

**Evaluación de la viabilidad celular en hidrogeles de celulosa bacteriana  
impregnados con aceites esenciales de caléndula, cúrcuma y orégano con potencial  
aplicación en apósitos para quemaduras de segundo grado**

**Presentado por:**

Lizeth Daniela Acuña Piña

Valentina Sánchez Flórez

**Código:**

U00125610

U00121730

**Director**

Ph.D. Silvia Milena Becerra Bayona

**Codirector**

Ph.D. Víctor Alfonso Solarte David

Ph.D. (c) Ingrith Carolina Flórez García

Universidad Autónoma de Bucaramanga

Facultad de Ingeniería

Programa de Ingeniería Biomédica

Bucaramanga

2023

## **Agradecimientos**

En primera instancia quiero agradecerle a Dios por haberme permitido llegar hasta aquí, por haberme guiado e iluminado. También agradecerle especialmente a mi familia, a mi madre y a mis hermanos por haberme apoyado incondicionalmente durante este proceso académico, y haberme motivado en los momentos más difíciles. Igualmente, estaré agradecida eternamente con mi mejor amiga por haberme guiado, aconsejado, y alentado a levantarme cada una de las veces que me sentía agotada. Asimismo, mis más sinceros agradecimientos a cada uno de los docentes del programa de Ingeniería Biomédica por su vocación y amor en la enseñanza universitaria, especialmente a nuestros directores de tesis de grado, Ph.D. Silvia Milena Becerra Bayona, Ph.D. Víctor Alfonso Solarte David y Ph.D. (c) Ingrith Carolina Flórez García porque gracias a sus conocimientos, guía, dedicación y amor por su trabajo pudimos desarrollar este proyecto de la mejor manera como parte de nuestra formación profesional.

***Lizeth Daniela Acuña Piña***

Gracias Dios, por permitirme iniciar y culminar con éxito esta carrera que es tan solo un escalón en un gran proyecto de vida en el que me guías día a día. Principalmente a mi mamá y a mi papá Yorlen y Orlando, por dedicar su vida y esfuerzo a nosotros sin ningún reproche, a mi hermana y hermano que siempre estuvieron para mí incluso en la distancia y a mi compañera de tesis por darme la mano en el preciso momento y a mi amigo incondicional, quien siempre hará una parte muy importante en mi vida. También a todos mis profesores en especial a aquellos tres que me acompañaron en este proyecto y a mis compañeros de clase de los cuales aprendí lecciones muy valiosas no solo en lo académico sino para la vida y siempre los tendré presentes en mi memoria y por último pero no menos importante a mis jefes y compañeros de trabajo por confiar en mí y darme oportunidades valiosas. Mil gracias a todos ustedes por hacer parte de este camino.

***Valentina Sánchez Flórez***

**Dedicatoria**

Dedico este proyecto de grado como parte de culminación de mi etapa universitaria a mi familia, porque son el motor de mi vida y me han apoyado incondicionalmente en cada una de las decisiones que tomo como parte de mi crecimiento personal y profesional. También mis logros están dedicados a mi mejor amiga quien en la distancia me ha alentado en los momentos más difíciles, brindándome su más sincero amor y apoyo incondicional.

***Lizeth Daniela Acuña Piña***

Este logro va dedicado principalmente a mi familia, a mi mamá y papá que no dudaron nunca de mis esfuerzos y en cambio siempre me apoyaron, a mi hermana por guiarme y ser mi ejemplo a seguir y a mi hermanito que aunque es la persona más valiente que conozco, sepa que como este, cualquier objetivo que se proponga es posible si se hace de corazón y con esfuerzo, para esas cuatro personas tan especiales es este logro, los amo.

***Valentina Sánchez Flórez***

## Resumen

Entre los diversos problemas de salud pública que se presentan en la actualidad en el mundo, es de especial interés la frecuencia con la que aparecen las quemaduras de segundo grado en pacientes, generalmente mujeres y niños, las cuales son causadas por diferentes factores. Este tipo de quemaduras afectan directamente dos capas de la piel, la dermis y la epidermis, ocasionando que la piel quede desprotegida y que sea propensa a que en ella se generen infecciones. Teniendo en cuenta esto, no existen tratamientos 100% efectivos para las quemaduras de segundo grado que generen las condiciones óptimas para una rápida recuperación de la herida sin ser abrasiva para el paciente y sin generar efectos secundarios, llevando al presente trabajo de investigación.

A continuación, se presentan los resultados de la tesis de pregrado de ingeniería biomédica, en la que partiendo de los beneficios que presenta la celulosa y los aceites esenciales, especialmente los de caléndula, cúrcuma y orégano, se decidió realizar un estudio con el fin de evaluar la viabilidad celular de hidrogeles de celulosa bacteriana (CB) impregnados con los aceites anteriormente mencionados. Por lo anterior, se obtuvieron hidrogeles de CB al usar la bacteria *Gluconacetobacter xylinus*, y se impregnaron con los diferentes aceites esenciales, de forma independiente, para conocer su capacidad de impregnación después de 24 horas y su capacidad de liberación transcurridas 48 horas. Por último, los lixiviados del proceso de liberación se emplearon para determinar la citotoxicidad en la línea celular MRC-5, obteniendo valores superiores al 50%, lo cual indica que los hidrogeles de CB impregnados con aceites esenciales podrían ser una alternativa terapéutica para tratar quemaduras de segundo grado.

**Palabras claves:** celulosa, aceites esenciales, viabilidad celular

**Abstract**

Among the various public health problems that currently occur in the world, the frequency with which second degree burns occur in patients, generally women and children, which are caused by different factors, is of special interest. This type of burn directly affects two layers of the skin, the dermis and the epidermis, leaving the skin unprotected and prone to infection. Bearing this in mind, there are no 100% effective treatments for second degree burns that generate the optimal conditions for rapid wound recovery without being abrasive to the patient and without generating side effects, giving rise to this research work.

Below are the results of the biomedical engineering degree thesis, in which, based on the benefits of cellulose and essential oils, especially those of calendula, turmeric and oregano, it was decided to carry out a study in order to evaluate the cell viability of bacteria cellulose hydrogels (CB) impregnated with the aforementioned oils. Therefore, CB hydrogels were obtained using the bacterium *Gluconacetobacter xylinus*, and impregnated with the different essential oils, independently, to determine their impregnating capacity at 24 hours and their release capacity at 48 hours. Finally, the leachates from the release process were used to determine cytotoxicity in the MRC-5 cell line, obtaining values greater than 50%, indicating that CB hydrogels impregnated with essential oils could be a therapeutic alternative for the treatment of second-degree burns.

**Keywords:** cellulose, essential oils, cell viability, cell viability

**Tabla de contenido**

Capítulo 1: Problema u Oportunidad	12
Planteamiento Del Problema	12
Justificación	13
Pregunta Problema	15
Objetivo General	15
Objetivos Específicos	15
Capítulo 2: Marco Teórico	15
Piel	15
Apósitos	16
Celulosa	17
<i>Síntesis de la celulosa bacteriana</i>	18
<i>Propiedades de la celulosa bacteriana (CB)</i>	19
Aceites esenciales	21
<i>Aceite de caléndula</i>	22
<i>Aceite de cúrcuma</i>	22
<i>Aceite orégano</i>	23
Impregnación de membranas con aceites esenciales	23
Estudio citotoxicidad	24
<i>Ensayo MTT</i>	25
<i>Exclusión de colorante: Azul tripano</i>	27
<i>Ensayo de colorimetría con rojo neutro</i>	28
Capítulo 3. Estado del arte	28
Capítulo 4. Metodología	31
Obtención de los hidrogeles de CB	31
Impregnación de los aceites esenciales en los hidrogeles de CB	34
Liberación de los aceites esenciales en los hidrogeles de CB	35
Estudio de viabilidad celular	36
Análisis de resultados	37
Capítulo 5: Resultados y análisis de resultados	38
Resultados	38
<i>Obtención De Hidrogeles De CB</i>	38

<i>Determinación de la capacidad de retención y liberación de los aceites en cada membrana</i>	40
<i>Determinación de la viabilidad celular</i>	43
Análisis de resultados	44
Capítulo 6: Conclusiones y recomendaciones	46
Referencias	47

**Lista de figuras**

<b>Figura 1</b> Capas de la piel	16
<b>Figura 2</b> Clasificación de los apósitos	17
<b>Figura 3</b> Estructura molecular de la celulosa	18
<b>Figura 4</b> Obtención de la membraba de CB usando el método de cultivo estático	19
<b>Figura 5</b> Técnicas de impregnación de membranas	24
<b>Figura 6</b> Reacción de la sal tetrazolio a formazano del MT	25
<b>Figura 7</b> Proceso para llevar a cabo la prueba de MTT	26
<b>Figura 8</b> Resultado de la placa de la reacción del MTT	27
<b>Figura 9</b> Ensayo de colorimetría con azul tirpano para cuantificar la viabilidad celular	27
<b>Figura 10</b> Diagrama del proceso para la obtención de hidrogeles de CB	33
<b>Figura 11</b> Lote de fermentación para la obtención de CB	33
<b>Figura 12</b> Proceso de impregnación	35
<b>Figura 13</b> Proceso de liberación de los aceites esenciales	36
<b>Figura 14</b> Lote de membrana de CB del medio HSMC y MC luego de ser purificadas y esterilizadas	38
<b>Figura 15</b> Biomasa y espesores de los hidrogeles de CB por cada medio	39
<b>Figura 16</b> Capacidad de impregnación de los hidrogeles de CB para cada aceite	40
<b>Figura 17</b> Capacidad de liberación de los hidrogeles de CB para cada aceite	42
<b>Figura 18</b> Porcentajes de viabilidad celular según ensayo de MTT	43



**Lista de tablas**

<b>Tabla 1</b> Propiedades de la celulosa vegetal y la CB	20
<b>Tabla 2</b> Composición de aceites esenciales de caléndula, orégano y cúrcuma	21
<b>Tabla 3</b> Composición de los medios de fermentación	32

**Lista de ecuaciones**

<b>Fórmula 1</b>	Cálculo de la viabilidad celular en el ensayo de colorimetría con azul tripano	28
<b>Fórmula 2</b>	Capacidad de impregnación	35
<b>Fórmula 3</b>	Capacidad de liberación	36
<b>Fórmula 4</b>	Porcentaje de viabilidad celular	37

**Lista de anexos**

<b>Anexo 1</b> Distribución de los aceites en la placa de 96 pozos para impregnación	55
<b>Anexo 2</b> Distribución de los aceites en la placa de 96 pozos con los lixiviados junto con los controles	55

## Capítulo 1: Problema u Oportunidad

### Planteamiento Del Problema

Según la Organización Mundial de la Salud aproximadamente 260 niños fallecen por causa de quemaduras todos los días y se estiman 180.000 muertes al año en la población en general (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2018). Estas quemaduras son causadas por diversos factores, siendo las más comunes las generadas por fuego, las cuales constituyen un 44,1% del total; le siguen las quemaduras eléctricas que comprenden un 29,9% y las que son provocadas por líquidos calientes con el 17,5% (Ávila, 2016). Entre las quemaduras más incidentes (48%) se encuentran las tipo 2, en las cuales la capa exterior de la piel y la dermis están afectadas. Por consiguiente, este tipo de quemaduras perjudican grandes áreas de la piel, lo que lleva a presentar complicaciones y propiciar infecciones bacterianas, las cuales son responsables del 95% de decesos por quemaduras (Moya et al., 2001).

Debido a la alta incidencia de este tipo de lesiones actualmente existen diferentes tratamientos para las quemaduras de segundo grado, donde se implementa el uso de tópicos tales como sulfaplata, furazín, dexpanthenol, entre otros, junto con la toma de medicamentos antiinflamatorios y rigurosas limpiezas en el área afectada (Rangel et al., 2005).

Adicionalmente, diferentes tipos de vendajes elásticos se encuentran en el mercado y son usados en la fase intermedia del tratamiento para evitar complicaciones y la formación de edema en la lesión, los cuales son cómodos para el paciente y no limitan la movilidad. Del mismo modo, se han desarrollado apósitos sintéticos y biológicos que permiten brindar un ambiente húmedo y controlar el exudado en la herida (SenarathYapa et al., 2009), lo que incide directamente en la disminución del dolor y la cicatrización del tejido afectado. Sin embargo, estos procedimientos son ineficaces para tratar las quemaduras (Alvis et al., 2021) debido a que no protegen las heridas de agentes bacterianos y rayos del sol, lo que genera a su vez hipersensibilidad y aparición de exudado en la superficie de la lesión (Miranda, 2020). Además, aproximadamente el 2,5% de los pacientes tratados con estos métodos experimentan rash,

prurito o sensación de quemadura debido a que la aplicación repetitiva de medicamentos puede causar exudado sobre la lesión, retrasando a su vez el proceso de cicatrización (Butcher, 2011). Asimismo, la presión que ejercen los vendajes produce lesiones dérmicas por la presencia de arrugas durante su aplicación e incluso rechazo del material. Otro método para la curación de heridas son los apósitos que, si bien son frecuentemente usados en el ámbito de la salud es importante elegir correctamente el apósito e implementarlo oportunamente ya que, de no ser así, estos pueden mantener la infección y retrasar la cicatrización si no se mantiene la humedad adecuada en la herida o si se presenta fuga de exudado (WUWHS, 2007). De acuerdo con esto, los tratamientos actuales no son completamente efectivos en el manejo de quemaduras, por lo que se hace necesario evaluar y desarrollar nuevas alternativas de curación que contribuya al proceso de cicatrización de las heridas.

### **Justificación**

Teniendo en cuenta las cifras mencionadas anteriormente, se puede decir que, los apósitos para quemaduras de primer y segundo grado han sido una alternativa clínica que ha venido en constante desarrollo. Gracias a sus características de protección, evita el resecamiento del tejido y su reemplazo no es traumático para el paciente. Una de las grandes ventajas de los apósitos es que permiten absorber el exceso de exudado, que es una de las consecuencias de la inflamación cuando se presentan quemaduras (Miranda Altamarino, 2020). Con el objetivo de crear un apósito que reúna las características de protección y efectiva curación para el paciente, se han investigado alternativas con diversos componentes, entre los que se encuentra la celulosa. Este polímero ha llamado la atención de investigadores y científicos debido a sus propiedades y su bajo costo (Aliabadi, 2020). En consecuencia, se han venido desarrollando e implementando apósitos a base de CB ya que presentan propiedades de resistencia y alta absorción, a lo que los expertos han llamado “piel artificial”, debido a que

permite hacer una sustitución o capa protectora a corto plazo, favoreciendo y contribuyendo a una mejor recuperación de la herida (Cabral, 2004).

Adicionalmente, con el fin de potenciar las propiedades de estos apósitos, se han incluido diferentes aceites esenciales naturales en su estructura. En particular, en las últimas décadas, han sido formulados y desarrollados para implementarlos en el campo de la salud como alternativa de tratamiento en diferentes tipos de infecciones, heridas y traumas (Djilani, 2012). Se destacan para el presente proyecto principalmente 3 aceites por sus propiedades, la cúrcuma, el orégano y la caléndula, que se caracterizan por presentar propiedades antiinflamatorias y antibacterianas (Torres, 2014). En específico, el aceite de caléndula se destaca por sus efectos antiinflamatorios debido a sus compuestos flavonoides y triterpenos, presentes en alta proporción en sus flores (Arévalo & Monroy, 2017). Por parte del orégano, autores han reportado propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antioxidantes atribuidas a los monofenoles carvacrol y timol, principales quimiotipos presentes naturalmente (D'Antuono et al., 2000; Deighton et al., 1993). En cuanto a la cúrcuma, diversas investigaciones han revelado que ayuda a aliviar problemas inflamatorios al modular la señal de las citoquinas, un tipo de moléculas proinflamatorias. En particular, esta capacidad antiinflamatoria en parte es debida a su capacidad de inhibir la síntesis de prostaglandinas inflamatorias (Witkin, 2013).

Teniendo en cuenta estos precedentes, se busca evaluar un apósito de CB en combinación con los aceites esenciales naturales de orégano, caléndula y cúrcuma, aprovechando las características inherentes de la CB que ha mostrado tasas rápidas de epitelización y regeneración tisular, gracias a sus propiedades naturales de hidrofiliidad y alta porosidad que permiten intercambio tanto de moléculas como de gases de la herida, lo cual contribuye a su rápida recuperación. Por lo tanto, se tiene como fin evaluar la respuesta citotóxica en hidrogeles de CB impregnados con estos aceites esenciales, y de acuerdo con los resultados obtenidos, potencializar su uso como apósito para el tratamiento de quemaduras.

**Pregunta Problema**

¿Cuál es el efecto citotóxico de la CB impregnada con aceites esenciales de cúrcuma, orégano y caléndula en fibroblastos?

**Objetivo General**

Evaluar la viabilidad celular en hidrogeles de CB impregnados con aceites esenciales de caléndula, orégano y cúrcuma, mediante ensayos de citotoxicidad, para su potencial uso en el diseño de apósitos para quemaduras de segundo grado.

**Objetivos Específicos**

1. Producir hidrogeles de CB a partir de fermentación aerobia para la impregnación de aceites esenciales.
2. Determinar la capacidad de retención de los aceites esenciales en los hidrogeles de CB por medio de ensayos de impregnación para su posterior liberación.
3. Estimar el efecto citotóxico en los hidrogeles de CB impregnados con aceites esenciales mediante ensayos de actividad metabólica.

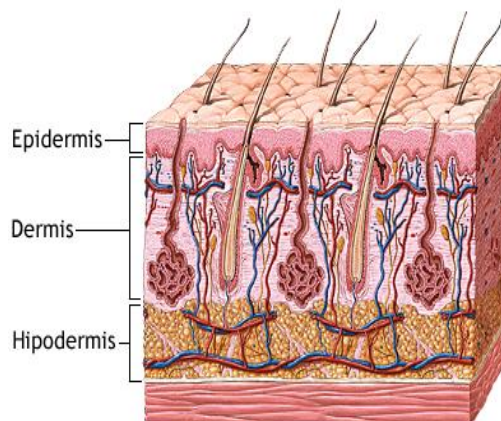
**Capítulo 2: Marco Teórico****Piel**

La piel es un órgano que cumple diferentes funciones, como la de proteger el cuerpo de la entrada de microorganismos, también desempeña actividades tales como impedir la pérdida de fluidos corporales, producir vitamina D, participar en la excreción de las glándulas sudoríparas, entre otras. La piel está compuesta por tres capas (ver figura 1): la epidermis, la dermis y la hipodermis. La epidermis a su vez contiene 5 capas, dentro de las cuales se encuentran los queratinocitos y melanocitos que producen la queratina y la melanina, respectivamente. Por otro lado, en la dermis superficial se encuentran fibras de colágeno tipo I-

III y en la dermis reticular fibras de colágeno tipo I y fibras de elastina, componentes que brindan a la dermis un papel clave en la curación de heridas. Finalmente, en la hipodermis están las células adiposas cuya función repercute en la reserva de energía.

### Figura 1.

#### *Capas de la piel*



De acuerdo con lo anterior, las capas de la piel cumplen funciones específicas, por lo que, de ser afectadas, la piel no podrá proteger el cuerpo contra agresiones externas. Este es el caso de las quemaduras de segundo grado, las cuales afectan directamente dos capas de la piel: la epidermis y la dermis, en las cuales se desencadena un proceso de desnaturalización de las proteínas tisulares llevando a la destrucción de los tejidos implicados, donde la piel queda desprotegida contra microorganismos que pueden infectar la lesión y complicar y retrasar el proceso de curación y cicatrización de las heridas (Jiménez et al., 2018).

### Apósitos

Un apósito es un producto sanitario que puede ser una almohadilla o compresa estéril y que es utilizado para cubrir una herida y fomentar a su vez la cicatrización. Acorde a lo anterior, los apósitos tienen diferentes funciones y están fabricados de acuerdo con el propósito y la aplicación que estos vayan a tener dependiendo de la lesión, la gravedad y la localización de la herida. En este contexto, se podría decir que los apósitos simulan funciones propias de la

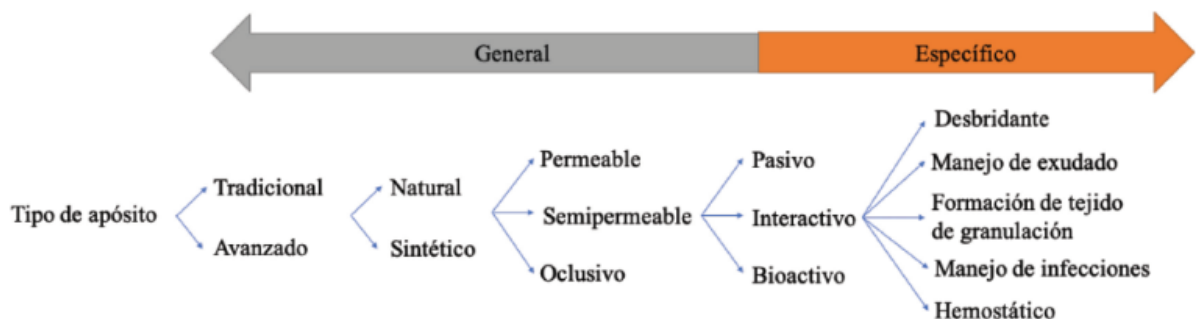


matriz extracelular de la piel, ya que desempeñan un papel importante en la detención del sangrado, acelerando el proceso de coagulación, sellando la herida, y actuando de barrera de protección contra infecciones que pueden ser producidas por bacterias, gérmenes y agentes externos. Por otro lado, también, absorben el exudado, repercuten directamente en el desbridamiento de la herida, alivian el dolor y promueven la cicatrización, lo cual es posible, gracias a que el apósito brinda un ambiente estéril, transpirable y húmedo que favorece el proceso de granulación y epitelización, y que al mismo tiempo hace que la lesión sane de una manera más rápida y efectiva (Martínez et al., 2020).

Ahora bien, los apósitos se clasifican en diferentes categorías de acuerdo con los materiales con los que estos sean fabricados y sus mecanismos de acción. Es decir, según la complejidad, estos pueden ser tradicionales como gasas, vendas, o, avanzados que son fabricados para que cumplan una función biológica; según la naturaleza del biomaterial polimérico; según su permeabilidad; según su interacción biológica con la herida; y según el efecto terapéutico, tal y como se observa en la figura 2.

## Figura 2

*Clasificación de los apósitos*



## Celulosa

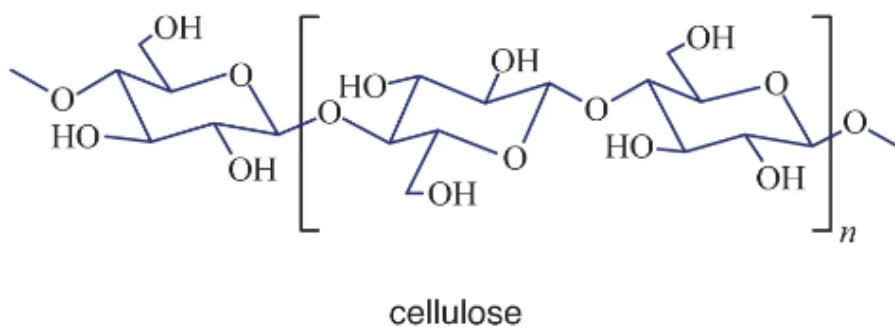
La celulosa es un polímero orgánico que se destaca por ser el más abundante del mundo, ya que está presente en todas las plantas, además es secretada por algunas bacterias, procariotas y algas (Gañán et al., 2017).

Aunque la celulosa es conocida por ser insoluble en agua, hidrofílica y rígida, gracias a su cristalinidad, se caracteriza por ser higroscópica lo que le permite la absorción de agua por ende puede alcanzar cierto grado de hinchamiento (Rajinipriya et al., 2018).

La celulosa está constituida por una cadena de carbonos como se muestra en la Figura 3, la cual se forma por la unión de miles (n) de unidades de anhidroglucosa por medio de enlaces glucosídicos B-1,4, formando disacáridos conocidos como celobiosa. La posición de los hidroxilos libres a lo largo de la molécula durante su polimerización permite fuertes enlaces de hidrógeno intramoleculares e intracatenarios con moléculas de oxígeno de cadenas vecinas manteniendo una estructura altamente cristalina y ordenada (Hosseini et al., 2018).

### Figura 3

*Estructura molecular de celulosa*



*Nota.* La figura representa las unidades de repetición de la celulosa.

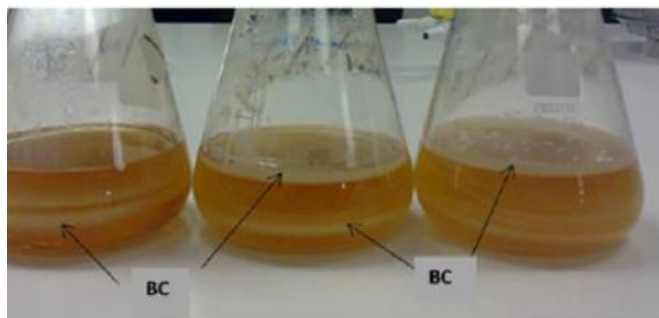
### **Síntesis de la celulosa bacteriana**

La síntesis de la celulosa bacteriana (CB) se realiza gracias a las bacterias pertenecientes a la familia Acetobacteraceae, que se pueden encontrar en frutas, alimentos fermentados, bebidas, vegetales y vinagre. Diversos estudios registran que el uso de la bacteria *Gluconacetobacter-xylinus*, genera una celulosa con una estructura altamente similar a la de origen vegetal (Chavez et al., 2004).

La producción y obtención de CB es un proceso altamente regulado. Existen dos posibles métodos para producirse, el método de cultivo estático y el cultivo agitado, en ambos, se tienen diversas reacciones donde participan un gran número de enzimas, complejos catalíticos y proteínas reguladoras (Brown & Montezinos, 1976). Específicamente la obtención se divide en dos pasos: la formación intracelular de cadenas de 1,4- $\beta$ -glucano y el ensamblaje y cristalización de cadenas de celulosa. En este último paso, las cadenas de celulosa se extruyen y se autoensamblan en fibrillas. Como resultado, se obtienen varias capas de CB como se observa en la Figura 4, cuyo espesor depende del tiempo de fermentación, lo que impactará su capacidad de retención de agua.

#### **Figura 4**

*Obtención de membrana de CB usando el método de cultivo estático*



*Nota.* BC: celulosa bacteriana

#### ***Propiedades de CB***

La CB en comparación con la vegetal posee características y propiedades mecánicas aplicables en el sector biomédico; su alto porcentaje de pureza, cristalinidad y capacidad de absorción de agua como se muestran en la Tabla 1, son algunas de las características de la CB que llaman la atención para su implementación en hidrogeles, liberación controlada de fármacos y aplicación en ingeniería de tejidos. Además, al ser un biopolímero natural, presenta una alta tasa de biocompatibilidad que al implementarse con otros polímeros naturales potencializa dichas propiedades (Ramirez, 2012). En este contexto, durante estudios para la

caracterización de la CB, se identificó que, al tener contacto con la piel, la CB se seca y forma una fina capa similar al celofán, que se adhiere a la capa más externa de la epidermis (Gorgieva, 2020). Esta respuesta de la CB representa una ventaja ya que, el segmento de piel permanece húmedo sin afectar la herida, evitando la maceración de la misma, lo que evita la presencia de infecciones (Streitz, 2020).

**Tabla 1**

*Propiedades de la celulosa vegetal y la CB*

PROPIEDAD	CELULOSA BACTERIANA	CELULOSA VEGETAL
RESISTENCIA A LA TRACCIÓN (MPA)	20-300	25-200
MÓDULO DE YOUNG (MPA)	Lámina: 20 000 Fibra simple: 130 000	2.5-0.170
CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (%)	>95	25-35
TAMAÑO DE LAS FIBRAS (NM)	200-100	Escala micrométrica
CRISTALINIDAD (%)	74-96	40-85
HIDROFILICIDAD RELATIVA (%)	40-50	20-30
PUREZA (%)	>90	<80
GRADO DE POLIMERIZACIÓN (%)	14 000 - 16 000	300- 10 000
POROSIDAD (%)	>85	<75
ÁREA SUPERFICIAL TOTAL ( $m^2/g$ )	>150	<70

El hecho de que la CB presente diferencias significativas respecto a su conformación estructural y propiedades físicas en comparación con la celulosa vegetal, como se muestra en la figura 5 (Wang et al., 2019), la convierten en uno de los materiales más prometedores en la creación de apósitos para el cuidado de lesiones como quemaduras, ya que las propiedades que posee le permiten cumplir con requisitos como mantener una humedad adecuada en la herida, y la no interferencia en la actividad celular para el proceso de cicatrización.

## Aceites esenciales

Los aceites esenciales son aceites volátiles que están compuestos por sustancias o mezclas complejas de más de 100 compuestos orgánicos que pertenecen a su vez a diferentes clases de compuestos alifáticos, monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos. En la tabla 2 se listan los principales componentes relacionados con los aceites de caléndula, orégano y cúrcuma. Estos aceites son líquidos y poco solubles en agua, pero solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos que son altamente utilizados en la industria de la cosmetología, alimentación y de la farmacéutica (López, 2004). Además, los aceites esenciales tienen gran importancia en el área de la ingeniería de tejidos debido a que poseen propiedades que aceleran la epitelización, tienen actividad antiedematosa y antimicrobiana, y al mismo tiempo protegen las células del daño oxidativo (Sarmiento, 2016).

**Tabla 2**

*Composición de aceites esenciales de caléndula, orégano y cúrcuma*

Composición de los aceites					
Orégano		Caléndula		Cúrcuma	
Componente	% del compuesto	Componente	% del compuesto	Componente	% del compuesto
p-Cimeno	11,68	Saponinas triterpénicas	2-10	Turmerona	36,90
γ-Terpineno	5,51	Terpenos	4,80	a-Turmerona	18,90
Thymol	67,51	Flavonoides	0,3-0,3	B-Turmerona	13,90
Eugenol	1,82	Mucílagos	15,00	Isomero del ciclo pentanillo	6,10
Cariofileno	5,38	Carotenoides	0,017-0,078	Curcumeno	1,80
a-Berganoteno	1,32	Taninos	10,40	Bornano	0,90
Trans-a-Berganoteno	1,65	Polisacaridos solubles en agua	14,75	Citral	0,30
				Zingiberenol	0,20
				Cis-farnesol	0,30
Óxido de cariofileno	2,22	Péptidos	9,60	Óxido de cariofileno	0,01
		Hemicelulosa	5,92	Cariofileno	0,08

***Aceite de caléndula***

Es un aceite extraído específicamente de flor de la Caléndula *Officinalis*, la cual es una hierba de la familia de las asteráceas que se caracteriza principalmente por ser aromática, por su color amarillento anaranjado y por sus atractivas propiedades (Águila et al., 2000). Estas propiedades se deben gracias a los compuestos de la caléndula, dentro de los cuales se encuentran los triterpenoides que brindan efectos antiinflamatorios y antiedematosos, los flavonoides y polisacáridos que son responsables de proporcionar efectos antioxidantes-cicatrizantes y la luteína y betacaroteno que brindan protección a la piel, junto con otros componentes que se encuentran en menor proporción, tales como, aldehídos, cetonas, ácidos libres, entre otros (Revista Semana, 2022) que hacen que el aceite de caléndula sea frecuentemente utilizado en la regeneración de tejidos y en la curación de heridas (Carretero, 2009).

***Aceite de cúrcuma***

El aceite esencial de cúrcuma es extraído del rizoma de la planta a manera de infusión. Este es utilizado en la medicina por sus propiedades antiinflamatorias en problemas digestivos, asimismo es implementado de forma tópica ya que ayuda en procesos como la cicatrización además de poseer características antioxidantes y anticancerosas (Blumenthal et al., 2000; Taylor, 2011). Adicionalmente, es importante resaltar que se aplica también como tratamiento de quemaduras y en la restauración de piel dañada o envejecida.

Lo anterior, gracias a que presenta dentro de sus componentes, la curcumina y la demetoxicurcumina (Jayaprakasha et al., 2005) que le brindan la capacidad de inhibir la síntesis de prostaglandinas inflamatorias (Wiktin, 2013). De igual manera se destacan los sesquiterpenoides y monoterpenoides como componentes altamente influyentes en las propiedades del aceite esencial de cúrcuma (Itokawa et al., 2008).

***Aceite orégano***

El orégano es una hierba perteneciente a la familia Lamiaceae, cuyo aceite esencial es obtenido a partir de la destilación de las flores secas y de las hojas de la planta de orégano, caracterizado especialmente por su color amarillento oscuro, además que se destaca por sus propiedades antimicrobianas y cicatrizantes en el campo de la salud (Lozano, 2004). Este efecto antibacteriano se logra debido a la presencia de metabolitos secundarios, como lo son el carvacrol, timol, terpineno y p-cimeno que logran destruir la membrana celular de las bacterias y alterar su homeostasis, combatiendo y reduciendo la infección del área afectada sin perjudicar las células de la piel (Lambert et al., 2001).

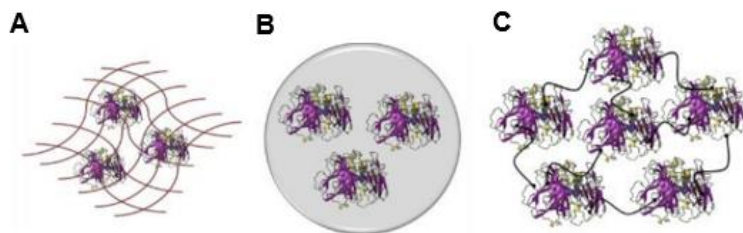
**Impregnación de membranas con aceites esenciales**

Con el fin de evaluar las características que presentan las membranas de celulosa y su potencial uso en conjunto con los aceites esenciales, se indaga acerca de las técnicas que permitan la impregnación y la interacción de dichas membranas con los aceites esenciales.

Gracias a las combinaciones e interacciones que pueden existir entre diferentes compuestos naturales, se han realizado investigaciones enfocadas en el ámbito de la ingeniería, con el fin de establecer los procesos aptos para realizar dicha impregnación. Existen diversos métodos que permiten impregnar moléculas dentro de los que se encuentran el encapsulamiento, el crosslinking o entrecruzamiento y atrapamiento, como se muestran en la figura 5, con los cuales se busca delimitar el desplazamiento de una molécula en una región determinada por una estructura sólida (Elnashar, 2010).

**Figura 5.**

*Técnicas de impregnación de membranas*



*Nota. La figura muestra gráficamente las técnicas de impregnación de las moléculas. A. Atrapamiento, B. Encapsulamiento, C. Entrecruzamiento*

Existen diferencias entre estos métodos, entre ellas se encuentra que con la técnica de encapsulamiento se crean microcápsulas por medio de gelificación, en las cuales quedan impregnadas las moléculas. Por otro lado, la técnica de atrapamiento permite el libre movimiento de las moléculas en una solución, pero restringidas por la estructura reticular del gel, del cual se tiene control de las condiciones como su porosidad con el fin de garantizar el correcto atrapamiento de las moléculas. A diferencia de la técnica de entrecruzamiento en la cual se forma una estructura tridimensional a través de la unión de un conjunto de moléculas (Elnashar, 2010).

**Estudio citotoxicidad**

La citotoxicidad es el daño o muerte celular provocado por la acción de anticuerpos específicos o por células citotóxicas (Mesa & Arango, 2009). Por medio de los ensayos de citotoxicidad in vitro, también conocidos como ensayos de viabilidad, se pretende evaluar el efecto citotóxico de un biomaterial específico, sobre la actividad celular al someterse a un medio biológico.



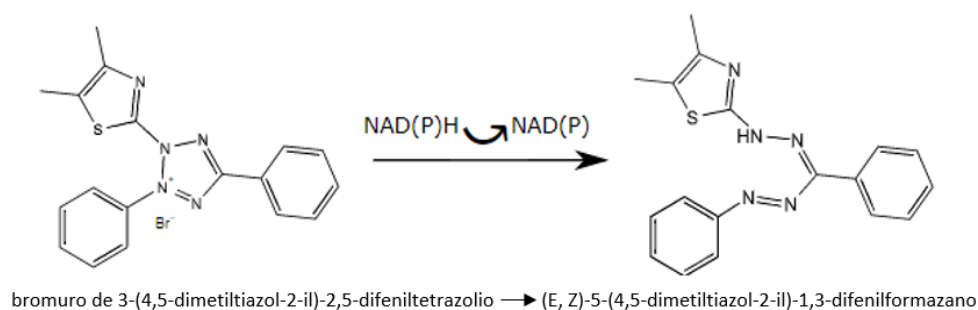
Aunque existen diversas formas y métodos para evaluar esta actividad celular los más utilizados y fáciles de implementar son pruebas de colorimetría que utilizan diferentes soluciones, entre las que se encuentran, el bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, conocido como ensayo de MTT, la resazurina, el azul tripano y el rojo neutro (Aristizabal et al., 2009).

### **Ensayo MTT**

El MTT es un ensayo que se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por medio de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa como se muestra en la Figura 6, en un compuesto de color azul, conocido como formazán (Acosta et al., 2019). Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

### **Figura 6**

*Reacción de la sal de tetrazolio a formazano del MTT*



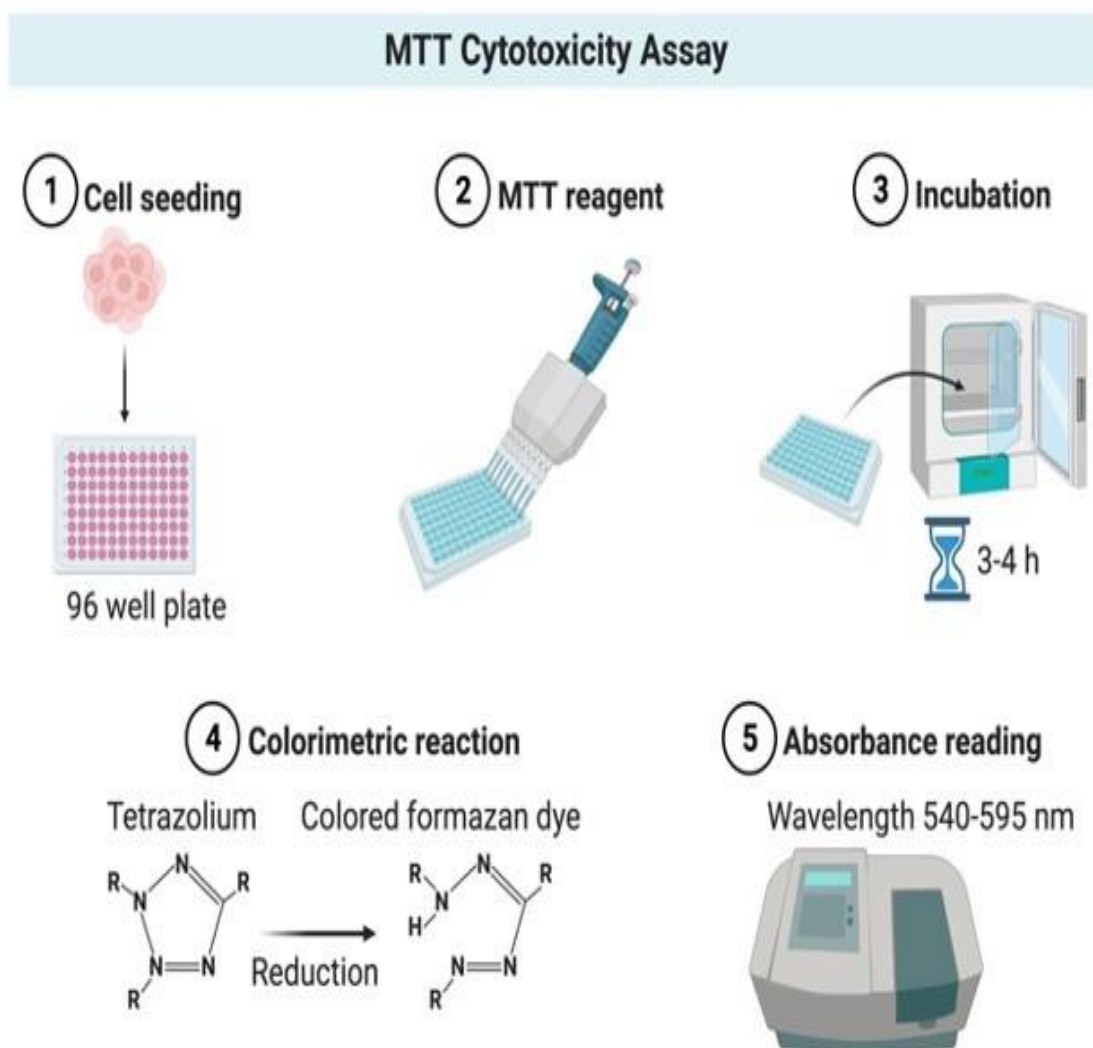
*Nota.* Al empezar la reacción se tiene bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio para obtener finalmente (E, Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano.

La prueba de MTT es un corto ensayo que consta específicamente de 5 pasos (Figura 7). Una vez se tiene el cultivo de células a estudiar, se añade el colorante tetrazol amarillo

(MTT), se deja incubar para que ocurra la reducción química. Posteriormente, se obtienen las muestras con diferentes intensidades de color (Figura 8), la cual depende de la actividad celular que se tenga y finalmente, se procede a medir cuantitativamente en un espectrofotómetro a una densidad óptica de 580nm (DO580).

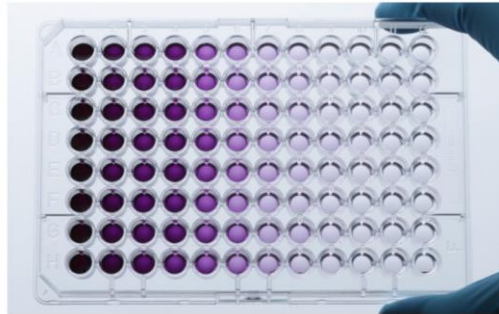
### Figura 7

*Proceso para llevar a cabo la prueba de MTT*



**Figura 8**

*Resultado de la placa de la reacción del MTT*



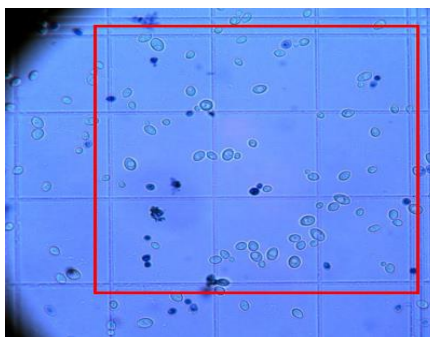
*Nota.* Donde se ve mayor intensidad del color se identifica mayor actividad celular.

***Exclusión de colorante: Azul tripano***

El método de tinción de azul tripano es implementado actualmente para cuantificar y caracterizar la viabilidad celular (Bio Render, 2022). El proceso de este ensayo consiste en añadir el colorante el cual permite teñir la membrana de las células muertas y excluir el colorante de las células vivas (sin lesión en la membrana) e impedir que se tiña. Como se muestra en la Figura 9, se presentan células de un azul intenso y otras totalmente blancas. Implementando este método se puede cuantificar la viabilidad mediante el conteo de células vivas ( $N_v$ ) y de las células muertas ( $N_m$ ) como se muestra en la fórmula 1 (Quiles FJ, 2018)

**Figura 9**

*Ensayo de colorimetría con azul tripano para cuantificar viabilidad celular*



*Nota.* Se realiza el conteo de las células teñidas ( $N_m$ ) que se encuentran dentro de la cuadrícula de 3x3 que se señala en rojo.

**Fórmula 1**

*Cálculo de la viabilidad celular en el ensayo de colorimetría con azul tripano*

$$Viabilidad = \frac{Nv}{(Nv + Nm)}$$

*Nota.* Células vivas blancas (Nv) y células muertas azules (Nm).

***Ensayo de colorimetría con rojo neutro***

Este ensayo consiste en que el colorante se incorpore en el interior de las membranas de las células, de forma que, si se logran teñir, se determinan como células viables, y así se pueda obtener un valor para calcular la viabilidad de dicho ensayo (Heriyati, 2008).

**Capítulo 3. Estado del arte**

Gracias a sus características y propiedades la celulosa se ha convertido en un biomaterial que ha llamado la atención en la comunidad científica, ya que ha sido implementada como red para promover la curación y ayudar a cicatrizar diferentes tipos de heridas (Zheng et al.,2020). En el año 2000, João Carlos Moreschi decidió explotar las propiedades de la celulosa y creó una membrana de biocelulosa bacteriana cristalina, conocida como Membracel®, la cual es capaz de sustituir temporalmente la piel actuando como barrera protectora contra agentes externos y al mismo tiempo permitir el intercambio gaseoso de la región, de forma que logra controlar el exudado de la herida, promover el desarrollo del tejido de granulación, acelerar el proceso cicatricial y reducir el dolor gracias a que aísla las terminaciones nerviosas (Membracel, 2021).

En este contexto, tiempo después, la empresa Bionext estableció convenios con investigadores del Instituto de Química de la Universidad Estatal Paulista para estudiar nuevas formas de aprovechamiento de la CB en relación con sus características, por lo que crearon películas finas de celulosa para posteriormente evaluarlas. Una vez evaluadas, según el director médico Lecy Marcondes Cabral, las películas de celulosa podían usarse en

quemaduras de segundo y tercer grado, en procedimientos de cardiología y odontología, además, que también funcionaban como sustitutos temporales de tejido en úlceras crónicas (Ereno, 2014).

Algunos años después, en el año 2008, el doctor T. Maneerung creó un biomaterial compuesto de CB, pero en este caso, con otros componentes como nanopartículas de plata donde se demostró la efectividad de este como barrera de protección contra bacterias Gram negativas y Gram positivas. En este aspecto, la CB también ha sido implementada en el campo de la ingeniería de tejidos junto con otros compuestos, como la hidroxiapatita y el alcohol polivinílico (PVA) en el desarrollo de hidrogeles ya que ha demostrado que por su estructura tridimensional facilita el soporte y el crecimiento celular para la regeneración y el reemplazo de tejidos sin que este llegue a necrosis (Carreño et al., 2012).

De forma similar, en otro estudio se encontró que la plata actúa como antimicrobiano frente a bacterias, levaduras y hongos (Altamirano et al., 2020). Por ende, durante las últimas décadas se crearon apósitos liberadores de plata (Ag+) como es el caso de Mepilex Ag®, un apósito antimicrobiano de espuma absorbente utilizado en una amplia gama de heridas exudativas crónicas y agudas. Adicionalmente, se han desarrollado apósitos de plata nanocristalina, los cuales han demostrado actividad *in vitro* contra una amplia variedad de bacterias comunes clínicamente relevantes y resistentes a los antibióticos (Silverstein P. et al, 2011). Sin embargo, según la ISBI (International Society for Burn Injuries) los apósitos que contienen plata tienen efectos citotóxicos que pueden retrasar la cicatrización de las heridas.

Siguiendo con las diversas investigaciones alrededor de la CB, la Universidad Pontificia Bolivariana de Medellín, en conjunto con la Universidad de Antioquia implementaron nuevas técnicas y desarrollaron un apósito de CB mediante la fermentación de la *Gluconacetobacter medellinensis*, con potencial aplicación en el tratamiento de quemaduras y úlceras crónicas. Se implementó PVA con CB y nanocompuestos de PVA/CB, los cuales se caracterizaron por medio de pruebas de hinchamiento, donde se observó la capacidad que tiene la CB de imitar la

forma de la interfaz gas-líquido durante su síntesis, permitiendo la creación del apósito.

Además, la alta capacidad de retención de agua de la CB y su compatibilidad le brindaron características especiales al apósito, especialmente en mantener la humectación de la herida y la proliferación celular, lo que lleva a un proceso de epitelización, el cual es mediado por los queratinocitos y se da durante la cicatrización (Osorio et al., 2013).

En otros estudios se encontró que los apósitos de celulosa oxidada han sido implementados para la regeneración tisular y tratamiento en quemaduras y han demostrado obtener en el paciente un menor grado de inflamación a corto plazo y una mayor protección de la zona comprometida, lo que da como resultado características evidentes de compatibilidad y poco rechazo por parte del tejido (Osorio et al., 2014).

Gracias a que se han visto resultados prometedores de la CB junto con otros componentes naturales, en Madrid, también se han desarrollado apósitos con biocidas para tratar heridas tópicas, logrado por los investigadores del CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), quienes crearon apósitos liberadores de timol, componente biocida natural presente en aceites esenciales de orégano y tomillo, los cuales han logrado la reducción de infecciones bacterianas sin perjudicar los fibroblastos y queratinocitos presentes en la piel (Gámez & Herrera et al., 2020).

En este aspecto, en el 2017 se realizó un estudio sobre la influencia que tenía el aceite de caléndula en el desarrollo de apósitos de plata para curación de heridas, y se encontró que el apósito presentaba propiedades antibacterianas y cicatrizantes, las cuales, lograban controlar el exudado de la herida, y al mismo tiempo la protegían de microorganismos que pudiesen afectar y retrasar el proceso de curación (Zapata, 2017).

Del mismo modo, los aceites esenciales también se han implementado como agentes antimicrobianos naturales para apósitos fibrosos a base de celulosa como alternativa en la curación de heridas. En este contexto, se ha demostrado que dichos apósitos pueden inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*, y al mismo tiempo no son citotóxicos (Liakos et al., 2015).

De manera similar, se han estudiado membranas artificiales de celulosa funcionalizadas con aceites naturales para detección *in vitro* de fármacos. Estas membranas se sintetizaron a partir de nitrato de celulosa, acetato de celulosa, poliamida, fluoruro de polivinilideno y politrifluoretileno. Cada membrana fue impregnada con aceites de cognac, oliva y emú por inmersión de la membrana y posteriormente se eliminó el exceso de aceite. De acuerdo con esto, se encontró que la membrana de nitrato de celulosa, cuyos poros tenían un diámetro 0,1  $\mu\text{m}$ , mostró una permeabilidad del fármaco cercana a la del tejido intestinal de cerdo extirpado, mientras que las que se impregnaron con aceites, en general, su coeficiente de permeabilidad fue mayor que la del tejido de cerdo (Fensham et al., 2020).

Teniendo en cuenta la revisión bibliográfica realizada es importante destacar que la celulosa ha sido objeto de investigación desde hace muchos años y que actualmente es utilizada e implementada en la curación de heridas por su alta capacidad de absorción que le permite mantener la humedad en la lesión, controlar el exudado y participar en la regeneración de tejidos. También se han desarrollado apósitos de CB junto con otros componentes como la plata donde se han demostrado efectos antimicrobianos, disminución en el dolor, y protección lo que permite que en la zona afectada se lleve a cabo el proceso de cicatrización. De igual manera, los aceites esenciales han demostrado tener propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y cicatrizantes.

#### **Capítulo 4. Metodología**

##### **Obtención de los hidrogeles de CB**

Con el fin de que la bacteria *Gluconacetobacter Xylinus* proliferara, se utilizaron tres medios de cultivo con diferente composición (tabla 3). El primer medio fue el estándar (HS), el segundo fue medio con mucílago de café (MC), y el tercero tuvo la combinación del medio HS con mucílago de café (HSMC).

**Tabla 3**

Composición de los medios de fermentación

Medios de fermentación					
<b>Medio HS</b> (Hestrin. Schramm)	Concentración (%)	<b>Medio HSMC</b> (HS + Mucílago de café)	Concentración (%)	<b>Mucílago de café</b> (MC)	Concentración (%)
Glucosa	2	Mucílago de café	98,6	Mucílago de café	100
Peptona	0,5	Peptona	0,5		
Levadura	0,5	Levadura	0,5		
Fosfato disódico	0,27	Fosfato disódico	0,27		
Ácido cítrico	0,12	Ácido cítrico	0,12		

Posterior a su preparación, se ajustó el pH a 5,5 y los medios se esterizaron a 121°C por 20 minutos.

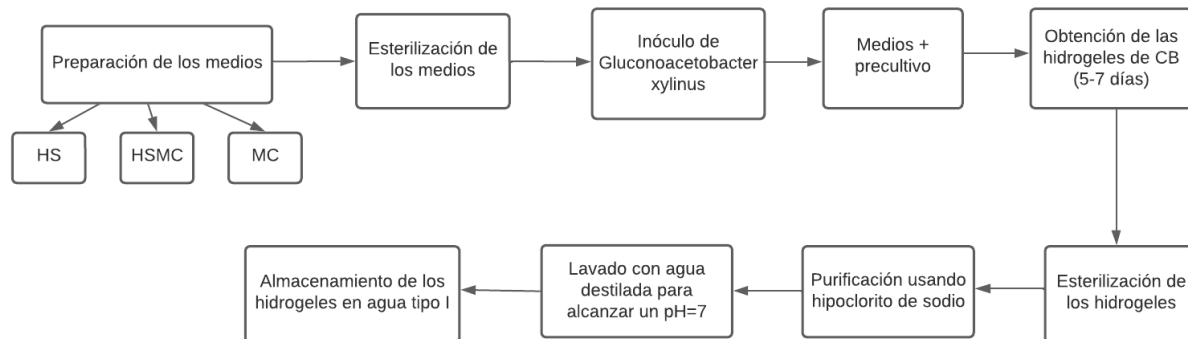
A continuación, un vial de las bacterias *Gluconacetobacter-xylinus* criopreservadas se transfirió a 50 mL del medio HS, y se incubó a 30°C y 150 rpm por 24 horas (este corresponde al inóculo activado). Posteriormente, se agregaron 25 mL del inóculo activado a 225 mL de medio HS, y se incubó a 30°C y 150 rpm por otras 24 horas (este fue el precultivo). A continuación, el precultivo se transfirió a cada uno de los medios en estudio, para obtener una concentración final de 10 % de este precultivo. Para esto, se mezclaron 5 mL del precultivo con 45 mL de cada uno de los medios, y las bacterias se cultivaron a 30°C por 5 días para los medios de HSMC y MC, mientras que con HS se cultivaron por 7 días. Transcurrido el tiempo de cultivo, los hidrogeles de CB se observaban en la parte superior de cada uno de los medios de cultivo.

Se procedió a retirar los hidrogeles de CB de cada uno de los medios para ser lavados con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% (v/v) por 60 minutos. Después de esto, la solución de hipoclorito se retiró y los hidrogeles se terminaron de lavar con agua destilada hasta alcanzar un pH de 7, para finalmente almacenarlos a 4°C en agua destilada previamente esterilizada. La figura 10 muestra un resumen del proceso anteriormente descrito.



**Figura 10**

*Diagrama del proceso para la obtención de hidrogeles de CB.*



*Nota.* HS: Medio Hestrin. Scharmm, HSMC: Medio HS suplementado con mucílago de café, MC: Mucílago de café.

**Figura 11**

*Lote de fermentación para la obtención de CB*



*Nota.* Los medios se distribuyeron en 16 frascos, cada uno con un volumen de 50 mL. En la bandeja superior se evidencian los frascos con medio HSMC (a), en la bandeja inferior los de MC (b), y con un color más claro los frascos con el medio HS (c). Se realizó la incubación por 7 días en las instalaciones del laboratorio de UNAB Ambiental de la Universidad Autónoma de Bucaramanga.

### **Impregnación de los aceites esenciales en los hidrogeles de CB**

En cuanto al proceso de impregnación de hidrogeles de CB, se evaluó únicamente un periodo de impregnación de 24 horas con los diferentes aceites esenciales en estudio: orégano, caléndula y cúrcuma. Para este experimento se hizo uso de hidrogeles de CB producidos a partir de los tres medios (HS, HSMC y MC). Previamente al proceso de impregnación, los hidrogeles se dejaron hinchar en PBS durante 24 horas, y una vez transcurrido el tiempo se procedió a tomar punches de 6 mm de cada uno de ellos. Por otro lado, se prepararon los aceites esenciales con DMEM-high glucose (HG) a partir de una solución concentrada de 400.000  $\mu\text{g/mL}$ , la cual se encontraba almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  con el fin de obtener una concentración final de 4000  $\mu\text{g/mL}$ .

Luego de este proceso, se prepararon viales con cada uno de los aceites que iban desde una concentración de 4000 $\mu\text{g/mL}$  hasta 2 $\mu\text{g/mL}$ , para medir las absorbancias de cada uno de ellos en el Nanodrop con el fin de realizar una curva con estos datos. Cabe aclarar que, en esta parte del experimento, se establecieron las longitudes de onda de acuerdo al pico más alto que se observaba en el Nanodrop (es decir, donde el aceite tenía la mayor absorbancia), obteniendo para el orégano, la caléndula y la cúrcuma una longitud de onda de 232, 235 y 237 nm, respectivamente. En consecuencia, con los datos obtenidos de las absorbancias, se realizó una curva para cada aceite, dando como resultado una correlación lineal, la cual se usó para calcular las concentraciones de las muestras en estudio, como se describe a continuación.

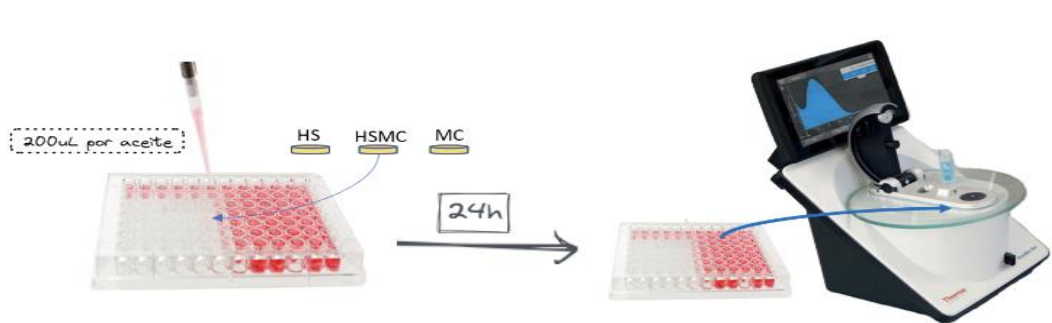
Posteriormente, en un plato de 96 pozos se agregaron 200  $\mu\text{L}$  en cada pozo de cada uno de los aceites esenciales y por otro lado 200  $\mu\text{L}$  por pozo de los blancos, distribución la cual se evidencia en el anexo 1. Luego, se añadieron los hidrogeles de CB y se incubaron por 24 horas a temperatura ambiente.

Al finalizar el tiempo de incubación, se sacaron los hidrogeles de CB y se tomaron 2 $\mu\text{L}$  de cada pozo para llevarlos al Nanodrop y medir la absorbancia, proceso que se realizó tres veces por pozo. A modo de ejemplificar esta parte del experimento, se muestra la figura 12.

Con estos datos y con la correlación lineal obtenida anteriormente, se calculó la concentración final presente de los diferentes aceites, en cada pozo. Finalmente, por medio de la masa ( $m$ ), la concentración inicial ( $4000 \mu\text{g/mL}$ ), la concentración final y el volumen de  $200 \mu\text{L}$  por pozo ( $V$ ) se obtuvo la capacidad de impregnación de cada uno de los aceites esenciales en los hidrogeles usando la fórmula 2.

### Figura 12

*Proceso de impregnación*



### Fórmula 2

*Capacidad de impregnación*

$$CI = \frac{[\text{concentración inicial} - \text{concentración en el pozo}]}{m} * V$$

*Nota. Las unidades de la capacidad de impregnación son  $\frac{\mu\text{g de masa del aceite}}{\mu\text{g de masa de celulosa}}$*

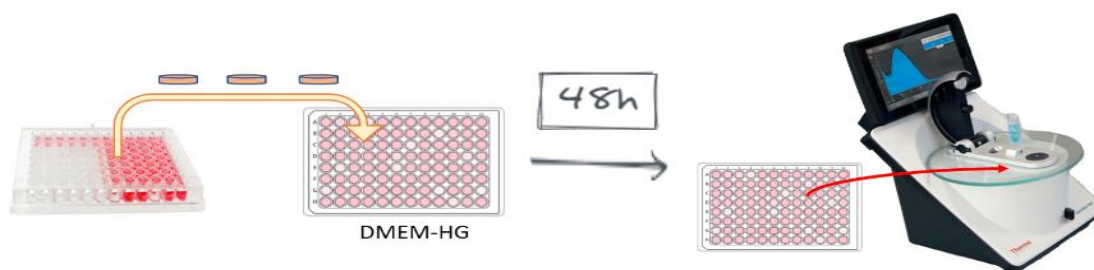
### Liberación de los aceites esenciales en los hidrogeles de CB

Luego de las 24 horas del proceso de impregnación, se sacaron los hidrogeles de CB y se transfirieron a un plato de 96 pozos que contenía medio DMEM-HG (cada pozo contenía  $200 \mu\text{L}$ ), y se incubaron por 48 horas a temperatura ambiente con el fin de liberar la solución que contenía cada uno de ellos. Una vez finalizadas las 48 horas, se removieron los hidrogeles y se llevaron a una balanza digital para pesarlos y así poder determinar su masa, teniendo en cuenta que estas mediciones se realizaron 3 veces por hidrogel. En paralelo, con la solución

que quedó en cada pozo (lixiviados), se midió la absorbancia en cada uno de ellos a longitudes de onda de 232, 235 y 237 nm para orégano, caléndula y cúrcuma, respectivamente. A partir de estos datos y la correlación lineal obtenida inicialmente, (se describe en el proceso de impregnación), se calculó igualmente la concentración final o concentración liberada por cada uno de los hidrogeles en cada uno de los pozos. Por consiguiente, con los datos de la masa y el volumen, se calculó la capacidad de liberación (fórmula 3) de los aceites esenciales en cada uno de los hidrogeles de CB.

### Figura 13

*Proceso de liberación de los aceites esenciales*



*Nota.* En la figura se observa el proceso de liberación, donde se transfirieron los hidrogeles de CB a un plato con DMEM-HG y pasadas las 48 h se midieron las absorbancias de cada uno de los aceites esenciales en el Nanodrop.

### Fórmula 3

*Capacidad de liberación*

$$CL = \frac{\text{concentración final liberado}}{m} * V$$

### Estudio de viabilidad celular

Para estos experimentos, se sembraron fibroblastos (línea celular MRC-5) usando medio DMEM-HG suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez las células alcanzaron alrededor del 90% de confluencia, se lavaron con PBS por 5 minutos, tripsinizaron y resuspendieron en medio de cultivo, para su posterior uso.

Para realizar la siembra en los pozos, se preparó una solución, la cual contenía medio DMEM-HG suplementado con 10% de SFB y las células colectadas previamente, solución de la cual se añadió 100 µL/pozo en una placa de 96 pozos y se incubó a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Después de esto, se retiró todo el medio de cultivo, dejando solo la monocapa celular que se encontraba en el fondo del pozo, y se agregaron 100 µL/pozo de los lixiviados (solución que se describe en el proceso de liberación). La distribución de la placa con las diferentes soluciones se encuentra en el anexo 2. Adicionalmente, en otros pozos, se añadieron 100 µL/pozo de DMEM-HG suplementado con SFB al 10%, (control positivo), 100 µL/pozo de DMEM-HG suplementado con SFB al 2% y 100 µL/pozo de DMSO (control negativo), y la placa se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas con el fin de evaluar si las células sobrevivían al medio expuesto, es decir, a los diferentes aceites esenciales.

A continuación, las soluciones que había en cada uno de los pozos se descartaron y se reemplazaron por 20 µL DMEM-HG + 20 µL de la solución de MTT por cada pozo, con el fin de obtener una concentración final de 0,5 mg / mL, y así incubar la placa por 4 h a 37 °C. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante de los pozos nuevamente y se añadieron 200 µL de DMSO/pozo y se incubó por 15 minutos. Después, el plato se llevó al espectrofotómetro y las absorbancias se leyeron a 580. Por último, estos datos se usaron para determinar el porcentaje de viabilidad celular en cada uno de los pozos mediante la fórmula 4.

#### **Fórmula 4**

*Viabilidad celular*

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{[\text{abs LIXIVIADO} - \text{abs DMSO}]}{\text{abs DMEM HG}} * 100$$

*Nota.* abs: absorbancia leída en el espectrofotómetro.

#### **Análisis de resultados**

Por medio de los resultados obtenidos en cada una de las etapas de experimentación se realizaron los análisis estadísticos utilizando el software Graphpad Prism, en el que se

graficaron los datos con su respectivo promedio y desviación estándar. Adicionalmente, se verificó la normalidad de los datos, con el fin de realizar comparaciones de datos paramétricos y en el caso que no, no paramétricos. Finalmente, se realizó un análisis de desviación ANOVA de dos vías considerando significativos aquellos valores de  $p < 0.05$  y, buscando garantizar la reproducibilidad de los resultados.

## Capítulo 5: Resultados y análisis de resultados

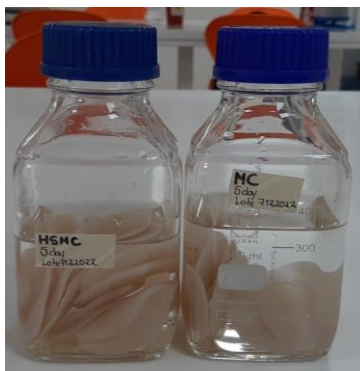
### Resultados

#### *Obtención de Hidrogeles de CB*

Después de la fermentación de los medios de cultivo HSMC y MC durante 5 días, se logró obtener una capa de CB homogénea que como se mencionó anteriormente, se lavó con hipoclorito de sodio al 0.5% (v/v) y esterilizó a 121°C, para ser utilizada en el proceso de impregnación. Luego de 48 horas, a los 7 días se obtuvieron los hidrogeles de la fermentación del medio HS, obteniendo una membrana completamente uniforme.

#### Figura 14

*Lote de membranas de CB del medio HSMC y MC luego de ser purificadas y esterilizadas.*



*Nota.* Hidrogeles de CB obtenidas del medio HSMC (HS suplementado con mucílago de café) y el medio MC (mucílago de café).

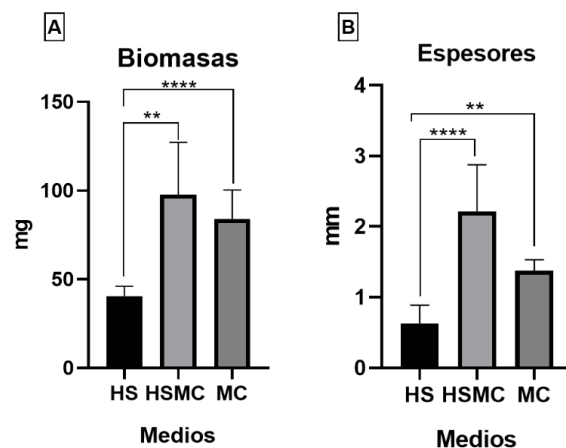
Al culminar los 7 días, se procedió a realizar la caracterización de estos hidrogeles, para lo cual se obtuvo el peso y el espesor de los mismos por medio de una balanza analítica y un

calibrador digital. Cabe aclarar que se tomaron tres mediciones para cada hidrogel de CB. Estos datos se evidencian en la figura 15 con sus respectivos promedios y desviaciones estándar.

En la figura 15A se observan los resultados de las biomazas para cada una de las membranas obtenidas de cada medio y adicionalmente se midieron los espesores, los cuales se reportan en el lado B de la Figura 15.

### Figura 15

*Biomasa y espesores de los hidrogeles de CB por cada medio*



*Nota.* Se presenta el espesor y la biomasa de los hidrogeles de CB obtenidos para cada uno de los medios de fermentación HS, HSMC y MC. Los datos se reportan para n=3 muestras independientes por formulación. Las diferencias estadísticas entre los medios están representadas por: \*\*\*\* para  $p < 0.0001$  y \*\* para  $p = 0,039$  y para b por \*\*\*\* para  $p < 0.0001$  y \*\* para  $p = 0.058$

En cuanto a la caracterización de los hidrogeles de CB, se encontraron diferencias significativas en el espesor de los hidrogeles obtenidos en medio HS con respecto a los obtenidos en medios HSMC y MC, donde los hidrogeles en medio HSMC presentaron un espesor significativamente mayor, específicamente, presentaron un espesor 3.5 veces mayor que HS ( $p < 0.0001$ ), y 1.61 veces mayor que MC. Por otro lado, los hidrogeles HS presentaron

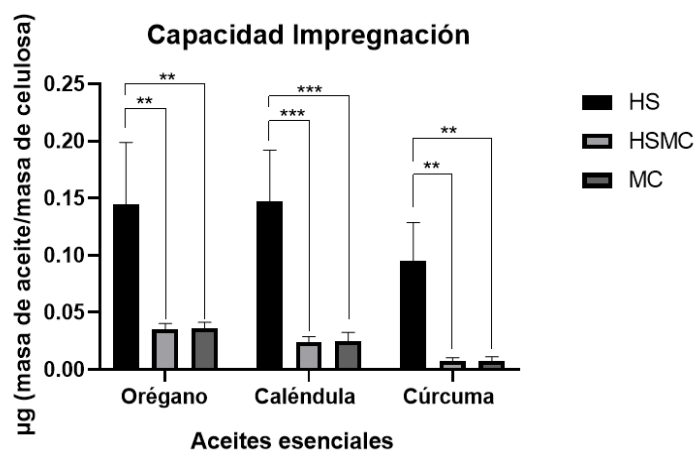
una biomasa significativamente menor que los de HSMC y MC (alrededor de 2.4 y 2.1, respectivamente). Por último, teniendo en cuenta los hidrogeles de CB que obtuvieron mayor biomasa y espesor, se tendrían en primer lugar los del medio HSMC con un promedio de  $97,5 \pm 27,14$  mg y 2,218 mm respectivamente, seguido de los del medio MC con  $84,11 \pm 15,27$  mg de biomasa de CB y 1,37 mm de espesor y finalmente los hidrogeles de HS con  $40,5 \pm 5,18$  mg y 0,63 mm respectivamente.

### ***Determinación de la capacidad de retención y liberación de los aceites en cada membrana***

En el proceso de impregnación se colocaron los hidrogeles de CB producidos a partir de los diferentes medios HS, HSMC y MC en un plato de 96 pozos que contenía los aceites esenciales de orégano, caléndula y cúrcuma, durante 24 horas a temperatura ambiente, para posteriormente determinar la concentración de aceite que se impregnó en cada uno ellos. A continuación, se reportan los resultados de la capacidad de impregnación calculada para cada uno de los hidrogeles de CB.

**Figura 16**

*Capacidad de impregnación de los hidrogeles de CB para cada aceite*



*Nota.* Las diferencias estadísticas entre los grupos están representadas por: \*\* para  $0.0029 < p < 0.0056$ , \*\*\* para  $p = 0.0002$ .



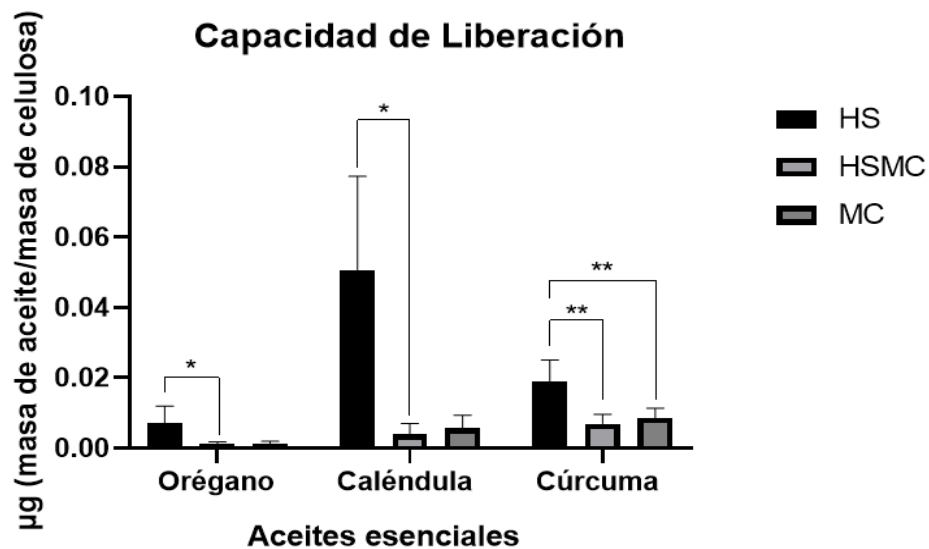
En este caso, se debe tener en cuenta que se tienen dos criterios de estudio, las membranas HS, HSMC y MC y los aceites esenciales de orégano, caléndula y cúrcuma.

Según los datos obtenidos, se evidencia que el hidrogel con la mayor capacidad de impregnación es el del medio HS para los tres aceites esenciales, orégano, caléndula y cúrcuma, con un promedio de 0.145, 0.1469 y 0.0952  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ , respectivamente. Al comparar con los medios modificados HSMC y MC, las diferencias obtenidas son significativas, donde el hidrogel de HS para el aceite de orégano tuvo una capacidad de impregnación 4.1428 veces mayor que el del hidrogel HSMC, y 4 veces mayor que el de MC. De manera similar, para el aceite de caléndula se evidenció que el hidrogel de HS tuvo una capacidad de impregnación 6.1852 veces mayor que el del hidrogel HSMC, y 5.876 veces mayor que el hidrogel de MC. En el caso del aceite de cúrcuma, la capacidad de impregnación del hidrogel de HS fue 12.49 veces mayor que el de HSMC, y 12.7 veces mayor que MC. Por otro lado, se evidencia que si bien las diferencias obtenidas son significativas entre el hidrogel HS con respecto al HSMC y al MC para todos los aceites, los que se impregnaron con aceite de cúrcuma obtuvieron una mayor desigualdad entre ellos, lo cual puede ser por efectos de la composición de este aceite, mientras que para los aceites de orégano y cúrcuma sus diferencias son similares.

Al finalizar el proceso de retención de los aceites, se procedió a iniciar el experimento de liberación de los aceites donde los hidrogeles se transfirieron a un plato que contenía medio DMEM-HG, y se dejaron por 48 horas a temperatura ambiente. Esto, con el propósito de medir las absorbancias y determinar la concentración de los lixiviados, según lo mencionado en la sección de metodología. Los resultados obtenidos de este procedimiento se muestran en la figura 17.

**Figura 17**

Capacidad de liberación de los hidrogeles de CB para cada aceite



*Nota.* Las diferencias estadísticas entre los grupos están representadas por: \* para  $0.0111 < p < 0.0229$  y \*\* para  $0.0019 < p < 0.0029$ .

Para la capacidad de liberación se obtuvieron valores con un comportamiento ligeramente similar al de la capacidad de impregnación. En este caso, para el aceite esencial de orégano se evidenció que el hidrogel HS tuvo una mayor capacidad de liberación que el HSMC, siendo 5.6250 veces más alta. Para el aceite de caléndula, el hidrogel HS tuvo una capacidad de liberación 12.95 veces mayor que el HSMC y por último, para el aceite de cúrcuma se encontraron diferencias significativas entre el hidrogel HS con respecto al HSMC y MC, donde el hidrogel de HS fue 2.73 veces mayor que HSMC y 2.20 veces mayor que los de MC. Por otro lado, no se presentaron diferencias significativas respecto a la capacidad de liberación entre los hidrogeles de HS con respecto a los de MC para los aceites de orégano y caléndula.

Finalmente, realizando una comparación entre la capacidad de liberación que obtuvo el hidrogel de HS en los tres aceites esenciales, se observa que este presentó una mayor

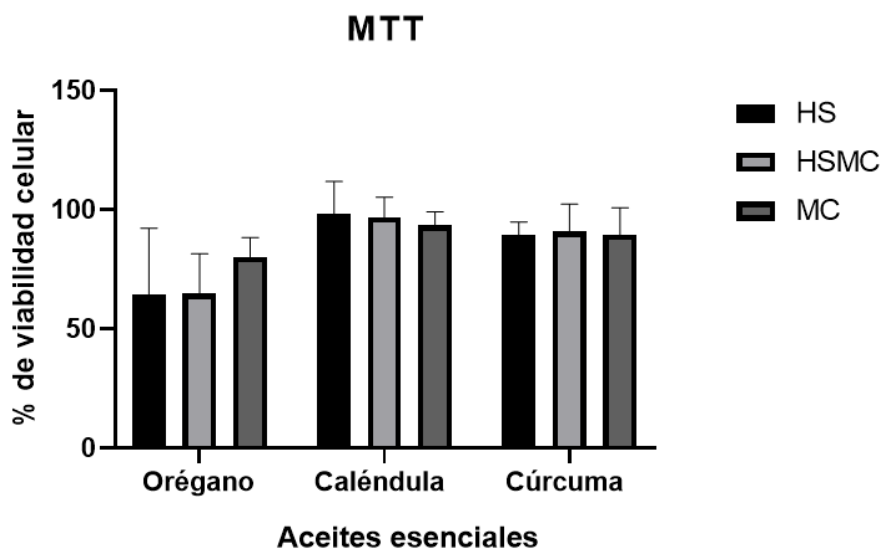
capacidad de liberación en el aceite de caléndula. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la capacidad de liberación que obtuvo el hidrogel HS en el aceite de caléndula con respecto al aceite de cúrcuma, lo que indica que son ligeramente similares, mientras que con el aceite de orégano si, siendo 7 veces mayor la capacidad de liberación de HS de caléndula en relación con HS en el aceite de cúrcuma.

### ***Determinación de la viabilidad celular***

El ensayo de MTT se realizó con el fin de evaluar la viabilidad celular en los hidrogeles de CB impregnados con aceites de orégano, caléndula y cúrcuma. En este caso, las células (fibroblastos) se cultivaron en presencia de los lixiviados obtenidos en el objetivo anterior, con el propósito de evaluar si los aceites esenciales llevaban a su muerte o si por el contrario, era viable su implementación para el desarrollo de hidrogeles de CB con potencial uso en apósitos para quemaduras de segundo grado.

### **Figura 18**

*Porcentajes de viabilidad celular según ensayo de MTT*



Los resultados obtenidos del ensayo de MTT revelan que hubo una supervivencia celular superior al 50% para los tres aceites esenciales de orégano, caléndula y cúrcuma. Por otro

lado, no se encontraron diferencias significativas de viabilidad celular entre las membranas HS, HSMC y MC para ninguno de los aceites esenciales en estudio. Sin embargo, se resalta el alto porcentaje de viabilidad que presenta el aceite de caléndula para los tres medios, HS, HSMC y MC, con un promedio de 98, 96.63 y 93.28% respectivamente, seguido del aceite de cúrcuma que tuvo porcentajes de viabilidad celular de 89.42, 90.81 y 89.35% para las membranas de HS, HSMC y MC, respectivamente. Por último, cabe mencionar que las células que presentaron una más baja supervivencia son las que se expusieron al aceite de orégano, obteniendo así una viabilidad celular de 64.54% para HS, 64.63% para HSMC y 80.14% para los hidrogeles de MC.

### **Análisis de resultados**

Algunos desechos agroindustriales como el mucílago de café son característicos por ser una fuente altamente rica en azúcares (Puerta-Rios, 2011) lo cual influye directamente en la producción de las membranas de celulosa. Como se evidenció en la figura 13, se presenta una notoria diferencia en las membranas fermentadas en medio estándar (HS) y en las obtenidas de medios con mucílago de café (HSMC y MC), esta diferencia como se se reporta en el estudio realizado el 2013 por Rani, puede deberse a que la *Gluconoacetobacter xylinus* puede producir glucosa a partir de varios sustratos de carbono y, adicionalmente, tiene la capacidad de polimerizar de la glucosa a celulosa (Rani-Appaiah, 2013), por tanto, el hecho de realizar la fermentación en un medio con mayor cantidad de glucosa trae como consecuencia una mayor producción de CB y por ende un mayor espesor del hidrogel.

En cuanto al ensayo de impregnación de la CB (figura 20), los hidrogeles del medio estándar HS fueron los que mostraron una mayor capacidad de impregnación a diferencia de los medios que tenían mucílago de café para los tres aceites esenciales de orégano, caléndula y cúrcuma. De esta forma, se puede deducir que los aceites no tuvieron influencia en la capacidad de impregnación que tenían los hidrogeles, sino que, dicha capacidad está

relacionada a la estructura de la CB obtenida a los 5 y 7 días de fermentación, así como se muestra en el estudio realizado en 2020, donde se evidencia que la capacidad de impregnación de las películas de CB está dada por las diferentes disposiciones de las fibras de celulosa, así como al tamaño y volumen de los poros (Nagmetova et al., 2020).

En consecuencia, se puede decir que la CB es un polímero compuesto por una red reticulada de nanofibrillas y, que dependiendo de la disposición de estas fibras va a variar la porosidad y el área superficial de esta, que a su vez cambia en función de la cepa productora, la formulación del medio de cultivo, el tamaño del inóculo, el tiempo y las condiciones de fermentación (Corzo, et al.2021). Con base a esto, y sabiendo que tanto el tiempo como las condiciones del medio de fermentación varían (medio HS fue de 7 días y medios HSMC y MC fue de 5 días), se puede intuir que la porosidad de estas membranas no es la misma y que gracias la alta presencia de glucosa en el medio con mucílago de café, los hidrogeles de 5 días estaban más compactos y estables, lo que influye en la capacidad de impregnación como se vio en la investigación de 2019 (Junka et al., 2019).

En la figura 21, se evidencia igualmente, que los hidrogeles del medio HS tuvieron la mayor capacidad de liberación para los tres aceites, seguido de los del medio HSMC y MC. También cabe resaltar que, los hidrogeles de CB tienen una mayor capacidad de impregnación que de liberación, como se observó en la investigación de Junka, quien, se lo atribuye a la presencia del DMSO debido a la ligera solubilidad en medio acuoso de los aceites esenciales (Junka et al., 2019).

Finalmente, respecto al efecto citotóxico de los aceites esenciales, como se ve en la figura 22, la viabilidad celular tanto para el aceite de orégano, como el de caléndula y cúrcuma, no presentan una diferencia estadística significativa lo que indica que la implementación de estos aceites no afecta la actividad celular de los fibroblastos. Esto puede deberse, gracias a que el aceite de orégano posee componentes como el timol, del cual se ha visto que a ciertas concentraciones no genera daño celular (Hazem et al., 2017). De igual manera, el aceite de

caléndula posee compuestos como los triterpenos y flavonoides que contribuyen a la proliferación celular en fibroblastos (Madrid et al. 2010). En este sentido, se evidencia que los porcentajes de supervivencia celular están por encima del 50% para los tres aceites esenciales, lo que indica que no se genera daño a la actividad celular.

## Capítulo 6: Conclusiones y recomendaciones

Como se planteó desde un inicio, el objetivo de este proyecto de grado era determinar la viabilidad celular de hidrogeles de CB impregnados con aceites esenciales de caléndula, cúrcuma y orégano mediante la metodología propuesta en el capítulo 4, la cual consistía en obtener los hidrogeles de celulosa a partir de tres medios HS, HSMC y MC mediante fermentación, por la bacteria *Gluconacetobacter xylinus*, y realizar un proceso de impregnación y liberación, 24 y 48 horas respectivamente. En el desarrollo de esta actividad se encontró que las membranas de HS tuvieron la mayor capacidad de impregnación para los tres aceites esenciales, lo cual se puede relacionar al espesor que tenían estas membranas, siendo estas las de menor espesor, en comparación con los hidrogeles de HSMC y MC cuyo espesor fue mayor. De igual manera, en cuanto al proceso de liberación se evidenció el mismo comportamiento en las membranas, siendo las membranas de CB del medio HS las que presentaron mayor capacidad de liberación de los aceites esenciales en comparación con las membranas HSMC y MC. De igual manera como se planteó inicialmente el propósito de estas membranas impregnadas con aceites, es su potencial uso como apósitos, por lo que se hizo necesario evaluar los lixiviados del proceso de impregnación y liberación en fibroblastos de la línea celular MRC-5, y de esta forma corroborar que no las estuviera afectando ni limitando la actividad celular. En este contexto, en la prueba de citotoxicidad se demostró que la supervivencia celular estuvo por encima del 50% para los tres aceites esenciales, por lo cual se plantea la posibilidad de implementar a futuro hidrogeles de CB impregnados con aceites esenciales de orégano, caléndula y cúrcuma con potencial uso en apósitos para quemaduras

de segundo grado, teniendo en cuenta el comportamiento que tuvieron los hidrogeles en relación a la impregnación, liberación y la supervivencia celular que demostraron, lo cual es importante para el tratamiento de heridas y la cicatrización de estas.

Finalmente, como recomendación, se esperaría realizar estudios variando el tiempo de fermentación de las membranas de CB con el fin de encontrar la optimización de las membranas obtenidas, de igual manera para el estudio de capacidad de impregnación y liberación se recomendaría realizar a diferentes tiempos para poder evaluar la interacción de los hidrogeles en la presencia de los aceites esenciales, y por último, aumentar la cantidad de muestras con el fin de obtener la menor desviación en el grupo de datos estadísticos analizados. Asimismo, se sugiere caracterizar las membranas, cada una de manera independiente, para evaluar la cinética de impregnación y liberación y evaluar los lixiviados en patógenos, con el propósito de conocer el efecto que tienen estos en la desinfección y curación de heridas.

### Referencias

- Aceite de caléndula: estas son sus propiedades y beneficios. (2022). <https://www.semana.com/vida-moderna/articulo/aceite-de-calendula-estas-son-sus-propiedades-y-beneficios/202130/>
- Águila Gil, Bárbara, Menéndez Castillo, Rosa, González Roque, Claribel, & Fernández Fernández, David. (2000). Extracto acuoso de *Calendula officinalis*. Estudio preliminar de sus propiedades. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 5(1), 30-31.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962000000100008&lng=es&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962000000100008&lng=es&tlng=pt).
- Arcila-Lozano, Cynthia Cristina, Loarca-Piña, Guadalupe, Lecona-Urbe, Salvador, González de Mejía, Elvira. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 100-111.

[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222004000100015&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000100015&lng=es&tlng=es).

“Análisis bibliográficos de los estudios realizados a los componentes de la *Calendula officinalis* Y *Arnica montana* en el tratamiento dérmico”

<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/61511/1/BCIEQ-T-%200753%20G%c3%b3mez%20Perero%20Evelyn%20Patricia%3b%20Lazo%20Barriga%20Sof%c3%ada%20Michelle.PDF>

“Aplicación única de triconjugado versus el tratamiento convencional para quemaduras de segundo grado superficial en pacientes de 1 a 10 años atendidos en el Hospital Provincial General Latacuga”. (2015).

<http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/9448/1/Villamar%c3%adn%20Pe%c3%b1a%2c%20Juan%20Carlos.pdf>

Aplicación de Vendaje Neuromuscular en Paciente Quemado: Estudio de Una Caso. (2013).

<https://www.efisioterapia.net/articulos/aplicacion-vendaje-neuromuscular-paciente-quemado-estudio-caso>

Blumenthal, M.; Goldberg, A. y Brinckmann, J. 2000. (Eds.). *Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs*. Austin, TX: American Botanical Council; Newton, MA: Integrative Medicine Communications. <https://www.herbalgram.org/resources/expanded-commission-e/>

Borras Guevara, M. (2004). Desarrollo, implementación y evaluación de una nueva metodología para crecimiento celular tridimensional en submucosa intestinal (SIS).

<https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/21136/u245681.pdf?sequence=>

Carreño Pineda, L., Caicedo Mesa, L., & Martínez Riascos, C. (2012). Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Dialnet-TecnicasDeFermentacionYAplicacionesDeLaCelulosaBac-5015223.pdf>

Clavijo, Maria Alejandra, Gómez Camargo, Doris, Gómez Alegría, Claudio. (2007). Adipogénesis in vitro de células 3T3-L0000001. *Revista Med*, 15(2), 170-176.



[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-52562007000200004&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-52562007000200004&lng=en&tlng=es).

Composición Química del Aceite Esencial de Hojas de Orégano (*Origanum vulgare*) (2013)

[https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-07642013000400005](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642013000400005)

González, R., & Vistel, M. (n.d.). *Caracterización Fitoquímica de la Curcuma longa L. - SLD.CU.* (2014)

<http://scielo.sld.cu/pdf/ind/v27n1/ind01115.pdf>

Corzo Salinas, D. R., Sordelli, A., Martínez, L. A., Villoldo, G., Bernal, C., Pérez, M. S., Cerrutti, P., &

Foresti, M. L. (2021). Production of bacterial cellulose tubes for biomedical applications:

Analysis of the effect of fermentation time on selected properties. *International journal of biological macromolecules*, 189, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.011>

Cuantificación de la viabilidad celular mediante azul de tripano en la criopreservación de células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica. (2018).

<http://boletin.sets.es/index.php/secciones/colaboraciones/73-cuantificacion-de-la-viabilidad-celular-mediante-azul-de-tripano-en-la-criopreservacion-de-celulas-progenitoras-hematopoyeticas-de-sangre-periferica>

Desarrollo de apósitos liberadores de biocidas de origen natural para tratar heridas tópicas y evitar resistencias a antibióticos. Universidad de Zaragoza. (2020).

<https://www.unizar.es/noticias/desarrollan-apositos-liberadores-de-biocidas-de-origen-natural-para-tratar-heridas-topicas>

Desarrollo de la ingeniería conceptual para la producción de la pomada *Calendae* a base de extracto natural de caléndula. (2017).

<https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6369/1/6112820-2017-2-IQ.pdf>

Djilani A and Dicko A. The therapeutic benefits of essential oils. *Nutrition*. (2012) 155-178

<https://www.intechopen.com/chapters/29979>

- Elshafie, H., Armentano, M., Carmosino, M., Bufo, S., De Feo, V., & Camele, I. (2017). *Cytotoxic Activity of Origanum Vulgare L. on Hepatocellular Carcinoma cell Line HepG2 and Evaluation of its Biological Activity. Molecules, 22(9), 1435. doi:10.3390/molecules22091435*
- Enero, D. (2014). Celulosa en la piel. <https://revistapesquisa.fapesp.br/es/celulosa-en-la-piel/>
- Esteban-Vico, Juan Ramón, Villaverde-Doménech, Eloísa, Pérez del Caz, Dolores, Klenner-Muñoz, Cristhian, & Simón-Sanz, Eduardo. (2016). *Vendaje autoadherente en el tratamiento integral y rehabilitador de la mano quemada. Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana, 42(4), 347-353. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0376-78922016000400006&lng=es&tlng=es.*
- Fensham, M., Steenekamp, J., Jacobs, A., & Hamman, J. (2020). Artificial membranes in combination with selected natural oils for *in vitro* drug passive diffusion screening in Ussing type chamber apparatus applied to gastro-retentive systems. *Pharmaceutical development and technology, 25(3), 366–375. https://doi.org/10.1080/10837450.2019.1705484*
- Games H. E., Garcia S. S. (2020) Apósitos liberadores de fármacos. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.05.025>
- Gaviria-Castellanos, Jorge L, Gómez-Ortega, Viviana, & Guerrero-Serrano, Linda. (2018). Manejo de quemaduras faciales de segundo grado con membrana amniótica preservada en glicerol 85%. *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana, 44(4), 401-408. https://dx.doi.org/10.4321/s0376-78922018000400010*
- Historia de las hierbas aromáticas, especias y aceites esenciales. (2012). <http://labamerex.com/images/2012-Historia-de-las-hiervas-aromaticas-especias.pdf>
- Itokawa, H.; Shi, Q.; Akiyama, T.; Morris-Natschke, S.L.; Lee, K.H. Recent advances in the investigation of curcuminoids. *Chin. Med.* **2008**, *11*, 3.
- Jayaprakasha, G.K.; Jagan, L.; Rao, M.; Sakariah, K.K. Chemistry and biological activity of *Curcuma longa*. *Trend Food Sci. Technol.* **2005**, *16*, 533–548.

Jiménez Serrano, R., García Fernández, F., Jiménez Serrano, R., & García Fernández, F. (2018).

Manejo de quemaduras de primer y segundo grado en atención primaria.

[https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1134-928X2018000100045](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1134-928X2018000100045)

Junka A, Żywicka A, Chodaczek G, Dziadas M, Czajkowska J, Duda-Madej A, Bartoszewicz M, Mikołajewicz K, Krasowski G, Szymczyk P, Fijałkowski K. Potential of Biocellulose Carrier Impregnated with Essential Oils to Fight Against Biofilms Formed on Hydroxyapatite. *Sci Rep.* 2019 Feb 4;9(1):1256. doi: 10.1038/s41598-018-37628-x. PMID: 30718663; PMCID: PMC6362291.

Lambert, R. J., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91(3), 453–462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>

Las quemaduras, un problema de salud pública en Colombia. (2016).

[https://www.researchgate.net/publication/313914167\\_Las\\_quemaduras\\_un\\_problema\\_en\\_salud\\_publica\\_en\\_Colombia](https://www.researchgate.net/publication/313914167_Las_quemaduras_un_problema_en_salud_publica_en_Colombia)

Liakos, I., Rizzello, L., Hajiali, H., Brunetti, V., Carzino, R., Pompa, P. P., Athanassiou, A., & Mele, E., (2015). Fibrous wound dressings encapsulating essential oils as natural antimicrobial agents. *Journal of materials chemistry. B*, 3(8), 1583–1589. <https://doi.org/10.1039/c4tb01974a>

Los aceites esenciales. (2004). <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-los-aceites-esenciales-13064296>

Madrid MA, Mahecha LC, Oviedo VA, Chaves M, Roa NS, García DA, Moreno GC. Efecto de la *Calendula officinalis* en la proliferación del fibroblasto gingival humano. *Univ Odontol.* 2010 Jul-Dic; 29(63): 107-112.

Manual para la enseñanza práctica del ensayo MTT para evaluar la citotoxicidad de nanopartículas (2019)

[https://www.researchgate.net/publication/336348823\\_Manual\\_para\\_la\\_ensenanza\\_practica\\_del\\_ENSAYO\\_MTT\\_PARA\\_EVALUAR\\_LA\\_CITOTOXICIDAD\\_DE\\_NANOPARTICULAS](https://www.researchgate.net/publication/336348823_Manual_para_la_ensenanza_practica_del_ENSAYO_MTT_PARA_EVALUAR_LA_CITOTOXICIDAD_DE_NANOPARTICULAS)

Martínez-Correa, E., Osorio-Delgado, M. A., Henao-Tamayo, L. J., & Castro-Herazo, C. I.. (2020).

Clasificación Sistemática de Apósitos: Una Revisión Bibliográfica. *Revista mexicana de ingeniería biomédica*, 41(1), 5-28. <https://doi.org/10.17488/rmib.41.1.1>

Matthew J. Streitz. Manual MSD, Versión para profesionales. ¿Cómo desbridar y cubrir una quemadura? (2020). <https://www.msmanuals.com/es-co/professional/lesiones-y-envenenamientos/c%C3%B3mo-hacer-procedimientos-quir%C3%BArgicos-en-la-piel,-los-tejidos-blandos-y-menores/c%C3%B3mo-desbridar-y-cubrir-una-quemadura>

Miranda Altamarino A. (2020). Uso de apósitos en quemaduras. *Cir. plást. iberolatinoam.*-Vol. 46 - Supl. 1 - 2020 / Pag. S31-S38. <https://scielo.isciii.es/pdf/cpil/v46s1/1989-2055-cpil-46-s1-0031.pdf>

M. M. Elnashar, M. (2010). Review Article: Immobilized Molecules Using Biomaterials and Nanobiotechnology. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 01(01), 61–77. doi:10.4236/jbnb.2010.11008

Moya Rosa, Enrique J, Pérez Hera, Frank, & Marrero Pelaes, Niuris. (2001). Comportamiento de la sepsis generalizada en el quemado con la práctica de la exanguinotransfusión. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 5(Supl. 1). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-02552001000700001&lng=es&tng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552001000700001&lng=es&tng=es).

Nagmetova G, Berthold-Pluta A, Garbowska M, Kurmanbayev A, Stasiak-Róžańska L. Antibacterial Activity of Biocellulose with Oregano Essential Oil against *Cronobacter* Strains. *Polymers* (Basel). 2020 Jul 24;12(8):1647. doi: 10.3390/polym12081647. PMID: 32722062; PMCID: PMC7464138.

Osorio, M., Ortiz, I., Caro, G., Restrepo, L., Martínez, L., & Agudelo, C. et al. (2014). Vista de matrices nanocompuestas de alcohol de polivinilo/celulosa bacteriana para el crecimiento celular y la

regeneración de tejidos.

<https://revistas.udea.edu.co/index.php/materiales/article/view/19620/16678>

Pérez Albaladejo, E. (2022). Uso de líneas celulares como modelos in vitro para la evaluación de toxicidad y mecanismos de acción de contaminantes ambientales.

<https://www.tdx.cat/handle/10803/456812#page=31>

Poblano-Vázquez, L., Furrer-Franco, E., Zatarraán-Hernández, G., & Reyes-Alvarado, L. (2022). Uso de membrana de celulosa oxidada post-gingivectomía en hiperplasia gingival inducida por fenitoína. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=103819>

"Principio de las mejores prácticas: Exudado en las heridas y utilidad de los apósitos", *World Union of Wound Healing Societies*, (2007). <https://es.slideshare.net/lopezcasanova/exudado-en-las-heridas-y-utilidad-de-los-apositos>.

Propiedades terapéuticas de la caléndula. (2009).

<https://botplusweb.portalfarma.com/documentos/2009/2/6/37417.pdf>

Puerta Q., G.I.; Ríos A., S. Composición química del mucílago de café, según el tiempo de fermentación y refrigeración. *Cenicafé* 62 (2): 23-40. (2011).

<https://www.cenicafe.org/es/documents/2.pdf>

Quemaduras. (2018). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/burns>

Qué son los apósitos. (2021). <https://www.apositos.net/Que-son-los-apositos.php>

Rangel Gaspar H. (2005). Infección en quemaduras. <https://www.medigraphic.com/pdfs/cplast/cp-2005/cp052h.pdf>

Rani MU, Appaiah KA. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk. *J Food Sci Technol*. 2013 Aug;50(4):755-62. doi: 10.1007/s13197-011-0401-5. Epub 2011 May 28. PMID: 24425978; PMCID: PMC3671040.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3671040/>

Sarmiento Pérez, O. I. (2016). Evaluación de la Cinética de Extracción del Aceite Esencial de *Calendula officinalis* L. Mediante Hidrodestilación y Calentamiento Óhmico Asistido por

Hidrodestilación. Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD, Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingeniería.

<https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/11836/1026569480.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A (abril de 2018). "Sales de tetrazolio y productos de formazán en biología celular: evaluación de viabilidad, imágenes de fluorescencia y perspectivas de etiquetado" doi: 10.1016/j.acthis.2018.02.005

Taylor, R. A., & Leonard, M. C. (2011). Curcumin for inflammatory bowel disease: a review of human studies. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*, 16(2), 152–156.

Torres E. (2014) Estudio de la actividad antibacteriana del aceite esencial de los rizomas de *Curcuma longa* L. Revista Química Viva - Número 2. <https://www.redalyc.org/pdf/863/86331633006.pdf>

Trabajo de investigación para mejorar los procesos de recuperación de quemaduras. (2021). <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/55696/26183.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

“Utilización de la técnica de tinción de Rojo Neutro para la categorización de la condición de vivo-moribundo-muerto de *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo, 2000) (Copépoda: Caligidae) en bioensayos de sensibilidad a los antiparasitarios.” (2012). <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2012/bpmfpb275u/doc/bpmfpb275u.pdf>

Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales. (2009). <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v11n2/v11n2a06.pdf>

Wang, J., Tavakoli, J. y Tang, Y. (2019). Producción, propiedades y aplicaciones de celulosa bacteriana con diferentes métodos de cultivo: una revisión. *Polímeros de carbohidratos*. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.05.008

Witkin, J. M., & Li, X. (2013). Curcumin, an active constituent of the ancient medicinal herb *Curcuma longa* L.: some uses and the establishment and biological basis of medical efficacy. *CNS & neurological disorders drug targets*, 12(4), 487–497.

## Anexos

### Anexo 1

*Distribución de los aceites en la placa de 96 pozos para el proceso de impregnación*

	Orégano				Caléndula				Cúrcuma			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HS1	HSMC1	MC1		HS1	HSMC1	MC1		HS1	HSMC1	MC1	
B	HS2	HSMC2	MC2		HS2	HSMC2	MC2		HS2	HSMC2	MC2	
C	HS3	HSMC3	MC3		HS3	HSMC3	MC3		HS3	HSMC3	MC3	
D	HS4	HSMC4	MC4		HS4	HSMC4	MC4		HS4	HSMC4	MC4	
E												
F	B1HS1	B1HS2	B1HS3	B1HS4	B2HS1	B2HS2	B2HS3	B2HS4	B3HS1	B3HS2	B3HS3	B3HS4
G	B1HSMC1	B1HSMC2	B1HSMC3	B1HSMC4	B2HSMC1	B2HSMC2	B2HSMC3	B2HSMC4	B3HSMC1	B3HSMC2	B3HSMC3	B3HSMC4
H	B1MC1	B1MC2	B1MC3	B1MC4	B2MC1	B2MC2	B2MC3	B2MC4	B3MC1	B3MC2	B3MC3	B3MC4

*Nota.* Las iniciales HS, HSMC y MC corresponden al medio de cultivo en el que se prepararon los hidrogeles de CB. Se realizaron 4 réplicas por condición, para un total de 12 pozos por aceite. En la parte inferior del plato se encuentran los blancos para cada uno de los aceites esenciales y de la misma forma, 4 réplicas por condición.

### Anexo 2

*Distribución en el plato de 96 pozos con los lixiviados junto con los controles.*

	Orégano				Caléndula				Cúrcuma			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HS1	HSMC1	MC1		HS1	HSMC1	MC1		HS1	HSMC1	MC1	
B	HS2	HSMC2	MC2		HS2	HSMC2	MC2		HS2	HSMC2	MC2	
C	HS3	HSMC3	MC3		HS3	HSMC3	MC3		HS3	HSMC3	MC3	
D	HS4	HSMC4	MC4		HS4	HSMC4	MC4		HS4	HSMC4	MC4	
E	C1B1	C2B1	C3B1	C4B1	C5B1	C6B1	C7B1	C8B1	C9B1	C10B1	C11B1	C12B1
F	C1B2	C2B2	C3B2	C4B2	C5B2	C6B2	C7B2	C8B2	C9B2	C10B2	C11B2	C12B2
G	C1B3	C2B3	C3B3	C4B3	C5B3	C6B3	C7B3	C8B3	C9B3	C10B3	C11B3	C12B3
H	Cell 10%	Cell 10%	Cell 10%	Cell 10%	Cell 2%	Cell 2%	Cell 2%	Cell 2%	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO

*Nota.* En las casillas resaltadas con verde se añadieron los lixiviados del aceite de orégano, en las amarillas los lixiviados del aceite de caléndula y en las casillas naranjas los lixiviados del aceite de cúrcuma. En las filas E, F y G se añadieron los blancos y en la fila H se añadieron los

controles. Las células estaban en toda la placa, excepto en las casillas que se observan en blanco.