en el quinto día del ensayo.



**Figura 4-4. Actividad antioxidante evaluada por la metodología FRAP para el extracto de propóleos 20% v/v asociado a soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno.** Actividad antioxidante de los metabolitos del extracto de propóleos al 20% v/v liberados por los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno en función del tiempo. Los resultados se expresan como  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido ascórbico (AAE) por mL de solución. ( $\mu\text{gAA/mL}$ ).  $n = 3$ . Las barras de error representan la desviación estándar de las medidas.

#### **4.3.4. Evaluación de la actividad antioxidante del extracto de propóleos mediante el método ORAC**

El extracto de propóleos al 20% v/v confirmó poseer actividad antioxidante en la medida en que demostró la capacidad de atrapar radicales del tipo  $\text{RRO}\cdot$  los cuales fueron evaluados a través de la metodología ORAC tal como lo presenta la **Figura 4-5**. Se observa un aumento exponencial de la concentración de Trolox con el tiempo, que llega a ser máxima en el día 5 del ensayo.

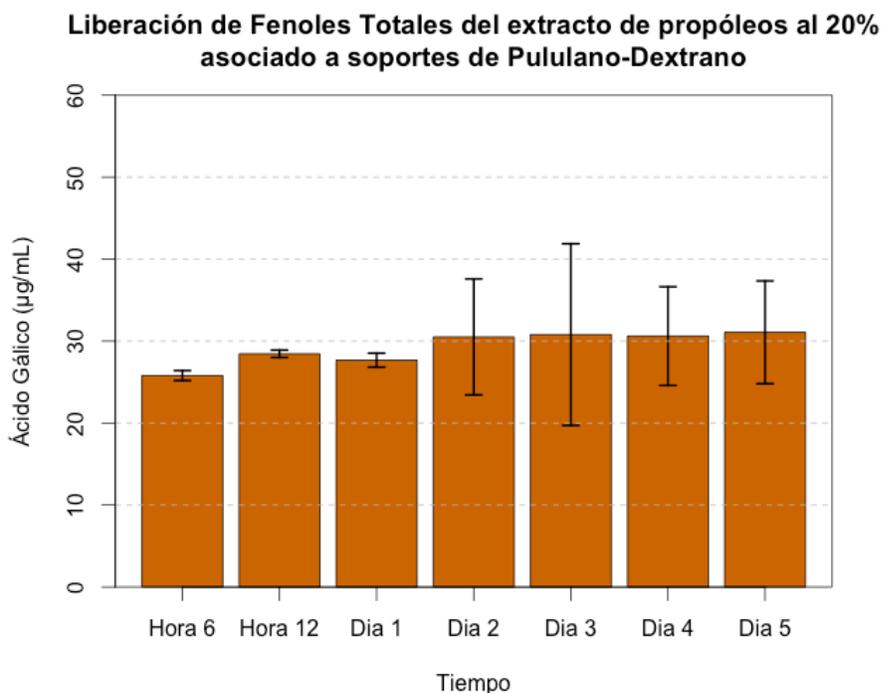


**Figura 4-5. Actividad antioxidante determinada por la metodología ORAC para el extracto de propóleos 20% v/v asociado a soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno.** Actividad antioxidante de los metabolitos del extracto de propóleos al 20% v/v liberados por los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno en función del tiempo. Los resultados se expresan como µg equivalentes de Trolox por L de solución (µgTrolox/L).  $n = 3$ . Las barras de error representan la desviación estándar de las medidas.

## 4.4. Ensayos de liberación de los metabolitos del extracto de propóleos asociados a los soportes de pululano-dextrano

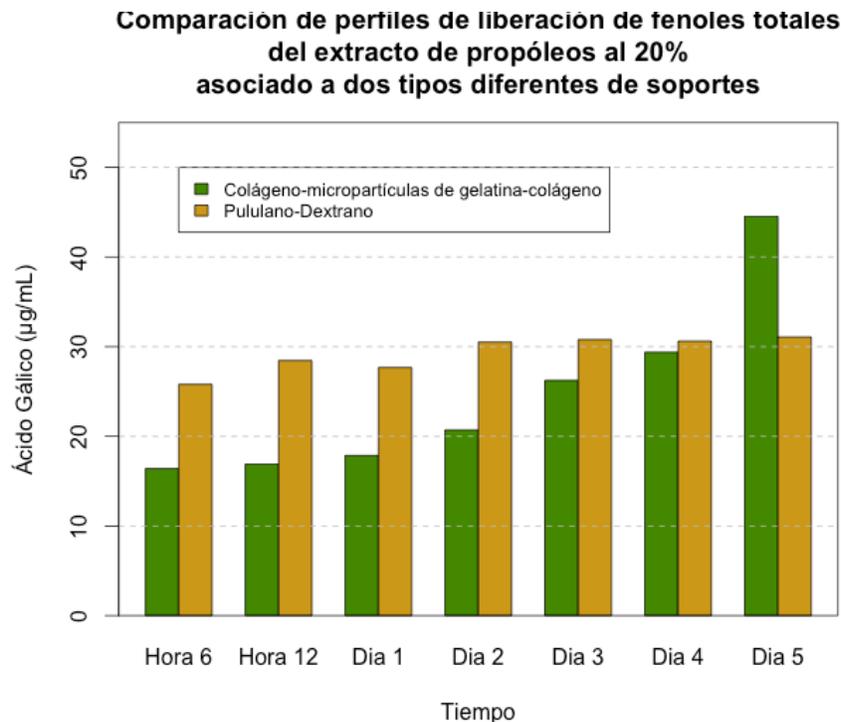
### 4.4.1. Determinación de fenoles totales

En la **Figura 4-6** se aprecia como los compuestos fenólicos del extracto al 20% v/v de propóleos son liberados por los soportes de pululano-dextrano. Se evidencia, que no existe una liberación progresiva de estas sustancias, por el contrario, la concentración de compuestos fenólicos es estadísticamente similar en todas las muestras tomadas en el estudio, fluctuando en valores que van desde  $25,794 \pm 0,602 \mu\text{gAG/mL}$  en la hora 6, hasta  $31,078 \pm 6,269 \mu\text{gAG/mL}$  reportado en el día 5.



**Figura 4-6. Liberación de Fenoles Totales del extracto de propóleos al 20% v/v asociado a soportes de pululano-dextrano.** Concentración de compuestos fenólicos del extracto de propóleos al 20% v/v liberados por los soportes de pululano-dextrano en función del tiempo. Los resultados se expresan como microgramos equivalentes de ácido gálico por mL de solución ( $\mu\text{gAG/mL}$ ).  $n = 3$ . Las barras de error representan la desviación estándar de las medidas.

Con el fin de contrastar el tipo de liberación exhibido por los extractos asociados a los soportes de colágeno I con micropartículas de gelatina-colágeno y por los extractos asociados a los soportes pululano-dextrano se hizo la **Figura 4-7**. Se puede apreciar que existen diferencias entre la liberación del extracto impregnado en los soportes de colágeno y el impregnado en los soportes de la mezcla pululano-dextrano. La concentración de fenoles liberados por los soportes de colágeno es inferior durante los primeros 3 días del ensayo, alcanzando niveles similares el día 4 y finalmente superando la cantidad liberada en el medio el día 5 respecto a los soportes de pululano-dextrano.

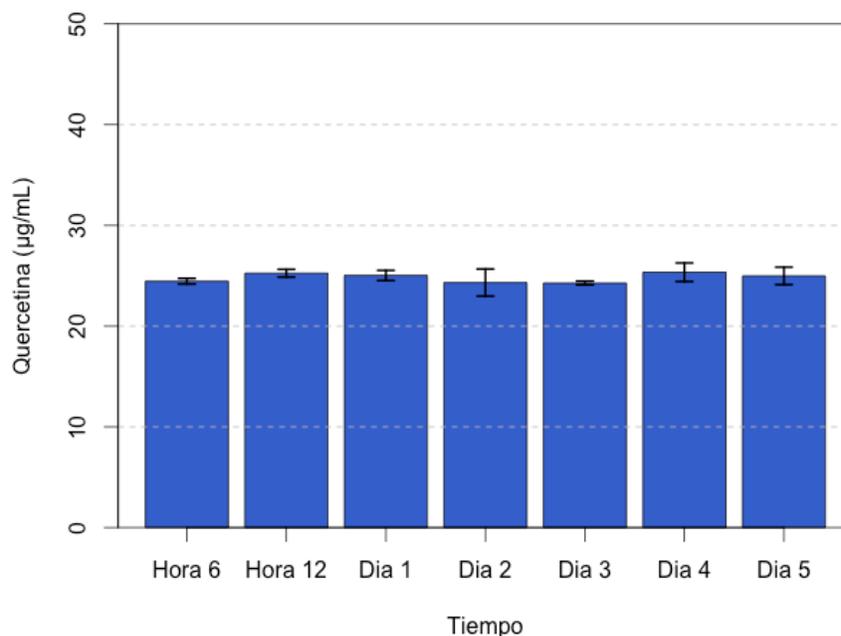


**Figura 4-7. Comparación de los perfiles de liberación de Fenoles Totales del extracto de propóleos al 20% v/v asociado con dos tipos diferentes de soportes.** Concentración de compuestos fenólicos del extracto de propóleos al 20% v/v liberados por soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno y soportes de pululano-dextrano en función del tiempo. Los resultados se expresan como microgramos equivalentes de ácido gálico por mL de solución ( $\mu\text{gAG/mL}$ ).  $n = 3$ .

#### 4.4.2. Determinación de compuestos flavonoides

El perfil de liberación de los compuestos flavonoides del extracto de propóleos al 20% v/v impregnados en los soportes de pululano-dextrano puede apreciarse en la **Figura 4-8**. De manera similar al comportamiento mostrado por los fenoles en esta misma clase de soporte, puede observarse que la misma cantidad de estos compuestos flavonoides se liberó durante los 5 días del ensayo sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas entre ellas, reportando valores que oscilan entre  $24,455 \pm 0,227 \mu\text{gQ/mL}$  y  $24,988 \mu\text{gQ/mL}$  en la hora 6 y el día 5 respectivamente.

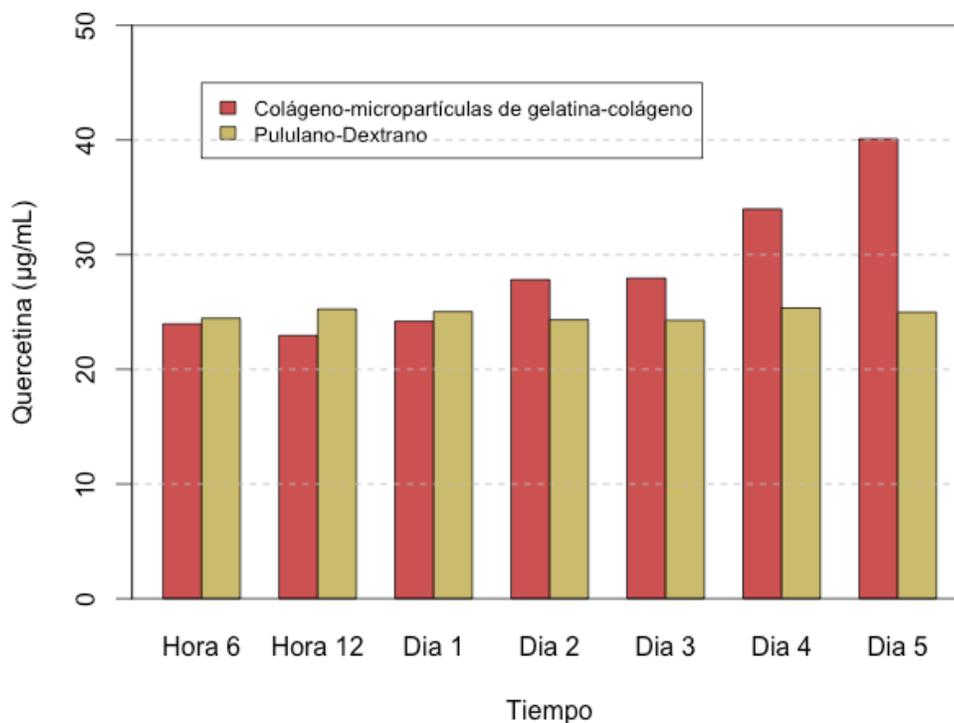
### Liberación de Compuestos Flavonoides del extracto de propóleos al asociado a soportes de pululano-dextrano



**Figura 4-8. Liberación de Compuestos Flavonoides del extracto de propóleos al 20% v/v asociado a soportes de pululano-dextrano.** Concentración de compuestos flavonoides del extracto de propóleos al 20% v/v liberados por los soportes de pululano-dextrano en función del tiempo. Los resultados se expresan como microgramos equivalentes de quercetina por mL de solución ( $\mu\text{gQ/mL}$ ).  $n = 3$ . Las barras de error representan la desviación estándar de las medidas.

En la **Figura 4-9** se representa la comparación entre los perfiles de liberación de los compuestos flavonoides del extracto de propóleos al 20% v/v, impregnado en los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno y en los soportes de pululano-dextrano. Se evidencia la forma gradual en la que estas sustancias son liberadas en el primer tipo de soporte, mientras que los niveles de flavonoides se mantienen constantes en el segundo caso; también se observa que hasta el primer día del ensayo, las concentraciones de compuestos flavonoides liberados son similares para ambos tipos de soporte, no obstante se incrementa de manera progresiva y significativamente diferente hasta el día 5 del ensayo para el soporte de colágeno.

**Comparación de los perfiles de liberación de Compuestos Flavonoides del extracto de propóleos al 20% asociado dos tipos diferentes de soportes**

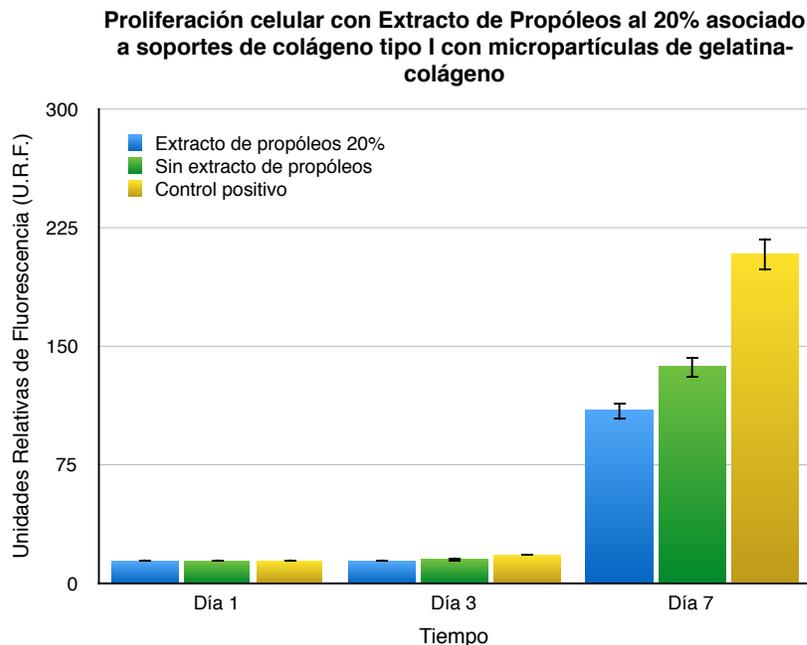


**Figura 4-9. Comparación de los perfiles de liberación de Compuestos Flavonoides del extracto de propóleos al 20% v/v asociado con dos tipos diferentes de soportes.** Concentración de compuestos flavonoides del extracto de propóleos al 20% v/v liberados por soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno y soportes de pululano-dextrano en función del tiempo. Los resultados se expresan como microgramos equivalentes de quercetina por mL de solución ( $\mu\text{gQ/mL}$ ).  $n = 3$ .

#### **4.5. Ensayo de proliferación celular en soportes de colágeno impregnados con extracto de propóleos**

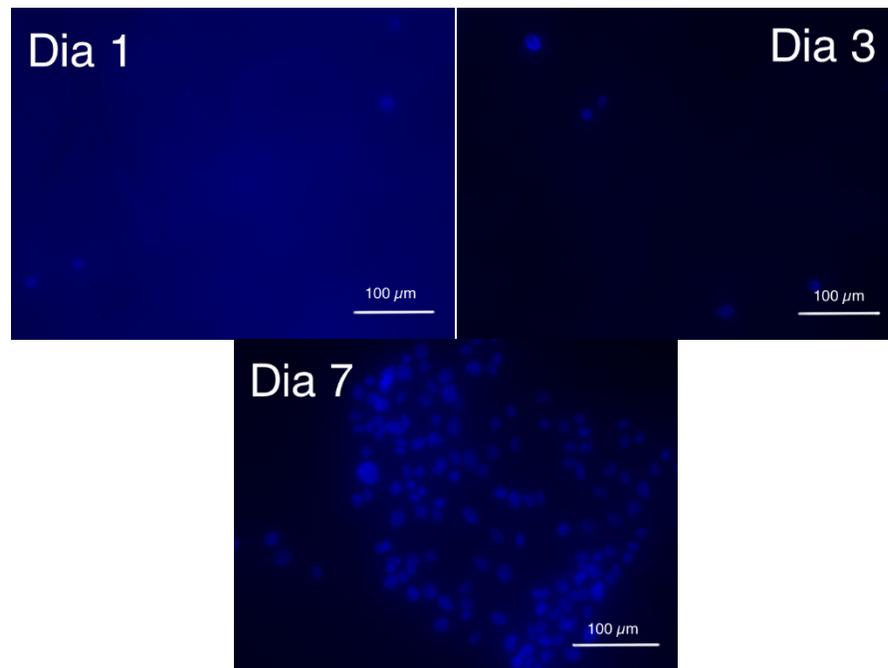
Los resultados del ensayo de proliferación de la línea celular de fibroblastos 3T3 en presencia de los soportes de colágeno I con micropartículas de gelatina-colágeno impregnados con extracto de propóleos al 20% v/v, incluidos los datos proporcionados por los controles, se muestran en la **Figura 4-10**. Se puede apreciar que durante los días 1 y 3 del ensayo la población celular fue similar en cada uno de los tratamientos y se mantuvo baja. En el día 7 del ensayo, el soporte impregnado con extracto de propóleos al 20% v/v mostró U.R.F menores que las obtenidas con soportes de colágeno I con micropartículas de gelatina-colágeno sin impregnar y con cultivos de fibroblastos adheridos a

la superficie del plato de cultivo (Control positivo).



**Figura 4-10. Proliferación celular con extracto de propóleos al 20% v/v asociado a soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina colágeno.** Ensayo de proliferación celular con la línea de fibroblastos 3T3 utilizando extractos de propóleos al 20% v/v asociado a soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno en función del tiempo; el control positivo consiste en muestras de línea celular creciendo en la caja de cultivo y que no están en contacto con los soportes. Los resultados se expresan como Unidades Relativas de Fluorescencia (U.R.F.).  $n = 3$ . Las barras de error representan la desviación estándar de las medidas.

El ensayo de microscopía de fluorescencia corroboró los resultados anteriormente expuestos; en el día 3 se observan pocas células adheridas a los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de colágeno-gelatina, haciéndose evidente su presencia en todo el soporte en el día 7 del ensayo (**Figura 4-11**).



**Figura 4-11. Microscopía de fluorescencia para el ensayo de proliferación celular con extracto de propóleos al 20% v/v asociado a soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno. Se observan los cromosomas marcados por el fluorocromo DAPI de la línea celular de fibroblastos 3T3 en la superficie de los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno.**

## 5. Discusión

Los soportes de colágeno tipo I que contienen micropartículas de gelatina-colágeno, fueron desarrollados por nuestro grupo de investigación con el fin de ser usados como un sistema de liberación controlada de sustancias bioactivas, que puedan aumentar la regeneración en heridas de piel donde se utilicen como sustitutos tisulares.

El propóleo se ha usado como antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatorio, inmunomodulador y anticancerígeno (Gregory *et al.*, 2002; Pillai *et al.*, 2010; Barroso *et al.*, 2012). En Colombia, el INVIMA acepta su uso en preparaciones expectorantes como coadyuvante en el tratamiento de trastornos respiratorios leves, sin embargo, no admite su empleo en el tratamiento de heridas de piel; sin embargo, por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas puede ser un buen candidato para tratar heridas crónicas de piel. Por ésta razón, ésta tesis propuso asociar un extracto acuoso de propóleo a los soportes con micropartículas de gelatina-colágeno.

Se han reportado más de 300 componentes en los propóleos entre los cuales se encuentran alcoholes, aldehídos, aminoácidos, ácidos alifáticos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, flavonoides, ácidos grasos, ácidos cumáricos prenilados, ácidos cafeoilquínicos, lignanos, ácidos diterpénicos, triterpenos, esteroides, azúcares y sustancias inorgánicas (Marcucci., 1995; Ramos and Miranda, 2007; Kalogeropoulos *et al.*, 2009. Wilson *et al.*, 2015). Estos constituyentes pueden variar notablemente según de la región de origen, debido a que su composición depende de la vegetación del sitio en que se localiza la colmena, relacionándose igualmente con los cambios estacionales (Marcucci., 1995; Burdock., 1998). También, se ha descrito que la forma de obtención del propóleo influye en el contenido del producto final debido a que durante el proceso puede producirse degradación de compuestos por oxidación (Palomino., 2009). En Colombia, se han realizado estudios sobre propóleos provenientes de varias regiones del país encontrando variaciones en su composición (Moreno *et al.*, 2007; Palomino *et al.*, 2009; Palomino, 2009; Martínez 2009; Palomino, 2010; Angel, 2012; Talero *et al.*, 2012). Para la presente tesis se utilizó una muestra

---

proveniente del municipio de Gigante en el departamento del Huila (Colombia), la cual fue tomada por la técnica de raspado durante el primer trimestre del año 2013. Debido a que en la actualidad, a nivel nacional, no existe una normatividad que permita garantizar la calidad del propóleos y para evitar la adquisición de productos fraudulentos se escogió el proveedor: “Concentración agropecuaria Jorge Villamil Ortega”, por la confianza en la calidad de sus productos. Físicamente la muestra de propóleos era sólida, de color café oscuro y carácter resinoso.

Extractos a partir de productos vegetales pueden realizarse con diferentes tipos de solventes, dependiendo de la fracción de componentes que deseen aislarse y de la potencial utilidad que puedan tener. Se decidió elaborar un extracto acuoso de propóleos debido a la estrecha relación existente entre el agua y los sistemas biológicos, y porque muchos de los componentes a los cuales se les atribuyen actividad farmacológica en los productos vegetales tales como fenoles y flavonoides, son solubles en solventes polares.

La obtención de extractos acuosos de propóleos no está reportada en la literatura de manera tan extensiva como los procedimientos que utilizan solventes alcohólicos (metanol y etanol), lo cual en parte obedece a que la mayoría de estudios se enfocan en la caracterización química y no en su uso directo en sistemas biológicos. La capacidad del agua y de compuestos orgánicos hidroxilados de extraer sustancias difiere en virtud de características fisicoquímicas (constante dieléctrica, energía cohesiva), tiempo de exposición del producto vegetal con el solvente y la temperatura y agitación utilizadas (*Hancock et al, 1997; Gurjar, 2012; Michiels, 2012; Povilaitis et al, 2015*). En el caso particular del extracto elaborado en ésta tesis, la solubilidad del propóleos en agua fue bastante reducida posiblemente debido a las sustancias no polares que contiene, como las resinas y compuestos de naturaleza lipídica. Por tal motivo y con el objetivo de ayudar a disolver los componentes polares dentro del propóleos, se redujo de manera física el tamaño de partícula. Este paso ayudó a que después de separar la suspensión resultante, se obtuviera una solución color ámbar translúcida y estéril. El pH del extracto fue de 4,34 lo cual revela el carácter ácido de los metabolitos solubilizados; adicionalmente, dicho extracto presentó una alta solubilidad en los medios de cultivo y reactivos utilizado. Estos resultados fueron importantes para garantizar la completa solubilización de los principios activos en todos los ensayos y su contacto directo con las líneas celulares analizadas.

En la presente tesis se escogieron los compuestos fenólicos y los compuestos flavonoides como metabolitos de análisis en el extracto de propóleos, debido a que a ambos grupos de sustancias se

les atribuyen propiedades medicinales (Gregory et al., 2002; Ramos and Miranda, 2007; Pillai et al., 2010; Barroso et al., 2012; Rodríguez et al., 2012). La cantidad de fenoles totales encontrado en el extracto de propóleos fue de  $449,83 \pm 10,55 \mu\text{gAG/mL}$  que equivale a  $2,249 \pm 0,034$  miligramos equivalentes de Ácido Gálico por gramo de propóleos ( $\text{mgAG/g}_{\text{prop}}$ ) y de compuestos flavonoides  $76,362 \pm 4,686 \mu\text{gQ/mL}$ , equivalente a  $0,382 \pm 0,023$  miligramos equivalentes de quercetina por gramo de propóleos ( $\text{mgQ/g}_{\text{prop}}$ ); estos valores no son comparables con resultados obtenidos por otros investigadores que han trabajado con propóleos colectados en diversas regiones del país, ni en otros países, debido a que en todos ellos los extractos obtenidos son de naturaleza alcohólica y han realizado modificaciones a las técnicas analíticas (Palomino, 2009; Rodríguez et al., 2012). Sin embargo, debe mencionarse que las concentraciones de fenoles y flavonoides obtenidas son menores que las reportadas en los extractos alcohólicos. Lo mencionado, destaca la necesidad de establecer una normatividad que permita homogenizar los ensayos analíticos y los límites de calidad para los propóleos con el fin de obtener resultados entre grupos de investigación que sean comparables y más allá de eso, garantizar un producto comercial debidamente estandarizado.

El ensayo de citotoxicidad reveló que extractos acuosos de propóleos de concentración igual o menor al 20% v/v se pueden trabajar de manera segura en la línea celular de fibroblastos L929 según la norma ISO 10993-5. No obstante es importante reconocer que al tratarse de un ensayo *in vitro*, este valor puede variar si se utilizan otros tipos de líneas celulares (Millán, 2014). Los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad, se suman a la cada vez más abundante información reportada por otros grupos de investigación que han querido abordar este tema pero enfocándose hacia extractos alcohólicos (Frezza et al., 2013; Pardo et al., 2015); por eso, son importantes. El contenido de fenoles y flavonoides obtenido en el extracto acuoso de propóleos es inferior al reportado por otros grupos de investigación (Cottica, 2015); sin embargo, se debe resaltar que los métodos de extracción fueron diferentes y como se mencionó, éstos son determinantes para la elaboración del extracto. Para poder determinar cuál metodología es más eficiente debería utilizarse la misma muestra de propóleos, debido a la alta variabilidad en composición que este producto puede tener con respecto a su región de origen, en estudios comparativos cabeza a cabeza de los métodos que se quieran comparar.

En éste trabajo se demostró que la liberación de los fenoles y compuestos flavonoides asociados al soporte de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno describe un comportamiento exponencial, el cual contrasta con el perfil de liberación de tipo logarítmico, resultados del grupo obtenidos al evaluar la liberación de extractos de flor de caléndula (*Calendula officinalis*)

---

impregnados en el mismo tipo de soportes (*Jiménez, 2012; Flórez, 2015*). Esto posiblemente indica que los procesos de difusión a través del colágeno, así como la adsorción-desorción de los metabolitos en las microesferas, no son similares. Lo cual, puede obedecer a que los fenoles y flavonoides extraídos por diferentes solventes poseen diferencias en su polaridad lo cual modificaría las interacciones electrostáticas con el soporte.

La liberación de los metabolitos del extracto de propóleos asociado a los soportes de colágeno con micropartículas de gelatina-colágeno se realizó de una manera controlada y progresiva durante los 5 días del ensayo. Aunque no se hizo un estudio con una ventana de tiempo más amplia, por el comportamiento de la pendiente positiva que puede percibirse en las gráficas obtenidas para fenoles totales y compuestos flavonoides es de suponer que dicho comportamiento se podría seguir prolongando durante más tiempo; estos resultados permiten corroborar la eficacia de los soportes desarrollados por el grupo de investigación como sistemas de liberación controlada (*Jiménez, 2012; Flórez, 2015*).

El extracto de propóleos demostró tener la capacidad de modular en cierta medida el estrés oxidativo bajo las metodologías de FRAP y ORAC, resultados que son concordantes con aquellos obtenidos con propóleos de otras regiones (*Palomino, 2009*). Los resultados obtenidos con estas dos metodologías no son comparables, porque la actividad antioxidante es detectada mediante mecanismos diferentes; mientras que en el primero se describe transferencia de electrones, en el segundo existe transferencia de protones (*Naranjo et al., 2011; Rojano et al., 2011*); sin embargo, son complementarios en virtud de que las moléculas activas detectadas ejercen un efecto antioxidante diferente (*MacDonald-Wicks et al., 2006*).

En contexto de la beca de intercambio académico del gobierno de Canadá “Futuros Líderes de la Américas” se presentó la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Biomateriales y Bioingeniería de la Universidad Laval en Quebec (Canadá), dirigido por el profesor Diego Mantovani. Con el objetivo de desarrollar un trabajo relacionado con el tema de la presente tesis de maestría se decidió trabajar con pululano y dextrano, dos polisacáridos que al entrecruzarse forman una estructura tridimensional de tipo hidrogel que sirve como soporte, que ha sido estudiado por dicho grupo de investigación y con el cual se han llevado a cabo estudios de cultivo, proliferación celular e incorporación de factores de crecimiento (*Autissier et al., 2007; Laverghner et al. 2012; Purnama et al. 2013*). Para poder comparar las características que este material posee con respecto a las exhibidas por los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno, se les asoció

---

el extracto de propóleos al 20% v/v y se realizó un ensayo de liberación de fenoles totales y compuestos flavonoides similar al desarrollado con los soportes de colágeno. Los resultados obtenidos mostraron que la liberación de los metabolitos del extracto de propóleos al 20% v/v en los soportes de pululano-dextrano ocurre de manera inmediata, lo cual indica que estos soportes no liberan controladamente los compuestos con que se impregnan. Este fenómeno puede atribuirse a las características estructurales del soporte en cuanto a la presencia de abundante porosidad y gran tamaño de los poros, lo cual facilita la difusión de los metabolitos ignorando las atracciones electrostáticas que puedan generarse entre estos y los numerosos grupos hidroxilo que poseen el pululano y el dextrano. También se observó con base en el perfil de liberación, que los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno poseen una mayor capacidad de incorporación de extracto que la mostrada por los soportes de pululano-dextrano; sin embargo, es de notar que variaciones en el proceso de producción de estos hidrogeles pueden resultar en la modificación del tamaño de poro, la porosidad y la densidad de este material, con lo cual algunas de sus características fisicoquímicas podrían modificarse incluida la capacidad de absorción de extractos. Finalmente se encontró que las propiedades mecánicas de ambos soportes son muy diferentes pues el elaborado con la mezcla pululano-dextrano es frágil y se rompe con facilidad ante pequeñas tensiones, mientras que los soportes de colágeno tipo I son mucho más resistentes. Esta característica es especialmente importante ya que en la práctica los soportes que puedan utilizarse como sustitutos deben demostrar ser capaces de resistir los esfuerzos mecánicos producidos durante su aplicación y durante el tiempo de permanencia en el sitio colocado.

La capacidad antibiótica de los extractos de propóleos se ha descrito extensamente, encontrándose actividad sobre bacterias, hongos y virus (*Marcucci, 1995; Koru et al., 2007; Ramos and Miranda, 2007; Moreira et al., 2008; Kalogeropoulos et al., 2009; Rodríguez et al., 2012; Angel, 2012; Wilson et al., 2015*), en este trabajo no se abordó este tópico, sin embargo, con el objetivo de complementar esta tesis se recomienda realizar estudios sobre este parámetro ya que potencialmente representa un efecto terapéutico que favorezca el proceso de sanación de heridas. Con el fin de complementar la información recolectada en este trabajo, se considera necesario realizar ensayos *in vivo* con este producto con la finalidad de conocer su funcionamiento en sistemas biológicos y su comportamiento en situaciones que se acerquen más a los que se encuentran en la práctica terapéutica.

## 6. Conclusiones y recomendaciones

### 6.1. Conclusiones

- El extracto acuoso de propóleos al 20% v/v *in vitro* no es citotóxico en líneas celulares de fibroblastos L929 y 3T3.
- El extracto acuoso de propóleos al 20% v/v posee actividad antioxidante bajo las metodologías ORAC y FRAP.
- Los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno permiten liberar de manera controlada los metabolitos secundarios del extracto acuoso de propóleos al 20% v/v asociado a ellos.
- Los soportes elaborados de pululano-dextrano no poseen la capacidad de liberar de manera controlada los metabolitos del extracto acuoso de propóleos al 20% v/v.

## 6.2. Recomendaciones

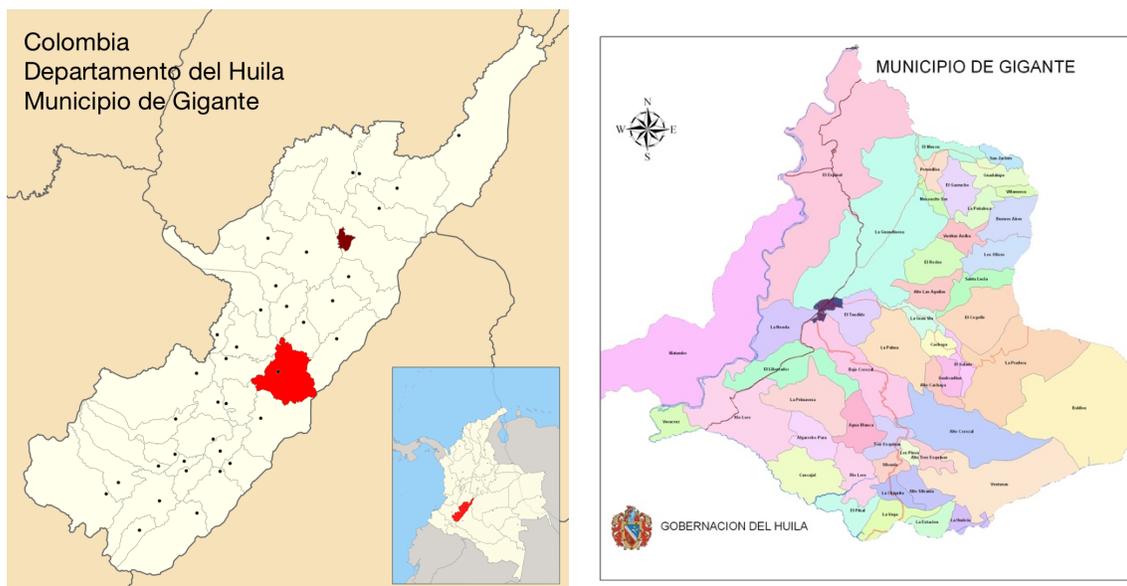
- Optimizar los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno para su asociación con extractos acuosos de propóleos.
- Evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica de los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno con asociación de extractos acuosos de propóleos.
- Evaluar el desempeño de los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de colágeno-gelatina con asociación de extractos acuosos de propóleos en un modelo *in vivo*.

## A. Anexo: Descripción del Municipio de Gigante en el departamento del Huila

El municipio de Gigante se encuentra en la parte centro-oriental del territorio huilense sobre la troncal del Magdalena, entre el cerro Matambo (en el margen izquierdo del río Magdalena) y la Cordillera Oriental. Posee una superficie de 626 Km<sup>2</sup> equivalente al 3,2% de la superficie del Departamento de los cuales 4 Km<sup>2</sup> pertenecen al área urbana y 662 Km<sup>2</sup> al área rural y se encuentra a una altitud de 860 metros sobre el nivel de mar; se encuentra sobre las coordenadas geográficas de Latitud norte de 2° 23' 23" y Longitud de 75° 33' al Oeste del Meridiano de Greenwich. La temperatura media es de 24 °C encontrándose varios pisos térmicos: cálido, medio, frío y páramo. El Municipio limita al norte con el municipio de Hobo y Algeciras; al sur con el Municipio de Garzón; al oriente con el municipio de Algeciras y el Departamento del Caquetá y al occidente limita con los Municipios de El Agrado, Paicol, Tesalia y Yaguará. Se encuentra ubicado a 84 Km de Neiva, capital del Departamento del Huila (*Gigante Huila; Gobernación Gigante Huila*).

En cuanto a la ecología, el municipio colinda con el Páramo de Miraflores ubicado en el extremo sur de la cordillera Oriental entre los 3300 y 3470 metros sobre el nivel del mar ocupando una extensión de 2903 hectáreas (ha) cubiertos por bosque natural, bosque secundario, restrojo, matorral de páramo, pajonales y bosque achaparrado. Dentro del componente biótico de la zona se encuentran especies vegetales como *Gaiandendron punctatum* y *Tibouchina grossa*, además de elementos de los géneros *Weinmannia*, *Ilex*, *Espeletia*, *Vaccinium*, *Miconia*, *Diplostephium fernandez-alonsoi*, *Gynoxys littlei*, *Ficus insipida*, *Prescottia stachyodes* y *Aulonemia trianae* (*Paramo de Miraflores*).

El sector agropecuario constituye el 70% de la economía de la región dedicándose 3700 ha para el cultivo de café, 1500 ha para cultivos transitorios (p.e. cereales, tubérculos, hortalizas) y 3644 ha para cultivos permanentes y semipermanentes (p.e. cacao, plátano); adicionalmente se estima que 22515 ha del municipio se utilizan como pastos para ganado (*Gobernación Gigante Huila*).



**Figura A-1. Mapa geográfico y político del municipio de Gigante en el Departamento del Huila. Tomado y modificado de:**

[https://es.wikipedia.org/wiki/Gigante\\_\(Huila\)#/media/File:Colombia\\_-\\_Huila\\_-\\_Gigante.svg](https://es.wikipedia.org/wiki/Gigante_(Huila)#/media/File:Colombia_-_Huila_-_Gigante.svg)

[http://www.gigante-huila.gov.co/mapas\\_municipio.shtml?apc=bcxx-1-&x=2897910](http://www.gigante-huila.gov.co/mapas_municipio.shtml?apc=bcxx-1-&x=2897910)

# Bibliografía

- Abraham, L. C., Zuená, E., Pérez-Ramírez, B. and Kaplan, D. L. (2008). Guide to collagen characterization for biomaterial studies. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 87(1): 264-85.
- Ángel, A. M. (2012). Evaluación de la actividad genotóxica de propóleos recolectados en diferentes apiarios de Cundinamarca y Boyacá (Colombia). (Maestría en Medicina Toxicología). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Autissier, A., Letourneur, D. and Le Visage, C. (2007). Pullulan-based hydrogel for smooth muscle cell culture. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 82(A): 336-342.
- Autissier, A., Le Visage, C., Pouzet, C., Chaubet, F. and Letourneur, D. (2010). Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta Biomaterialia* 6: 3640-3648.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H. and Tomic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 16: 585-601.
- Barroso, P. R., Lopes, R., Ferreira, E. M., Marinho, S. A., De Miranda, J. L., Lima, N. L. and Verli, F. D. (2012). Effect of propolis on mast cells in wound healing. *Inflammopharmacology*. 20: 289-294.
- Beldon, P. (2010). Basic science of wound healing. *Surgery*. 28(9): 409-412.
- Bello, S. A., Pereira, R. y Fontanilla, M. R. (2004). Elaboración de tejido conectivo artificial autólogo de mucosa oral y evaluación de su desempeño como cobertura biológica en lesiones mucosas inducidas en conejos. *Revista de la Federación Odontológica Colombiana*. (20): 20-41.
- Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- Bickers, D. R. and Athar, M. (2006). Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *Journal of Investigative Dermatology*. 126: 2565-2575.
- Brinckmann, J., Notbohm, H. and Müller, P. K. Collagen primer in structure, processing and assembly. Ed. Springer. Berlin. (2005), p. 1-63.

- 
- Brohem, C. A., Da Silva, L. B., Tiago, M., Soengas, M., De Moraes, S. B. and Maria-Enger, S. S. (2010). Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 24: 35-50.
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology*. 36: 347-363.
- Cardile, V., Panico, A., Gentile, B., Borrelli, F. and Russo, A., 2003. Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. *Life Sciences*. 73: 1027-1035.
- Chan, G. C., Cheung, K. and Sze, D. M. (2013). The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 44(3): 262-273.
- Chaouat, M., Le Visage, C., Autissier, A., Chaubet, F. and Letourneur, D. (2006). The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats. *Biomaterials* 27: 5546-5553.
- Cook, E. A., Cook, J. J., Bradi, H. and Mostafa, J. (2014). Bioengineered alternative tissues. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*. 31: 89-101.
- Cottica, S. M., Sabik, H., Antoine, C., Fortin, J., Graveline, N., Visentainer, J. V. and Britten, M. (2015). Characterization of Canadian propolis fractions obtained from two-step sequential extraction. *LWT - Food Science and Technology*. 60: 609-614.
- Cutiongco, M. F., Tan, M. H., Ng, M. Y., Le Visage, C. and Yim, E. K. (2014). Composite pullulan-dextran polysaccharide scaffold with interfacial polyelectrolyte complexation fibers: A platform with enhanced cell interaction and spatial distribution. *Acta Biomaterialia*. 10: 4410-4418.
- Dantzer, E. (2011). Place des dermes équivalents en chirurgie réparatrice des séquelles de brûlures. *Annales de chirurgie plastique esthétique*. 56: 369-381.
- Espinosa, L., Sosnik, A. and Fontanilla, M. R. (2010). Development and preclinical evaluation of acellular collagen scaffolding and autologous artificial connective tissue in the regeneration of oral mucosa wounds. *Tissue Engineering Part A*. (16): 1667-1679.
- Eming, S. A., Krieg, T. and Davidson, J. M. (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(3): 514-525.
- Enoch, S. and Leaper, D. J. (2007). Basic science of wound healing. *Surgery*. 26(2): 31-37.
- Flaten, G. E., Palac, Z., Engesland, A., Filipovic-Grcic, J., Vacnic, Z. and Skalko-Basnet, N. (2015). In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 75: 10-24.
- Flórez, A. M. (2015). Actividad antioxidante de extractos de *Calendula officinalis* asociados a soportes de colágeno tipo I. (Maestría en Ciencias Microbiología). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

- 
- Fontanilla, M. R. and Espinosa, L. G. (2012). *In Vitro* and *in Vivo* assessment of oral autologous artificial connective tissue characteristics that influence its performance as a graft. *Tissue Engineering*. 18(17-18): 1857-1866.
- Fontanilla, M. R., Chaparro, O., Samudio, I. *et al.* (2012). *Ingeniería de tejidos*. 1a Ed, Bogotá, 2012, p. 17-23.
- Fricain, J. C., Schlaubitz, S., Le Visage, C., Arnault, I., Derkaoui, S. M., Siadous, R., Catros, S., Lalande, C., Bareille, R., Renard, M., Fabre, T., Cornet, S., Durand, M., Léonard, A., Sahraoui, N., Letourneur, D. and Amédeé, J. (2013). A nano-hydroxyapatite--pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering. *Biomaterials* 34: 2947-2959.
- Frozza, C.O., Garcia, C.S., Gambato, G., de Souza, M.D., Salvador, M., Moura, S., Padilha, F.F., Seixas, F.K., Collares, T., Borsuk, S., Dellagostin, O.A., Henriques, J.A., Roesch-Ely, M. (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology*. 52: 137-142.
- Funakoshi-Tago, M., Okamoto, K., Izumi, R., Tago, K., Yanagisawa, K., Narukawa, Y., Kiuchi, F., Kasahara, T. and Tamura, H. (2015). Anti-inflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL-33 signaling pathway. *International Immunopharmacology*. 25: 189-198.
- Gigante Huila, Gigante (Huila). [https://es.wikipedia.org/wiki/Gigante\\_\(Huila\)](https://es.wikipedia.org/wiki/Gigante_(Huila)), Consultado Noviembre 5 de 2015.
- Glowacki, J. and Mizuno, S. (2007). Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers*. 89(5): 338-344.
- Gobernación Gigante Huila, Alcaldía de Gigante-Huila. [http://www.gigante-huila.gov.co/informacion\\_general.shtml#identificacion](http://www.gigante-huila.gov.co/informacion_general.shtml#identificacion), Consultado Noviembre 5 de 2015.
- Gregory, S. R., Piccolo, N., Piccolo, M. T., Piccolo, M. S. and Heggors, J. P. (2002). Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. *The journal of Alternative and Complementary Medicine*. 8(1): 77-83.
- Gurjar, M. S., Ali, S., Akhtar, M. and Singh, K. S. (2012). Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agricultural Sciences*. 3(3): 425-433
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. and Longaker, M. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*. 453: 314-321.
- Hancock, B. C., York, P. and Rowe, R. C. (1997). The use of solubility parameters in pharmaceutical dosage form design. *International Journal of Pharmaceutics*. 148: 1-21.

- Herford, A. S., Akin, L., Cicciu, M., Maiorana, C. and Boyne, P. J. (2010). Use of a porcine collagen matrix as an alternative to autogenous tissue for grafting oral soft tissue defects. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 68: 1463-1470.
- INVIMA, Plantas medicinales aceptadas con fines terapéuticos. <https://www.invima.gov.co/images/pdf/listado%20de%20plantas-%20v.%20julio%20publicar.pdf>, Consultado Octubre 6 de 2015.
- Jiménez, R. A. (2013). Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*). (Maestría en Ciencias Farmacéuticas), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Jiménez, R. A., Millán, D., Suesca, E., Sosnik, A. and Fontanilla, M. R. (2015). Controlled release of an extract of *Calendula officinalis* flowers from a system based on the incorporation of Gelatin-Collagen Microparticles into Collagen I Scaffolds: Design and in vitro performance. *Drug delivery and Translational Research*. 5(3): 209-218.
- Jones, I., Currie, L. and Martin, R. (2002). A guide to biological skin substitutes. *British Journal of Plastic Surgery*. 55: 185-193.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinos, I. and Karathanos, V. T. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*. 116: 452-461.
- Kirschner, C. M. and Anseth, K. S. (2013). Hydrogels in healthcare: From static to dynamic material microenvironments. *Acta Materialia*. 61: 931-944.
- Kirubanandan, S. and Sehgal, P. K. (2010). Regeneration of soft tissue using porous bovine collagen scaffold. *Journal of Optoelectronics and Biomedical Materials*. 2(3): 141-149.
- Koru, O., Toksoy, F., Acikel, C. H., Tunca, I. M., Baysallar, M., Guclu, A. U., Akca, E., Tuylu, A. O., Sorkun, K., Tanyuksel, M. and Salih, B. (2007). In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe*. 13: 140-145.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T. and Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*. 84: 329-339.
- Langer, R. and Vacanti, J. P. (1993). *Tissue Engineering*. Science. 260: 920-926.
- Lamy, J., Yassine, A. H., Gourari, A., Forme, N. et Zakine, G. (2015). Place des substituts cutanés dans le traitement chirurgical des grands brûlés sur plus de 60 % de la Surface corporelle. Revue de patients sur 11 ans dans le centre des brûlés adultes du CHRU de Tours. *Annales de Chirurgie Plastique Esthétique*. 60: 131-139.
- Lavergner, M., Derkaoui, M., Delmau, C., Letourneur, D., Uzan, G. and Le Visage, C. (2012). Porous

- polysaccharide-based scaffolds for human endothelial progenitor cells. *Macromolecular Bioscience*. 12: 901-910.
- Le Visage, C., Gournay, O., Benguirat, N., Hamidi, S., Chaussumier, L., Mougenot, N., Flanders, J. A., Isnard, R., Michel, J. B., Hatem, S., Letourneur, D. and Norol, F. (2012). Mesenchymal stem cell delivery into rat infarcted myocardium using a porous polysaccharide-based scaffold: A Quantitative Comparison with endocardial injection. *Tissue Engineering Part A*. 18(1-2): 36-44.
- Limová, M. (2010). Active wound coverings: bioengineered skin and dermal substitutes. *Surgical Clinics of North America*. 90: 1237-1255.
- Ma, J. K., Drake, P. M. W. and Christou, P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature*. 4: 794-805.
- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G. and Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86: 2046-2056.
- Maldonado, O., Jiménez, E. N., Guapillo, M. R., Ceballos, G. M. y Méndez, E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*. Julio-Diciembre: 32-39.
- Marcucci, M. (1995). Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 26: 83-99.
- Martin, P. (2015). Wound Healing – Aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 276: 75-81.
- Mathes, S. H., Ruffner, H. and Graf-Hausner, U. (2014). The use of skin models in drug development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 69-70: 81-102.
- Mesa, A. M., Gaviria, C. A., Cardona, F., Sáenz, J. A., Blair, S. y Rojano, B. A. (2010). Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 12(2): 13-26.
- Michiels, J. A., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O. And Jacques Dommes, J. (2012). Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry*. 130: 986-993.
- Millán, D. (2014). Evaluación de la biocompatibilidad y eficiencia como sustituto artificial de soportes de colágeno tipo I asociados con soportes de caléndula (*Calendula officinalis*) en heridas cutáneas en un modelo animal lagomorfo. (Maestría en Ciencias Microbiología). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

- Moreira, L., Dias, L. G., Pereira, J. A. and Estevinho, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 3482-3485.
- Moreno, Z., Martínez, P. y Figueroa, J. (2007). Efecto antimicrobiano *In vitro* de propóleos argentinos, colombianos y cubano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. *Nova*. 7: 70-15.
- Naranjo, M., Vélez, L. T. y Rojano, B. A. (2011). Actividad antioxidante de café colombiano de diferentes calidades. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 16(2): 164-173.
- Nelson, K. K. and Melendez J. A. (2004). Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radical Biology & Medicine*. 37(6): 768-784.
- Nyame, T. T., Chiang, H. A. and Orgill, D. P. (2014). Clinical Applications of Skin Substitutes. *Surgical Clinics of North America*. 94: 839-850.
- Olczyk, P., Wisowski, G., Komosinska-Vassev, K., Stojko, J., Klimek, K., Olczyk, M. and Kozma, E. M. (2013). Propolis modifies collagen types I and III accumulation in the matrix of burnt tissue. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013: 1-10.
- Palomino, L. R. (2009). Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos de Antioquia. (Maestría en Ciencias Química). Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Palomino, L. R., García, C. M., Gil, J. H., Rojano, B. A. y Durango, D. L., (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*. 16(3): 388-395.
- Palomino, L. R., Martínez, J. P., García, C. M., Gil, J. H. y Durango, D. L. (2010). Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleos en el municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 63(1): 5373-5383.
- Páramo de Miraflores, Paramo de Miraflores. [http://www.paramo.org/files/recursos/16\\_miraflores.pdf](http://www.paramo.org/files/recursos/16_miraflores.pdf), Consultado Noviembre 5 de 2015.
- Pardo, G. L., Reis, F. H., Dalalio, F. M., Nuñez, F., Cuesta, O., Uyemura, S. A., Curti, C. and Alberici, L. C. (2015). The cytotoxic effects of brown Cuban propolis depend on the nemorosone content and may be mediated by mitochondrial uncoupling. *Chemico-Biological Interactions* 228: 28-34.
- Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R. and Berthod, F. (2010). Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials*, 3(3): 1863-1887.
- Patrick, C. W., Mikos, A. G. and McIntire, L. V. *Frontiers in Tissue Engineering*, 1a Ed. Editorial Pergamon. Oxford, (1998), p. 3-11.

- 
- Pillai, S. I., Palsamy, P., Subramanian, S. and Kandaswamy, M. (2010). Wound healing properties of Indian propolis studied on excision wound-induced rats. *Pharmaceutical Biology*. 48(11): 1198-1206.
- Povilaitis, D., Sulniute, V., Venskutonis, P. R. and Kraujaliene, V. (2015). Antioxidant properties of wheat and rye bran extracts obtained by pressurized liquid extraction with different solvents. *Journal of Cereal Science*. 62: 117-123.
- Purnama, A., Aid-Launais, R., Haddad, O., Maire, M., Mantovani, D., Letourneur, D., Hlawaty, H. and Le Visage, C. (2015). Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. *Drug Delivery and Translational Research*. 5(2): 187-197.
- Ramos, A. F. N. and Miranda, J. L. (2007). Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 13(4): 697-710.
- Rodríguez, Y., Sánchez, F., Rojano, B., Durango, J. G., y Marín, J. (2012). Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento del Atlántico, Colombia. *Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica*. 15(2): 303-311.
- Rojano B. A., Zapata, I. C., Alzate, A. F., Mosquera A. J., Cortés F. B., y Gamboa, L. (2011). Polifenoles y actividad antioxidante del fruto liofilizado de Palma Naidi (*Açai Colombiano*) (*Euterpe oleracea* Mart). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 64(2): 6213-6220.
- Rojano, B. A., Zapata, K. y Cortes, F. B. (2012). Capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey (Curuba). *Revista Cubana Plantas Medicinales*. 17(4): 408-419.
- Romero, M., Rojano, B., Mella-Raipán, J., Pessoa-Mahana, C. D., Lissi, E. and López-Alarcón, C. (2010). Antioxidant capacity of pure compounds and complex mixtures evaluated by the ORAC - Pyrogallol red assay in the presence of Triton X-100 micelles. *Molecules*. 15(9): 6152-6167.
- Schafer, M. and Werner, S. (2008). Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacological Research*. 58(2): 165-171.
- Schultz, J. T., Tompkins, R. G. and Burke, J. F. (2000). Artificial skin. *Annual Review of Medicine*. 51: 321-244.
- Shaw, T. J. and Martin, P. (2009). Wound repair at a glance. *Journal of Cell Science*. 122: 3209-3213.
- Shoseyov, O., Amitai, H., Posen, Y., Yaar, A., Shilo, S., Roth, S., Dgany, O., Tal, T. And Lapidot, N.

- (2010). Large-scale molecular farming of recombinant human collagen in transgenic tobacco. Information System for Biotechnology News Report. September 2010: 1-4.
- Singer, A. J. and Clark, R. A. F. (1999). Cutaneous wound healing. The New England Journal of Medicine. 341(10): 738-746.
- Singleton, V. L. and Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 16: 144-158.
- Soneja, A., Drews, M. and Malinski, T. (2005). Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. Pharmacological Reports. 57: 108-119.
- Stein, H., Wilensky, M., Tsafrir, Y., Rosental, M., Amir, R., Avraham, T., Ofir, K., Dgany, O., Yayon, A. and Shoseyov, O. (2009). Production of bioactive, post-translationally modified, heterotrimeric, human recombinant Type-I collagen in transgenic tobacco. Biomacromolecules. 10: 2640-2645.
- Stroncek, J. D. and Reichert, M. W. Indwelling neural implants: Strategies for contending with the *in vivo* environment. Overview of Wound Healing in Different Tissue Types. CRC Press. Boca Raton. (2007), p. 3-38.
- Talero, C., Hernández, D. y Figueroa, J. (2012). Calidad microbiológica de propóleo crudo y sólidos solubles de extractos de propóleos de *Apis mellifera* en Colombia. Revista de Medicina Veterinaria y Zootécnia. 59 (II): 109-118.
- Thibodeau, G. A., Patton, K. T., Anatomía y Fisiología. 4ª Ed. Editorial Harcourt. Madrid. (2000), p. 162-187.
- Vacanti, J. P. and Langer R. (1999). Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. Lancet 1999. 354 (suppl I): 32-34.
- Van der Veen, V. C., Van der Wal, M. B. A., Van Leeuwen, M. C. E., Ulrich, M. M. W. and Middelkoop, E. (2010). Biological background of dermal substitutes. Burns. 36: 305-321.
- Venereo, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Revista cubana de Medicina Militar. 31(2):126-33.
- Williamson, D. and Harding, K. (2004). Wound healing. Medicine. 32(12): 4-7.
- Wilson, M. B., Brinkman, D., Spivak, M., Gardner, G. and Cohen, J. D. (2015). Regional variation in composition and antimicrobial activity of US propolis against *Paenibacillus* larvae and *Ascosphaera apis*. Journal of Invertebrate Pathology. 124: 44-50.
- Zea, G. (2012). Evaluación de soportes de colágeno tipo I como un sistema de entrega para la liberación de un extracto de Caléndula (*Calendula officinalis*). (Pregrado en Ciencias Químicas Farmacéutica). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.