



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Optimización de soportes de Colágeno tipo I
como un sistema de entrega controlada para un
extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).**

Ronald Andrés Jiménez Cruz.

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia.
Bogotá, Colombia.
2013**

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

Ronald Andrés Jiménez Cruz.

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Farmacéuticas.

Directora:

Profesora Marta Raquel Fontanilla Duque. Ph.D.

Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos.

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia.
Bogotá, Colombia.
2013**

“La vida es aprendizaje, cuando dejes de aprender, mueres”.
Tom Clancy

*A mi esposa Diana, Sammy y Frodo, por
todo su amor, paciencia y comprensión.*

Agradecimientos

Quiero agradecer de forma muy especial a mis Padres, Cnelia y Arsenio, y a mis hermanos, Zulma y Jhonatan, por su apoyo incondicional.

A mi linda y talentosa esposa Diana Millán, por todo su amor, comprensión, sugerencias técnicas y su inagotable paciencia.

A mis dos terremotos Sammy y Frodo.

A la Universidad Nacional de Colombia, en especial a los profesores y administrativos del departamento de Farmacia de la facultad de Ciencias.

A los profesores Jaiver Rosas y José Manuel Lozano, por todas las oportunidades brindadas durante mi formación.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), en especial al grupo funcional de síntesis química y al grupo funcional biocatálisis, por todo su apoyo técnico y profesional, además de todo el entrenamiento previo que me permitió afrontar este desafío académico.

A todo el grupo de trabajo en ingeniería de tejidos del departamento de Farmacia, de forma especial a Diana Millán, Diana Nieto, María Elisa, Sergio, Socorrito, Matilde, Ana Milena y Leonardo, a los doctores Rosa Helena Bustos y Edward Suesca.

Un párrafo aparte y muy especial en los agradecimientos es para la profesora Marta Fontanilla, por adoptarme, creer en mí para desarrollar este proyecto, por transmitirme su experiencia de vida, por sus consejos y por todos sus esfuerzos para formarme como un profesional integro. Profe Marta muchas gracias.

A todos, muchas gracias.

Resumen

En Colombia existe la necesidad de desarrollar productos de ingeniería de tejidos de costo moderado que sean efectivos, seguros y estables para el tratamiento de pérdidas tejidos y órganos. El grupo de ingeniería de tejidos del departamento de Farmacia de la Universidad Nacional, ha desarrollado soportes de colágeno y tejidos artificiales que al ser usados como injerto en heridas de espesor parcial mejoran la regeneración de tejidos blandos. Una alternativa sencilla y menos costosa de tratamiento es asociar soportes de colágeno con un extracto de flores caléndula (*Calendula officinalis*), aceptado por el INVIMA como antioxidante y cicatrizante de uso tópico. En este trabajo se optimizaron los soportes de colágeno tipo I mediante la incorporación de micropartículas de gelatina-colágeno, modificación que aumento la capacidad de asociación con el extracto de *C. officinalis* de los soportes, mejoro la resistencia a la degradación enzimática y en estudios de liberación *in vitro* modifíco el mecanismo de liberación de metabolitos secundarios que componen el extracto de *C. officinalis*.

Palabras clave: Colágeno tipo I, Soportes, *Calendula officinalis*, micropartículas, Ingeniería de tejidos.

Abstract

Aiming to develop acellular collagen type I matrices with an improved biological performance in the treatment of skin wounds, scaffolds were modified with microspheres and the subsequent loading of an extract of marigold *Calendula officinalis* -flower rich in polyphenols. These compounds have shown anti-inflammatory and antioxidant activities that are beneficial in wound healing processes. Microspheres made of poly(vinyl alcohol), gelatin and mixtures of poly(vinyl alcohol)-collagen and gelatin-collagen were produced by a water-in-oil emulsion/cross-linking method. Their morphology, size distribution, swelling rate and ability to associate with the extract were characterized. Gelatin-collagen microspheres swelled and showed the highest capacity to load the extract and thus, they were chosen to be incorporated into collagen suspensions at three growing concentrations (1.0 mg/mL, 2.5 mg/mL and 5.0 mg/mL) to manufacture collagen scaffolds including gelatin-collagen microspheres. Resistance to enzymatic degradation, ability to associate with the extract, and release profile of the three gelatin-collagen microsphere-scaffold prototypes were assessed, including scaffolds without microspheres as controls. Data indicated that gelatin-collagen microspheres increased the scaffolds' resistance to enzymatic degradation in vitro, as well as their association with the flower extract. Finally, the microspheres prolonged the release of the extract supporting their potential application in therapy of skin wounds.

Keywords: Collagen I scaffolds; polymeric microspheres; *Calendula officinalis* extract; polyphenols; controlled release.

Contenido

Agradecimientos	VII
Resumen	IX
Abstract	X
Capítulo 1. Generalidades.	5
La piel.....	5
Matriz extracelular.....	6
Funciones de la piel.....	7
Lesiones de la piel.....	8
Reparación de heridas de piel.....	9
Ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.....	10
Soportes.....	11
Células.....	12
Nutrientes y factores de crecimiento.....	12
Ingeniería de tejidos y sustitutos de piel.....	13
Sustitutos de piel.....	13
Biomateriales en ingeniería de tejidos.....	14
Colágeno.....	14
Sistemas de liberación controlada.....	16
Colágeno como sistema de entrega.....	19
Capítulo 2. Antecedentes, problema de investigación, hipótesis y objetivos.	21
Antecedentes.....	21
Problema de investigación.....	23
Hipótesis de trabajo.....	23
Objetivos.....	23
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos.....	23
Capítulo 3. Estandarización de una metodología para la elaboración de micropartículas a partir de colágeno bovino tipo I (Objetivo específico 1).	25
Métodos.....	25
Obtención de hidrogeles de colágeno I.....	25
Elaboración de micropartículas de colágeno I.....	25
Métodos alternativos de elaboración de micropartículas de colágeno tipo I.....	26
Carga de las micropartículas con extracto de caléndula.....	28
Determinación de la capacidad de carga de las micropartículas.....	28
Cuantificación de compuestos polifenólicos.....	28
Cuantificación de compuestos flavonoides.....	28
Distribución de tamaño de partícula.....	29
Microscopia electrónica (SEM).....	29
Resultados y discusión de resultados.....	30
Capítulo 4. Elaboración de un sistema bifásico microparticulado-soporte de colágeno tipo I. (Objetivo específico 2)	40
Metodología.....	40

Obtención de hidrogeles de colágeno I.	40
Preparación de soportes de colágeno I con micropartículas.	40
Análisis por microscopia electrónica de barrido (SEM) de los soportes con las micropartículas.	41
Ensayo de estabilidad enzimática.	41
Resultados y discusión de resultados.	43
Capítulo 5. Asociación de un extracto comercial hidroglicólico de caléndula (<i>Calendula officinalis</i>) al sistema bifásico micropartículas-soporte de colágeno (Objetivo específico 3).	47
Metodología.	47
Asociación de un extracto comercial hidroglicólico de <i>Caléndula officinalis</i> al sistema bifásico micropartículas-soporte de colágeno.	47
Determinación de la capacidad de carga.	47
Cuantificación de compuestos polifenólicos.	47
Cuantificación de flavonoides totales.	48
Resultados y discusión de resultados.	49
Capítulo 6. Evaluación <i>in vitro</i> de la liberación de metabolitos secundarios del extracto de caléndula a partir del sistema bifásico Micropartículas-soporte de colágeno (Objetivo específico 4).	52
Metodología.	52
Ensayo de liberación <i>in vitro</i>	52
De cada uno de los soportes (S1, S2, S3, y S4), se colocó un fragmento de 1 cm x 1 cm por pozo (Cajas de poliestireno de 12 pozos). A cada pozo se le adicionaron 2 mL de una solución buffer de fosfatos 0,02M (pH 7.4) o una solución buffer de acetatos 0,02M (5.2). Las cajas se incubaron (37°C o 32°C) con agitación A 80 rpm en un oscilador horizontal. Cada 24h, durante 15 días, los sobrenadantes fueron retirados, remplazados por 2 mL de solución buffer fresca y congelados a -20oC. En el momento del análisis, las muestras se descongelaron y analizaron para cuantificar compuestos polifenólicos.	52
Cuantificación de compuestos polifenólicos.	52
Resultados y discusión de resultados.	53
Conclusiones finales.	59
Recomendaciones.	60
Referencias.	61

Capítulo 1. Generalidades.

La piel.

Por su peso y área superficial es el órgano más extenso del cuerpo humano, ya que representa aproximadamente el 16% del peso corporal [1] y tiene una área superficial aproximada de 1.5-2.0 m² [2]. Está constituida por dos capas, la epidermis y la dermis.

La epidermis, es un epitelio estratificado escamoso terminalmente diferenciado. El mayor tipo celular presente en esta capa son los queratinocitos [1], los cuales sintetizan queratina, una proteína que se polimeriza gracias a la formación de enlaces disulfuro entre los monómeros que la conforman. Los queratinocitos también producen citoquinas, en respuesta a daños en la integridad de la piel [1]. La epidermis es un tejido avascular que se nutre gracias a la difusión de nutrientes que se originan en la dermis. Dependiendo de la región del cuerpo en que se encuentre, se divide en cuatro o cinco capas o estratos: Basal, espinoso, granuloso, translucido (solo en las plantas de las manos y los pies) y córneo[3].

Estrato basal: Es una monocapa de queratinocitos indiferenciados o células basales, que al dividirse asimétricamente mantienen la población celular del estrato y producen los queratinocitos que durante su diferenciación, migran hacia los estratos superiores. Esta capa se forma sobre la membrana basal y se encuentra adherida a esta a través de uniones hemidesmosómicas. Aunque en mayor porcentaje está conformada por células basales, es posible encontrar un porcentaje pequeño (5-10%) de melanocitos [1].

Estrato espinoso: Es la zona del epitelio en la que se localizan las células que migran del estrato basal hacia el estrato superior. Está conformado por varias capas de células que se unen a través de uniones desmosomales y otras uniones celulares, para formar una estructura de barrera. Los queratinocitos de este estrato se caracterizan por poseer núcleo, por su morfología poliédrica y porque comienzan a producir cuerpos lamelares cargados de lípidos. En esta capa, también se pueden encontrar células de Langerhans [3].

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

Estrato granuloso: Está constituido por queratinocitos anucleados que contienen en su citoplasma gránulos de queratohialina y cuerpos lamelares que almacenan lípidos. Estos cuerpos son excitados para que liberen en el espacio extracelular lípidos que forman una barrera hidrofóbica protectora, paralela a la superficie celular, que conecta este estrato con los queratinocitos del estrato córneo [1].

Estrato córneo: Compuesta por varias capas celulares, es la zona más externa de la epidermis. Su grosor depende de la región del cuerpo en que se localiza, siendo más grueso en las palmas de las manos y los pies. Las células que la conforman se denominan corneocitos, estado final de diferenciación de los queratinocitos, los cuales se unen entre sí por corneodesmosomas. Los corneocitos exhiben morfología aplanada y una envoltura proteíca llena de queratina; forman filamentos alineados, que constituyen macrofibras entre las que se apilan capas de lípidos. Gracias a esta composición y disposición, el estrato corneo ejerce la mayoría de funciones de barrera de la epidermis [1].

La dermis, localizada entre la epidermis y el tejido adiposo subdérmico, protege al cuerpo de daños mecánicos y sirve como sustrato y soporte de la epidermis. Varía ampliamente de grosor (1-5mm) y contiene dos estructuras especializadas: la dermis papilar y la dermis reticular. Los fibroblastos son las células más abundantes; son responsables de la producción y el mantenimiento de los elementos estructurales de la dermis que conforman la matriz extracelular (MEC): Colágeno, elastina, proteoglicanos y glicosaminoglicanos (GAG's) [2]. Las proteínas de la familia del colágeno, proporcionan la resistencia a la tensión mientras que las propiedades elásticas de la piel y su comportamiento anisotrópico se deben principalmente a la orientación de las fibras de elastina [1].

Matriz extracelular.

La matriz extracelular (MEC), confiere a los tejidos sus propiedades mecánicas y bioquímicas específicas. Representa un arreglo complejo de familias de proteínas que determinan su integridad estructural y funcional [4]. La organización supramolecular de elementos fibrilares, de redes microfibrilares y la presencia de proteínas solubles, agua

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

y otros elementos definen las características biofísicas de la MEC, las cuales varían considerablemente entre en los diferentes tipos de tejido conectivo [4]. Las células residentes son las responsables de su biosíntesis y mantenimiento; al mismo tiempo, la MEC influye en la función celular y en las interacciones matriz-célula, las cuales son mediadas por receptores celulares y por epitópes de unión celular como la secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD). Los componentes de la MEC intervienen en los procesos de migración, proliferación, adhesión y diferenciación celular; además, modulan el recambio de los tejidos, la vascularización, la reparación y la regeneración [4]. Por sus características, la MEC juega un papel importante en el almacenamiento, liberación y actividad de un amplio rango de factores biológicos, iones y agua [5].

Funciones de la piel

La piel es una barrera física y mecánica que protege al organismo de los agentes físicos, químicos y biológicos provenientes del ambiente. Impermeabiliza al cuerpo previniendo su deshidratación, regula la temperatura corporal y es el órgano sensor más importante [1]. Por su función de barrera hace parte de la inmunidad innata; contiene células presentadoras de antígeno (células de Langerhans y macrófagos), y en ella se producen péptidos antimicrobianos como las defencinas y las catelicidinas [1].

La piel protege al organismo de la radiación ultravioleta (UV), cuyo espectro está dividido en UVA (315-400 nm), UVB (290-315 nm) y UVC (290-200 nm)[1]. La radiación UVA no causa quemaduras en la piel, pero es responsable del proceso de envejecimiento (daño actínico) y aunque no daña directamente al DNA, genera radicales libres y otras especies reactivas que pueden afectarlo [1]. La radiación UVB es responsable de quemaduras por exposición solar y de daños del DNA, causados por la formación de dímeros de pirimidina y rompimientos de la doble hélices. Por lo anterior, es considerada como agente inductor de cáncer de piel [1]. Aunque la radiación UVC también daña directamente al DNA y es carcinogénica, es absorbida por la capa de ozono [1].

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

La función protectora de la piel contra las radiaciones UV, se debe principalmente a que el estrato córneo la refleja, reduciendo la dosis de radiación efectiva. La exposición a la radiación aumenta la actividad de los melanocitos, el número de los melanosomas producidos y la rata de transferencia de melanina a los queratinocitos epidermales disminuyendo la cantidad de radiación absorbida por las moléculas de ADN [1]. La **Figura 1.1**, resume sus principales funciones de la piel.



Figura 1.1. Cuadro-resumen de las principales funciones de la piel.
Tomado y modificado de la referencia [6].

Lesiones de la piel.

Son definidas como la pérdida de continuidad estructural de la piel, que conlleva a la pérdida parcial o total de las funciones de este órgano [7]. Las pérdidas de continuidad o heridas de la piel, pueden ocurrir como parte de un proceso patológico (*nevus* congénitos gigantes o fascitis necrosante) o tener una etiología accidental o intencional (quemaduras y traumas) [8]. Esta pérdida de la estructura y funcionalidad de la piel, puede tener como consecuencias, además del riesgo de muerte, alteraciones de la calidad de vida de los pacientes y de sus familiares [7].

Reparación de heridas de piel.

El proceso de reparación es un mecanismo de sobrevivencia, que se activa inmediatamente después de que ocurre la lesión [9, 10]. Normalmente involucra una serie de interacciones complejas y dinámicas entre múltiples tipos de células, citoquinas, mediadores y la matriz extracelular, que resulta en la restauración de la continuidad anatómica y funcional de la piel [7, 8]. Está constituido por cuatro fases que se sobreponen en el tiempo (hemostasis, inflamación, proliferación y remodelamiento), las cuales dependen de un complejo y delicado equilibrio de eventos celulares y moleculares [7, 10].

Durante la hemostasis, ocurre el taponamiento y la vasoconstricción requeridas para detener la pérdida de sangre [9]. En los primeros segundos se produce la activación de las plaquetas que liberan citoquinas, mediadores pro-inflamatorios y moléculas pro-coagulantes que modulan la formación del coágulo de fibrina que detiene el sangrado y sirve de plataforma para la migración celular [7].

La fase inflamatoria es activada por el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y por el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Se caracteriza por el reclutamiento de plaquetas, macrófagos, neutrófilos y linfocitos hacia la herida para que limiten el daño y remuevan el tejido afectado y la matriz provisional de fibrina. La liberación de diferentes factores por parte de las células del lecho de la herida, facilita la ocurrencia de los procesos celulares de migración, adhesión, diferenciación y proliferación [11]. Los macrófagos reclutados expresan factor estimulante de colonias (CSF-1), TGF- β y PDGF, que actúan como quimioattractantes de los fibroblastos. Durante la fase de proliferación aumenta el número de macrófagos y fibroblastos para permitir la angiogénesis, la expresión de integrinas y la formación de tejido de granulación. Finalmente, en la fase de remodelamiento ocurre el recambio y la restructuración de la matriz extracelular, la deposición y entrecruzamiento de las fibras de colágeno [11].

Ingeniería de tejidos y medicina regenerativa

Cuando un órgano o tejido sufre un daño que altera sus características estructurales y/o funcionales, el tratamiento clínico tradicional incluye la cirugía reconstructiva o el trasplante de órganos o tejidos [12]. Los principales inconvenientes del trasplante de órganos y tejidos son la limitada identificación y reclutamiento de donadores [13], el uso de fármacos inmunosupresores que presentan efectos adversos y disminuyen la calidad de vida de los pacientes [12], y el riesgo de infección [14]. Según la Asociación Colombiana de Trasplantados, la lista de espera en noviembre del 2012 estaba conformada por 1223 personas, con una tasa de donación de 23.5 por millón de habitantes[15]. En nuestro país durante el año 2010 solo se obtuvo piel de 24 donantes, indicando una tasa de donación de 3.2 donantes por millón de habitantes[15].

La ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa surgieron en los últimos 26 años con el objetivo de restaurar, mantener y mejorar la función de órganos y tejidos lesionados o perdidos [16]. Son campos multidisciplinarios que incorporan aspectos de la ingeniería, la medicina y las ciencias de la vida, para el desarrollo de órganos y tejidos artificiales y de terapias que estimulen y promuevan el potencial regenerador del cuerpo [16]. Para desarrollar los tejidos y órganos artificiales que propone la ingeniería de tejidos, es necesario colocar en un biorreactor, los siguientes elementos: Células (pueden ser células madre o células diferenciadas provenientes del tejido de interés), un sustrato o soporte que aporte los componentes de la MEC y medios de cultivo con los factores necesarios para soportar el crecimiento de las células dentro de los soportes (**Figura 1.2**). Estos requerimientos han sido establecidos con base en los resultados de experimentación que muestran que las células interactúan con la MEC y requieren un soporte para adherirse, proliferar y expresar su funcionalidad [12, 17].

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

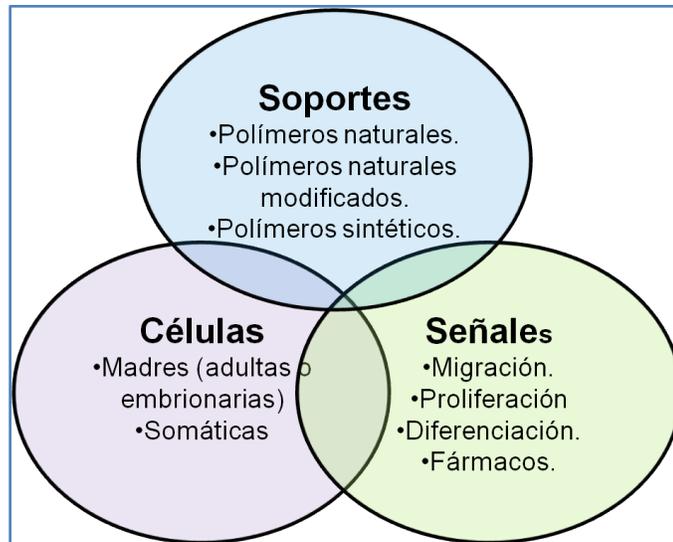


Figura 1.2. Elementos requeridos para el desarrollo de tejidos y órganos artificiales. Se presenta una figura tomada de Langer R [18], que resume características de los tres pilares que soportan a la ingeniería de tejidos.

Soportes

Son estructuras tridimensionales que actúan como análogos de la MEC, elaborados con materiales naturales o sintéticos, biocompatibles y biodegradables [17]. Las propiedades químicas de los soportes, su arquitectura, porosidad y tasa de degradación, determinan sus características mecánicas y biológicas; las cuales deben ser compatibles con las exhibidas por el tejido que se desea reemplazar [17]. Estas, deben facilitar los procesos celulares de adhesión, migración, proliferación y diferenciación; así como, la vascularización y el intercambio de nutrientes y desechos celulares [19].

Las características microestructurales del soporte más importantes, son: Su composición química, forma y tamaño de los poros, porosidad e interconectividad entre los poros [19]. A nivel micro y nano estructural, es importante la microporosidad ya que contribuye a aumentar el área superficial de contacto, característica que favorece la adsorción de moléculas bioactivas y la adhesión celular [19]. En la actualidad, existen procedimientos que permiten elaborar soportes con un macro y microambiente que favorezca la regeneración tisular; de ahí la importancia que tiene el diseño y el proceso de fabricación de los soportes [5]. La primera generación de soportes para uso en ingeniería de tejidos, se diseñó para proveer una estructura que permitiera el

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

crecimiento tridimensional de las células. Hoy en día, se acepta que la nueva generación de soportes sea diseñada para que proporcione un microambiente que mantenga y regule el comportamiento celular [5].

Células

En muchas aplicaciones de la ingeniería de tejidos, inducir la migración de células provenientes de los alrededores del tejido lesionado es insuficiente para lograr una regeneración funcional del nuevo tejido [20]. Por eso, en muchas ocasiones se incorporan células con el fin de que secreten moléculas bioactivas que induzcan quimiotaxis y otras respuestas celulares que estimulen la vascularización y el recambio del tejido artificial por tejido con las mismas características del que se quiere reemplazar [21]. Cuando se trata de órganos huecos completos y tejidos laminares con extensas áreas superficiales, el uso de soportes sembrados con células diferenciadas o células progenitoras, ofrece mejores posibilidades de regeneración tisular que los soportes sin células[22].

Nutrientes y factores de crecimiento

En las etapas iniciales, los órganos y tejidos artificiales son cultivados *in vitro*, en medios que contienen todos los requerimientos nutricionales de las células que los componen. De ahí, que en las etapas de estandarización de los procesos de elaboración de tejidos y órganos artificiales sea de vital importancia el medio apropiado que permita el crecimiento de las células y la formación de tejido.

Los factores secretados por las células sembradas en los soportes o asociados a estos por métodos como la micro-encapsulación, también son importantes porque señalizan autocrina y paracrinamente a las células del soporte y a las células del ambiente; modulando así, la inflamación, la angiogénesis, la diferenciación y los procesos remodeladores de la matriz asociados con la reparación, recambio y remodelación del tejido artificial [23].

Ingeniería de tejidos y sustitutos de piel

La pérdida de continuidad de la piel por quemaduras, traumas, enfermedades congénitas, recesión quirúrgica de tumores, fascitis necrotisante, etc., representa un gran desafío para las ciencias médicas [3, 24]. El tratamiento estándar es el autoinjerto [3], esta estrategia es efectiva si el daño no es extenso y existe suficiente área donante. El procedimiento es lento, doloroso y de poco éxito en pacientes con quemaduras o pérdidas de tejido que afectan superficies corporales mayores al 40% [3]. Otro inconvenientes de esta estrategia, es la morbilidad que se genera en el área donante, la cual generalmente se deja cicatrizar por segunda intención [24]. Los sustitutos de epidermis y dermis surgen como una alternativa para superar las limitaciones del autoinjerto [3, 24].

Sustitutos de piel

Los equivalentes dérmicos desarrollados por la ingeniería de tejidos son usados en clínica desde 1997 [25]. Constituyen un grupo heterogéneo de productos biológicos que pueden reemplazar, temporal o permanentemente, al tejido perdido [24]. Los sustitutos de piel pueden ser clasificados, en:

- Sintéticos, biosintéticos (combinación de células y elementos de la matriz extracelular) o biológicos (aloinjertos y xenoinjertos).
- Temporales o permanentes.
- Epidermales, dermales o compuestos (dermo-epidermal).

Las principales características de un sustituto de piel [3, 26], son:

- Poseer una relación costo-efectividad favorable.
- Prevenir la pérdida de agua.
- Ser resistente a las fuerzas de corte.
- Ser biocompatible (no generar reacciones inmunogénicas).
- Largo tiempo de vida y facilidad de almacenamiento.
- Facilidad de aplicación.

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

- Servir de barrera contra agentes infecciosos.

Actualmente, no hay sustitutos de piel que puedan simular completamente la complejidad, estructura y función de la piel [24]. Sin embargo, con los avances de la ingeniería de tejidos se han desarrollado productos que ya cuenta con aprobación para ser usados en pacientes o que se encuentran en etapas avanzadas de desarrollo [24].

Biomateriales en ingeniería de tejidos

Los biomateriales son materiales que por su biocompatibilidad pueden ser usados para tratar, aumentar o reemplazar un tejido, órgano o función del cuerpo [27]. En las ciencias médicas y odontológicas, se usa un amplio grupo de biomateriales basados en metales, cerámicas, polímeros de diferentes fuentes naturales o sintéticas[28]. Actualmente, la tendencia es buscar fuentes naturales de moléculas poliméricas (macromoléculas) como el quitosano, el ácido hialurónico y el colágeno [29]. Los materiales de origen biológico son biodegradables y tienen la capacidad de interactuar específicamente con las células. Sus desventajas incluyen, los largos procesos de aislamiento y purificación y algunas veces, una baja resistencia mecánica [29]. Entre los principales biomateriales poliméricos de origen natural, encontramos a las proteínas (e.g.: Colágeno, gelatina, fibrina y albúmina) y a los polisacáridos (e.g.: quitina, ácido hialurónico, celulosa y dextrano) [12].

Colágeno

El colágeno es el principal componente estructural de los vertebrados y en los mamíferos, es la proteína más abundante del cuerpo [30]. El nombre colágeno se aplica a una familia de proteínas que poseen por lo menos un dominio constituido por una hélice formada por tres cadenas peptídicas denominadas α que se identifican con números arábigos. Las tres cadenas pueden ser codificadas por un solo gen o por genes diferentes, formándose homotrímeros o heterotrímeros, respectivamente. Hasta el momento, se han identificado 28 tipos de colágeno, denominados con números romanos desde el I hasta el XXVIII, los cuales se agrupan en colágenos fibrilares,

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

colágenos de membrana basal, colágenos fibrilares de anclaje, colágenos formadores de redes hexagonales, colágenos asociados a tejidos fibrilares (FACIT), colágenos transmembranales y multiplexinas [31, 32].

El colágeno tipo I, es la proteína extracelular más abundante y mejor estudiada de los animales vertebrados. Representa más del 90% de la masa orgánica del cuerpo y es el principal colágeno de los tendones, ligamentos, córnea y tejidos conectivos intersticiales con la excepción del cartílago hialino, cerebro y humor vítreo. Es un heterotrímero ya que está constituido por dos cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$ [31]. El colágeno I es insoluble en solventes orgánicos y la fracción soluble en agua, representa solo una pequeña parte del total. Sin embargo, esta proteína se puede dispersar en soluciones de pH ácido [30, 31].

Las propiedades mecánicas de las fibras de colágeno I, lo hacen resistente al esfuerzo tensil [31] y su estructura triplehelicoidal lo hace estable al ataque de la mayoría de los agentes que degradan proteínas; requiriéndose digestión enzimática con colagenasas para su degradación [31]. Durante la preparación de soportes de colágeno se recurre al entrecruzamiento químico o físico, para estabilizarlo y modular su biodegradabilidad [30].

Por sus características, el colágeno I se utiliza en medicina, odontología y farmacia [29, 33, 34]. El colágeno I sirve elaborar diferentes dispositivos médicos como apósitos para heridas y quemaduras, osteogénicos y materiales de relleno para hueso, lentes oculares protectores en oftalmología, sustitutos tisulares de dermis, hueso, válvulas y vasos sanguíneos [35]. La proteína de origen bovino o porcino, es la más usada en aplicaciones clínicas y farmacéuticas; sin embargo, en cosmética se usa colágeno I aislado de peces, principalmente tiburones[28]. La **Tabla 1.1**, muestra las ventajas y desventajas de usar este biomaterial para beneficio humano.

Tabla 1.1 Ventajas y desventajas del colágeno I para uso en humanos[30].	
Ventajas	Desventajas
Las fuentes de colágeno son abundantes y existen procesos estandarizados de aislamiento y purificación	Proceso de purificación largo y costoso
Por ser conservada en mamíferos, exhibe muy baja inmunogenicidad	Variabilidad en los procesos de aislamiento y purificación, asociados con la naturaleza viva de las fuentes
Es biodegradable y biocompatible y estas propiedades pueden modularse con el entrecruzamiento	Necesidad de entrecruzamiento
Presenta alta resistencia a la tensión	Variabilidad en las características mecánicas del producto, dependiendo del proceso
Tiene propiedades hemostáticas	Susceptibilidad a degradación por contaminación con bacterias que producen colagenasas
Es compatible con otros polímeros y se puede funcionalizar	

Sistemas de liberación controlada

En las ciencias farmacéuticas se ha reportado el uso de colágeno I en el diseño de sistemas de liberación controlada con aplicación en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. Estos integran diferentes estrategias para permitir la entrega de factores de crecimiento, citoquinas y algunos fármacos en los órganos y sitios lesionados [36]. En la **Figura 1.3**, se muestran las principales clases de sistemas de liberación controlada utilizadas en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

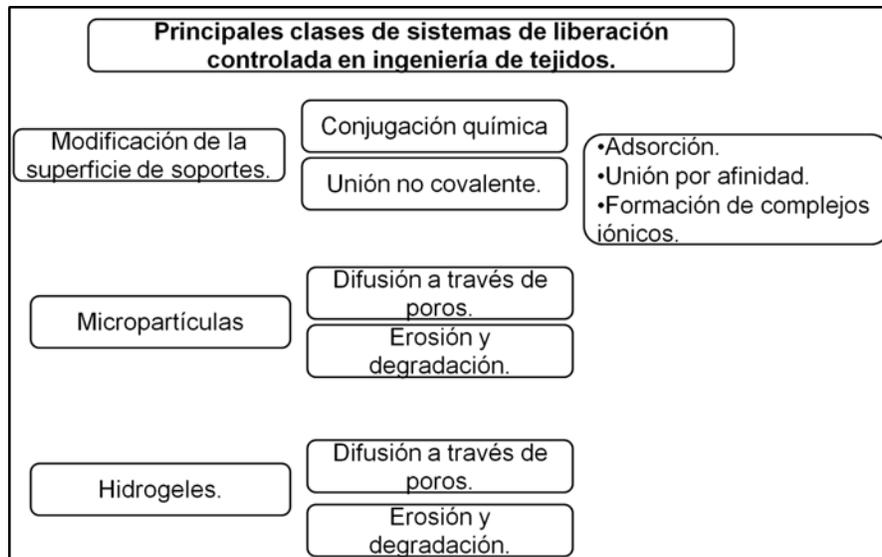


Figura 1.3. Principales clases de sistemas de liberación controlada en ingeniería de tejidos. Tomado y modificado de Santo, V.E., et al., [36].

En ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, los sistemas de liberación controlada son usados para modular la cinética de liberación de la molécula bioactiva, más que para potenciar su bioactividad. Otros usos importantes, son: estabilizar principios activos, inducir migración celular (quimiotaxis), localizar la entrega de principios activos en el tejido de interés y promover la diferenciación de células madre (**Figura 1.4.**) [22].



Figura 1.4. Utilidad de los sistemas de liberación controlada en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. Tomado con modificaciones de Santo, V.E., et al., [36].

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

La naturaleza fisicoquímica de los factores de crecimiento y las citoquinas les confiere baja biodisponibilidad y estabilidad en las diferentes biofases; por esta razón, es necesario el desarrollo de nuevas tecnologías para la liberación de factores de crecimiento en los tejidos y órganos lesionados [12]. Sin embargo, la administración en el sitio de estos compuestos en solución, generalmente no es efectiva debido a su rápida difusión y a su pobre estabilidad biológica (tiempos de vida media < 1 hora) [12]. Lograr una liberación localizada y controlada de factores biológicos, representa uno de los desafíos en la ingeniería de tejidos [5].

En ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, el mayor desafío en el desarrollo de sistemas de entrega es lograr que estos puedan proteger la integridad de las moléculas durante el tiempo necesario para que puedan ejercer su acción y controlar su entrega para que puedan alcanzar una concentración efectiva en el sitio de la reparación [5, 12]. En este contexto, es importante considerar que en los procesos de liberación de moléculas biactivas no solo su actividad biológica es relevante, sino que, ésta puede verse afectada por los diferentes mecanismos de liberación [29]. De ahí que los sistemas de liberación pueden diseñarse con distintos perfiles de liberación que incluyen cinéticas de orden cero, retardados, sostenidos y difusionales. La **Figura 5.1**, resume las principales estrategias de control temporal y espacial de la liberación de factores de crecimiento y citoquinas descritas en la literatura.

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

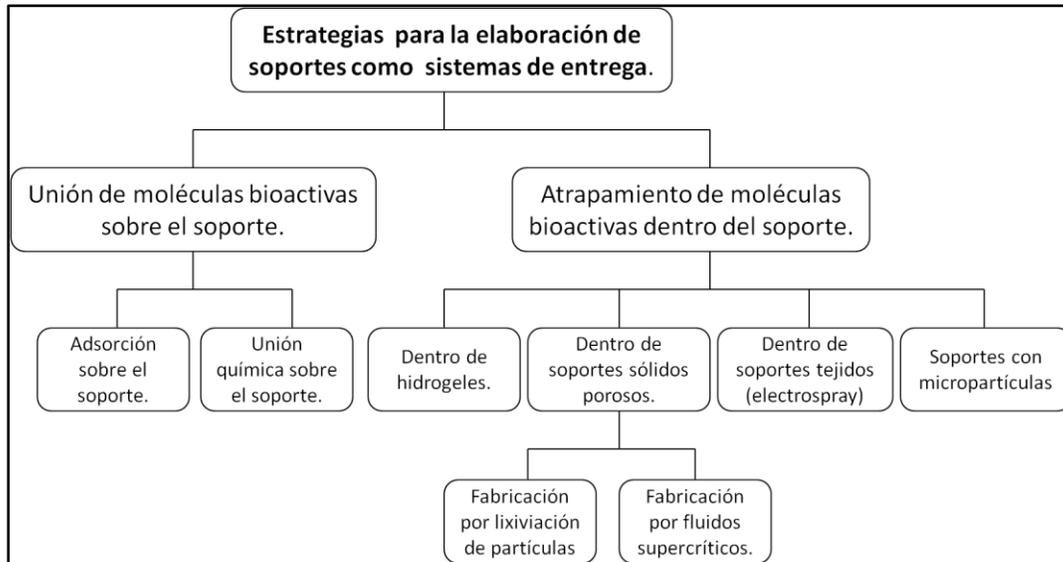


Figura. 1.5. Estrategias para la elaboración de sistemas de entrega utilizando soportes poliméricos en ingeniería de tejidos. Tomado y modificado de Sokolsky, M., et al., [37].

Colágeno como sistema de entrega

Dadas las diversas aplicaciones encontradas y con el fin de simplificar la lectura del documento, la **Figura 1.6**, resume las principales aplicaciones del colágeno como sistema de entrega de moléculas bioactivas [29], [30].

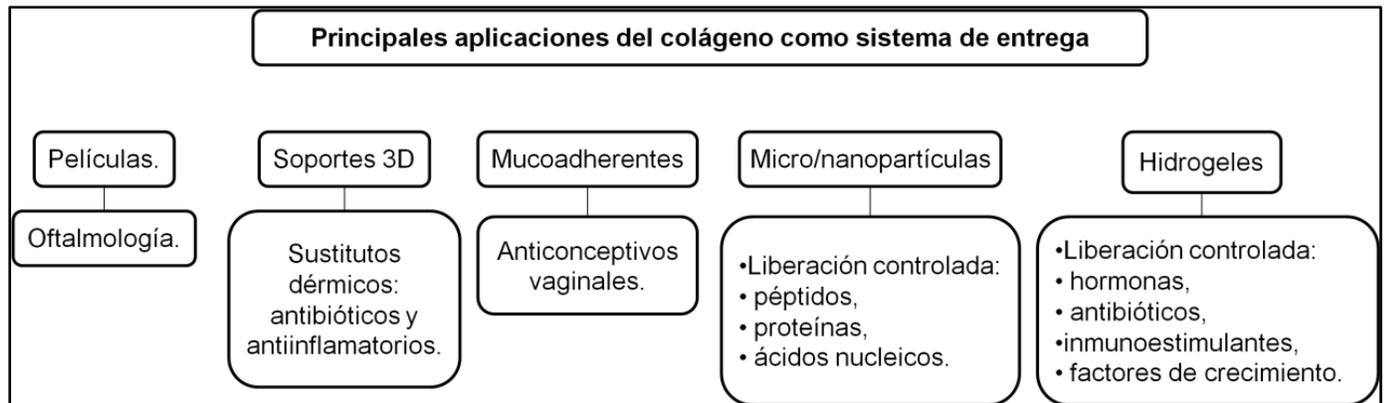


Figura 6.1. Principales aplicaciones del colágeno como sistema de entrega de moléculas bioactivas. Tomado y modificado de Sokolsky, M., et al., [37].

La versatilidad de los sistemas de entrega diseñados a partir de colágeno, es que se puede controlar la liberación ajustando la estructura de las matrices o por adición de otras proteínas como la elastina, fibronectina y glicoproteínas, o por la

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

combinación de otros polímeros, como colágeno/silicona, Colágeno/liposomas, colágeno/PLGA [30].

Capítulo 2. Antecedentes, problema de investigación, hipótesis y objetivos.

Antecedentes.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que anualmente en el mundo alrededor de 300.000 muertes ocurren por lesiones de la piel, principalmente quemaduras. También, que alrededor de 6.5 millones de personas sufren de úlceras crónicas causadas por etiologías como presiones prolongadas, éstasis venosas y diabetes mellitus [7].

El injerto de tejido propio (autoinjerto) es el tratamiento más usado cuando ocurre pérdida de continuidad de la piel. Sin embargo, este está restringido por la morbilidad creada en la zona donante y los escasos de tejido disponible para injerto. El injerto de tejido de otros seres humanos (aloinjerto), usado alternativamente, también está limitado por el rechazo inmunológico y el riesgo de infección. La tendencia en el Siglo XXI, es utilizar tratamientos que favorezcan la sustitución de la piel perdida por una idéntica funcional y morfológicamente (regeneración), evitando así procesos de cicatrización y contractura que deforman y limitan el funcionamiento normal del individuo afectado [38]. La comprensión gradual de los procesos biológicos implicados en la reparación de heridas, ha abierto la puerta para el desarrollo de soportes tridimensionales o tejidos artificiales que estimulan la regeneración de la zona lesionada, a través de sus componentes, características mecánicas y características microestructurales [17].

El grupo de trabajo en ingeniería de tejidos, del Departamento de Farmacia, de la Universidad Nacional de Colombia, fue creado en 1999 con el objetivo de establecer las tecnologías requeridas para la elaboración y escalamiento de la producción de tejidos blandos artificiales que puedan ser empleados como sustitutos de tejidos naturales en el tratamiento de heridas, o como modelos biológicos que permitan estudiar los mecanismos de reparación y regeneración observados al injertar tejido artificial en pérdidas de continuidad de tejidos.

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

En sus primeras investigaciones, nuestro grupo obtuvo un sustituto dérmico a partir de soportes de colágeno tipo I y fibroblastos aislados de dermis [39]. Empleando el mismo tipo de soportes y fibroblastos aislados de mucosa oral de conejo se elaboró un sustituto de tejido conectivo de mucosa oral, que mostró características estructurales y funcionales semejantes al tejido original [33, 34]. Actualmente el grupo estudia el efecto de la microestructura de soportes de colágeno en el proceso de reparación de heridas inducidas en mucosa oral de conejo [40].

Desde la antigüedad, las personas han usado plantas y preparaciones de plantas para acelerar el cierre de heridas de la piel [41], generalmente basados en la tradición, sin evidencia científica de su efectividad, composición y modo de acción [38].

En el año 2010, el grupo decidió potenciar la bioactividad de los soportes de colágeno I que ha desarrollado, y planteó evaluar la eficacia y eficiencia de la asociación física del extracto de flores de caléndula (*Calendula officinalis*), de reconocida actividad antiinflamatoria y aceptado por el INVIMA como antioxidante y cicatrizante por vía local [42]. En consecuencia, se formuló el proyecto “Evaluación de la reparación de heridas cutáneas con soportes de colágeno que contienen extracto de caléndula”, aprobado por el Programa Nacional de Biotecnología del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – Colciencias en la Convocatoria 521 del 2010.

En la primera etapa de desarrollo de este proyecto, se evaluaron los soportes de colágeno tipo I como un sistema de liberación de un extracto hidroglicólico de caléndula [43]. Los resultados, mostraron que los soportes asociados por inmersión con un extracto hidroglicólico de flores de caléndula, liberan aproximadamente el 60% de su carga inicial en un tiempo menor a 24 horas. Esto debido a las características microestructurales del soporte (tamaño de poro ~172.9 μm , interconectividad de poro y porosidad >90%) [40], que favorecen los fenómenos de difusión [43].

Problema de investigación.

Se debe modificar los soportes de colágeno I, para que liberen controladamente los metabolitos secundarios activos del extracto de caléndula durante más de 72 horas, tiempo en el que ocurre la fase inflamatoria del cierre de heridas de piel [8]. La modificación no debe alterar la microestructura del soporte (tamaño de poro, interconectividad de poro y porosidad), ya que estas características determinan su bioactividad [17, 19], la cual ya ha sido demostrada en trabajos previos del grupo [33, 34].

Hipótesis de trabajo.

La incorporación de micropartículas en los soportes de colágeno I desarrollados por nuestro grupo, resulta en la formación de un sistema bifásico que controla la liberación de los metabolitos secundarios que componen un extracto hidroglicólico de flores de caléndula.

Objetivos

Objetivo general.

Desarrollar prototipos de soportes de colágeno bovino tipo I para la liberación controlada de un extracto hidroglicólico de caléndula (*Calendula officinalis*).

Objetivos específicos.

1. Estandarizar una metodología para la elaboración de micropartículas a partir de colágeno bovino tipo I.
2. Elaborar un sistema bifásico de micropartículas-soporte de colágeno I.
3. Asociar un extracto comercial hidroglicólico de caléndula (*Calendula officinalis*) al sistema bifásico Micropartículas-soporte de colágeno.

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

4. Evaluar *in vitro* la liberación de metabolitos secundarios del extracto de caléndula a partir del sistema micropartículas-soporte de colágeno I.

Capítulo 3. Estandarización de una metodología para la elaboración de micropartículas a partir de colágeno bovino tipo I (Objetivo específico 1).

Métodos.

Obtención de hidrogeles de colágeno I.

Se obtuvieron hidrogeles de colágeno tipo I, siguiendo el protocolo desarrollado y estandarizado en nuestro grupo de trabajo [39] [40]. Fascia bovina obtenida como tejido de desecho en el Frigorífico San Mateo (Bogotá), se limpió para remover los tejidos adiposo y muscular contaminantes. El tejido desengrasado y limpio se cortó en pedazos pequeños que fueron sumergidos en ácido acético 0.5 M y mantenidos a 4°C durante 24 horas; a la suspensión resultante se le adicionó NaOH 2N, con el fin de precipitar el colágeno. El precipitado obtenido se lavó con agua desionizada y se resuspendió con ácido acético 0.5 M. Con este método, se obtuvieron hidrogeles de colágeno con una concentración final de 1% p/p (determinada mediante análisis gravimétrico).

Elaboración de micropartículas de colágeno I.

Para obtener micropartículas de colágeno I, inicialmente se siguió la metodología descrita por Rossler y colaboradores [44]. Una solución de colágeno al 2% (p/v) fue emulsificada con 250g de parafina líquida utilizando un homogenizador tipo rotor/estator (ultraturax®) a 5000 rpm por 10 min. A la emulsión obtenida se le adicionaron 2 mL de una solución de glutaraldehído (SIGMA) al 0.02%, agitando a 300 rpm; transcurridos 15 minutos, la reacción fue detenida adicionando 40 mL de de glicina 1M. Luego, la emulsión fue diluida en 50 mL de isopropanol y centrifugada (3000 g-Eppendorf 5804 / 5804 R, 5 minutos) El pellet de micropartículas resultante, fue resuspendido en 200 mL de una mezcla de agua: isopropanol (1:1) y centrifugado. Finalmente, las

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

micropartículas fueron lavadas tres veces con agua destilada, congeladas (-20°C) y liofilizadas por 48 horas (Virtis advantage 2.0).

Métodos alternativos de elaboración de micropartículas de colágeno tipo I.

Debido a la inestabilidad térmica de las micropartículas de colágeno I obtenidas siguiendo el procedimiento reportado por Rossler y colaboradores[44], en el presente trabajo fue necesario establecer y evaluar dos nuevos procedimientos: i) elaboración de micropartículas de colágeno I-alcohol polivinílico; ii) elaboración de micropartículas Gelatina-colágeno I.

Elaboración de micropartículas de colágeno I-alcohol polivinílico (PVA).

Usando diferentes relaciones peso a peso (25:75, 50:50 y 75:25), se mezcló colágeno I (2% p/v) con PVA al 1% p/p (MW 146,000-186,000, 99+% hidrolizado, SIGMA), usando agitación magnética (30 minutos, 40°C). A las mezclas resultantes se les adicionó glutaraldehído (SIGMA), hasta obtener una concentración final de 0.1% v/v y se agitó durante dos horas. Las suspensiones obtenidas se vertieron sobre parafina líquida (Quminet) [conteniendo 1% de trioleato de sorbitano (Span 85, SIGMA), en una relación de volúmenes de 1:5 (suspensión: parafina líquida)], y se homogenizaron (Ultraturrax®, 10 minutos, 2000 rpm). Después de ajustar el pH de las emulsiones resultantes en 1.5 ± 0.1 con ácido clorhídrico concentrado, se agitaron magnéticamente y se mantuvo su temperatura en $50^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ por 60 minutos. Las micropartículas fueron purificadas centrifugando (3000 g-Eppendorf 5804 / 5804 R, 30 minutos) y lavando con etanol al 96%. Después, estas fueron lavadas tres veces con agua destilada, congeladas (-20°C) y liofilizadas por 48 horas (Virtis advantage 2.0).

Elaboración de las micropartículas de gelatina.

Antes de proceder a elaborar las micropartículas de colágeno I-gelatina se obtuvieron micropartículas de gelatina que fueron utilizadas como control, en los ensayos de caracterización. Se siguió el procedimiento descrito por Kawai y colaboradores [45], con algunas modificaciones. Brevemente, se adicionaron lentamente 5 mL de una suspensión acuosa de gelatina (SIGMA Mw 40,000-50,000) al 20% (p/p) precalentada a 40°C por 30 minutos, sobre 40 mL de parafina líquida conteniendo 1% de trioleato de sorbitano (SIGMA, Span 85) precalentada a 40°C por 30 minutos. Para formar la emulsión agua/aceite (W/O) se homogenizó con un rotor estator (ultraturrax®), a 2000 rpm por 10 minutos. La emulsión se mantuvo con agitación magnética a 40°C y se adicionaron 40uL de glutaraldehído, 30 minutos después la reacción se detuvo adicionando 40 mL de una solución de glicina 1M. Las micropartículas se separaron por centrifugación (Eppendorf 5804 / 5804 R, 3000 g por 30 minutos), se lavaron con etanol al 96%, se congelaron a -20°C y se liofilizaron por 48 horas (Virtis advantage 2.0).

Elaboración de micropartículas de colágeno-gelatina.

A 2,5 g de una suspensión de colágeno al 1% (p/p), se le adicionaron 500 mg de gelatina (SIGMA Mw 40,000-50,000). La mezcla precalentada a 40°C por 30 minutos, fue adicionada lentamente sobre 40 mL de parafina líquida con 1% de trioleato de sorbitano (Span 85) manteniendo la temperatura de 40°C por 30 minutos. Para formar la emulsión W/O, se homogenizó con un rotor estator (ultraturrax®, 2000 rpm por 10 minutos). La emulsión se mantuvo con agitación magnética a 40°C, se adicionaron 40uL de glutaraldehído y se dejó transcurrir la reacción durante 30 minutos. Para detener la reacción, se adicionaron 40 mL de una solución de glicina 1M. Las micropartículas formadas se separaron por centrifugación (Eppendorf 5804 / 5804 R, 3000 g por 30 minutos), se lavaron con etanol al 96%, se congelaron (-20°C) y se liofilizaron por 48 horas (Virtis advantage 2.0).

Carga de las micropartículas con extracto de caléndula.

El extracto de flores de *Calendula officinalis* (Neyber, Bogotá, Colombia) fue cargado en las micropartículas (Colágeno I -PVA, gelatina, Gelatina-colágeno I), sumergiendo 100mg \pm 1mg de estas en 500 uL de extracto hidroglicólico, durante 12 horas. Las micropartículas cargadas se lavaron con 500 uL de agua destilada, se congelaron (-20°C) y liofilizaron por 48 horas (Virtis advantage 2.0). El ensayo fue realizado por triplicado.

Determinación de la capacidad de carga de las micropartículas.

Para establecer la cantidad de extracto captado, se tomaron 10 mg de micropartículas cargadas y se colocaron en 1mL de NaOH (1N por 1 hora). La suspensión resultante se centrifugó (Eppendorf 5804 / 5804 R, 3.000 gravedades por 5 minutos), y el sobrenadante se retiró para cuantificar la cantidad total de compuestos polifenólicos, flavonoides totales y compuestos glicósidos ya que estos son los constituyentes más importantes y abundantes del extracto [46].

Cuantificación de compuestos polifenólicos.

La cuantificación de compuestos polifenólicos se hizo con el ensayo Folin-Ciocalteu, modificando el procedimiento descrito por Singleton y colaboradores [47]. En este ensayo, se mezclaron 100 uL de muestra con 100 uL del reactivo Folin-Ciocalteu (SIGMA) y se adicionaron 50uL de carbonato de sodio. Después de incubar la mezcla a 25°C por 120 minutos, se midió su absorbancia a 725 nm (TRIAD Multimode Reader) y los valores medidos fueron interpolados en una curva de calibración elaborada con los valores de absorbancia de soluciones de ácido gálico (SIGMA) de concentraciones conocidas.

Cuantificación de compuestos flavonoides.

El contenido total de flavonoides se determinó modificando una metodología descrita por Moreno M.I. [48]. Brevemente, 100uL de muestra se mezclaron con 10 uL de

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

cloruro de aluminio (SIGMA) al 10% y 10 uL de acetato de potasio. Después de 30 minutos de reacción a temperatura ambiente, se hicieron las lecturas de la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 415 nm (TRIAD Multimode Reader). En este ensayo se usó quercitina (SIGMA) como estándar para la elaboración de la curva de calibración.

Distribución de tamaño de partícula.

Imágenes de las micropartículas obtenidas fueron tomadas con la misma magnificación, usando un microscopio Nikon® H550L, conectado a una cámara digital Nikon®. Los tamaños de las micropartículas fueron determinados mediante un analizador de imágenes (Image J®). Al menos 200 micropartículas por tratamiento fueron analizadas.

Microscopia electrónica (SEM).

La metalización de las muestras se realizó en un sputter SDC-050 de la Marca Balzers, en condiciones de prevacío (<10⁻¹ torr) con argón como gas de ataque (plasma) sobre una placa (ánodo) de oro-paladio (8:2). La película se depositó sobre las muestras (cátodo) a corriente de descarga de +/- 50mA y su espesor típico fue de +/- 200 nm. La observación y análisis de muestras se realizó en un Microscopio Electrónico de Barrido FEI QUANTA 200, usando el programa de captura imágenes xT microscope control versión 2.01.

Resultados y discusión de resultados.

El propósito de este trabajo fue desarrollar un sistema de liberación controlada de los metabolitos secundarios (polifenoles, flavonoides y glicósidos) que componen un extracto hidroglicólico de flores de *Calendula officinalis*, partiendo de los soportes de colágeno tipo I desarrollados por el grupo de trabajo en ingeniería de tejidos. En el proceso se buscó mantener las características microestructurales de estos (porosidad, interconectividad entre los poros y tamaño de poro) [17, 49]; por esta razón, se diseñó un sistema bifásico compuesto por micropartículas poliméricas a base de colágeno I incluidas dentro de los soportes de colágeno I.

Los sistemas microparticulados han llamado la atención por su utilidad como transportadores de fármacos de bajo peso molecular, células y proteínas utilizadas en el diagnóstico y tratamiento de diferentes enfermedades [50]. Entre sus principales ventajas se encuentran la protección frente a la degradación de los principios activos transportados, la reducción de la frecuencia de administración y la reducción de los efectos adversos y secundarios relacionados con el tratamiento terapéutico [51]. La modulación de los procesos de liberación dependen de la naturaleza química del polímero, el peso molecular, el tamaño de partícula, la capacidad de carga y su morfología [51, 52].

El uso de sistemas particulados (micro y nano) en ingeniería de tejidos requiere que el polímero empleado en su elaboración, sea biocompatible y favorezca la adhesión celular [53]. Por esta razón, en la primera etapa de este proyecto se estandarizó una metodología para elaborar micropartículas de colágeno tipo I, biomaterial que por sus características (**Tabla 1.1**) favorece los procesos que se presentan durante el cierre de heridas de piel (migración, adhesión, diferenciación y proliferación celular) [54].

Se han reportado varias metodologías para la elaboración de micropartículas de colágeno [44, 55-57]. En este trabajo se escogió utilizar la reportada por Rossler y colaboradores [44], porque es la más citada en las bases de datos y porque las otras metodologías descritas se basan en modificaciones de este procedimiento. Esta metodología se fundamenta en la formación de una emulsión agua/aceite (W/O), en la

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

que la fase acuosa (W) está constituida por la suspensión de colágeno I (pH neutro) y la fase oleosa (O) está compuesta por parafina líquida y un agente tensoactivo de bajo balance hidrofílico-lipofílico (HLB). Para estabilizar las micropartículas, en este método se adiciona un agente entrecruzante, generalmente glutaraldehído. Las micropartículas son separadas por centrifugación o filtración y lavadas con etanol o acetona para retirar las trazas de parafina líquida. La gran desventaja de esta metodología es la baja estabilidad de las partículas formadas, debido a que el colágeno es una proteína con una estructura supramolecular fibrilar y no globular[4]; lo cual hace que al retirar el agua de la partícula (con un gradiente de etanol, secado por convección o liofilización) la estructura de la micropartícula colapsa [58], como se observa en la **Figura 3.1**.

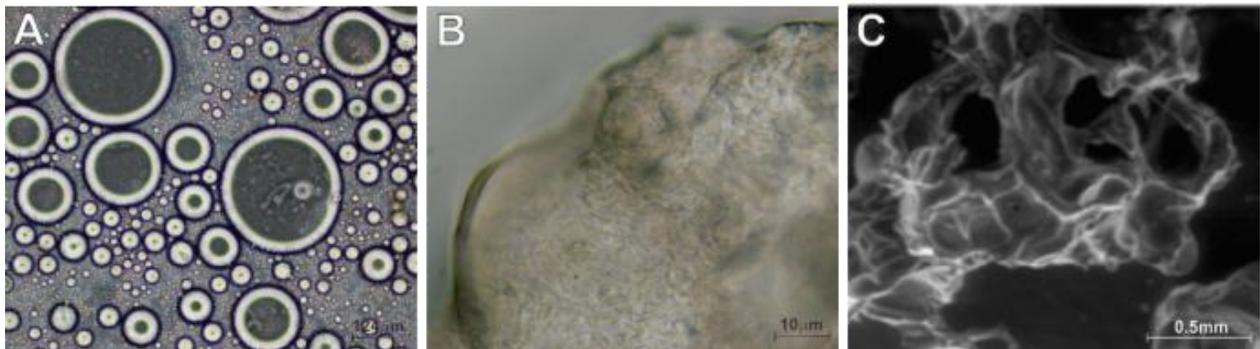


Figura 3.1. Micropartículas elaboradas en este trabajo, siguiendo la metodología de Rossler [44]. A. Microscopía de luz de micropartículas en suspensión; B. Microscopía de luz de micropartículas después del proceso de purificación; C. Micropartículas liofilizadas.

Nuestra aproximación se fundamentó en buscar una estrategia que permitiera a las moléculas de agua mantenerse en la estructura de la micropartícula, aún después del proceso de secado. La estrategia seleccionada, se basó en lograr que las moléculas del polímero que se encontraban en la suspensión integraran las moléculas de agua necesarias para formar un gel; estrategia conocida en la ciencia de los coloides, como una transición sol-gel [59]. Para aumentar la estabilidad, las cadenas poliméricas fueron entrecruzadas con glutaraldehído, obteniendo geles de tamaño micrométrico denominadas microgeles [60]. Los microgeles y nanogeles son considerados hidrogeles, en los que sus cadenas poliméricas están entrecruzadas químicamente. Estos sistemas tienen la capacidad de captar grandes cantidades de agua, son biocompatibles y sus propiedades mecánicas pueden ser modificadas según sus aplicaciones. Dentro de las ciencias farmacéuticas y en especial en el diseño y

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

desarrollo de sistemas de entrega, representan una alternativa interesante debido a su estabilidad biológica, funcionabilidad (bioconjugación) y la modulación de los perfiles de liberación [60].

A partir de esta aproximación, en nuestro laboratorio, se elaboraron microgeles de alcohol polivinílico (PVA)-colágeno, gelatina y gelatina-colágeno. El PVA es un homopolímero sintético, compuesto por monómeros hidrofílicos, biocompatibles y biodegradables [61], con excelentes propiedades mecánicas [62]. El PVA tiene una variedad de aplicaciones en el diseño de sistemas de entrega controlada, que incluyen: hidrogeles, matrices hidrofílicas, nanopartículas, agente de control de hinchamiento y emulsificante. Dentro de sus aplicaciones biomédicas y en ingeniería de tejidos se encuentran: elaboración de lentes de contacto, reparación de tendones, manufactura de válvulas cardiacas y de implantes de córnea [63]. Los hidrogeles de PVA tienen la tendencia a formar geles debido a su cristalinidad y capacidad de formar matrices entrecruzadas con agentes como el glutaraldehído y el di-isocianato de hexametileno [62]. Sus propiedades mecánicas, como el módulo de Young's y la resistencia a la tensión, permiten el diseño de diferentes tejidos suaves artificiales [63].

En este trabajo se hicieron mezclas con diferentes proporciones de PVA-colágeno utilizado glutaraldehído como agente entrecruzante. Los resultados de estos ensayos, descritos en la **Tabla 3.1**, evidencian transición sol-gel en los ensayos P2 y P5.

Tabla 3.1. Condiciones de formación de geles de PVA-colágeno.		
Ensayo	Condiciones	Resultado
P1	(Colágeno 1% p/p sin PVA) GTA (0.1%)	No se evidencia transición sol-gel
P2	(Colágeno 1%p/p + PVA 5%p/p) GTA (0.1%) Relación 1:1 v/v	Se evidencia transición sol-gel
P3	(Colágeno 1%p/p + PVA 5%p/p) GTA (0.1%) Relación 2:1 v/v	No se evidencia transición sol-gel
P4	(Colágeno 1%p/p + PVA 5%p/p) GTA (0.1%) Relación 3:2 v/v	No se evidencia transición sol-gel
P5	(Colágeno 1%p/p + PVA 5%p/p) GTA (0.1%) Relación 1:2 v/v	Se evidencia transición sol-gel

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

En la elaboración de los microgeles se decidió usar las condiciones empleadas en el ensayo P2, debido a que estas permitieron obtener geles de PVA-colágeno con la mayor concentración de colágeno. La **Figura 3.2**, muestra la formación de un gel PVA-colágeno (presencia de glutaraldehído y pH 1.5).

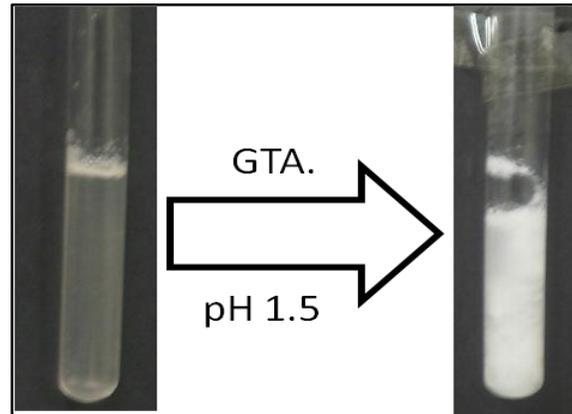


Figura 3.2. Formación de geles PVA-Colágeno.

La figura muestra una transición gel-sol bajo las condiciones, glutaraldehído (GTA) y pH 1.5, establecidas en el ensayo P2.

A pesar de haber obtenido las micropartículas de colágeno-PVA, decidimos hacer micropartículas con otros biomateriales debido a que el PVA por ser sintético es costoso. La gelatina es una proteína preparada a partir de la desnaturalización ácida o básica del colágeno aislado de fuentes bovina o porcina [64]. Por ser un material biodegradable y biocompatible, es ampliamente usada en la industria farmacéutica para la elaboración de sistemas de entrega de moléculas bioactivas a partir de micropartículas e hidrogeles [65]. La gelatina ha sido usada para elaborar micropartículas que se incorporan en soportes de colágeno I de utilidad en ingeniería de tejidos, para que modulen la liberación de moléculas bioactivas [65]. Sin embargo, en la revisión hecha hasta el momento no se encontraron referencias que reporten la elaboración de micropartículas hechas con la mezcla colágeno I-gelatina. Por esta razón, procedimos a elaborar micropartículas con esta mezcla. La **Tabla 3.2**, muestra las condiciones evaluadas con el fin de establecer la mezcla de colágeno y gelatina que forma gel. Solamente se observó formación de gel en los ensayos G4 y G5. Se seleccionaron las condiciones del ensayo G4 para elaborar los microgeles, debido a que incluyen el colágeno I en mayor concentración.

Tabla 3.2. Condiciones de formación de geles de colágeno-gelatina.

Ensayo	Condiciones	Resultado
G1	(Colágeno 1% p/p sin gelatina) GTA (0.1%)	No se evidencia transición sol-gel
G2	(Colágeno 1%p/p + Gelatina 20%p/p) GTA (0.1%) Relación 1:1 v/v	No se evidencia transición sol-gel
G3	(Colágeno 1%p/p + Gelatina 20%p/p) GTA (0.1%) Relación 1:5 v/v	No se evidencia transición sol-gel
G4	(Colágeno 1%p/p + Gelatina 20%p/p) GTA (0.1%) Relación 1:10 v/v	Se evidencia transición sol-gel
G5	(Colágeno 1%p/p + Gelatina 20%p/p) GTA (0.1%) Relación 1:20 v/v	Se evidencia transición sol-gel

Después de seleccionar las condiciones de formación del gel de las diferentes mezclas de polímeros que contienen colágeno, se elaboraron las micropartículas mediante la formación de una emulsión agua/aceite (W/O). En este método, la fase interna está constituida por la suspensión de la mezcla de polímeros y la fase externa por parafina líquida; igualmente, se adiciona una solución de glutaraldehído al 1% para estabilizar las micropartículas presentes en la emulsión. Las **Figuras 3.3 y 3.4**, muestran imágenes de las micropartículas obtenidas con microscopía de luz y microscopía electrónica (SEM), respectivamente.

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

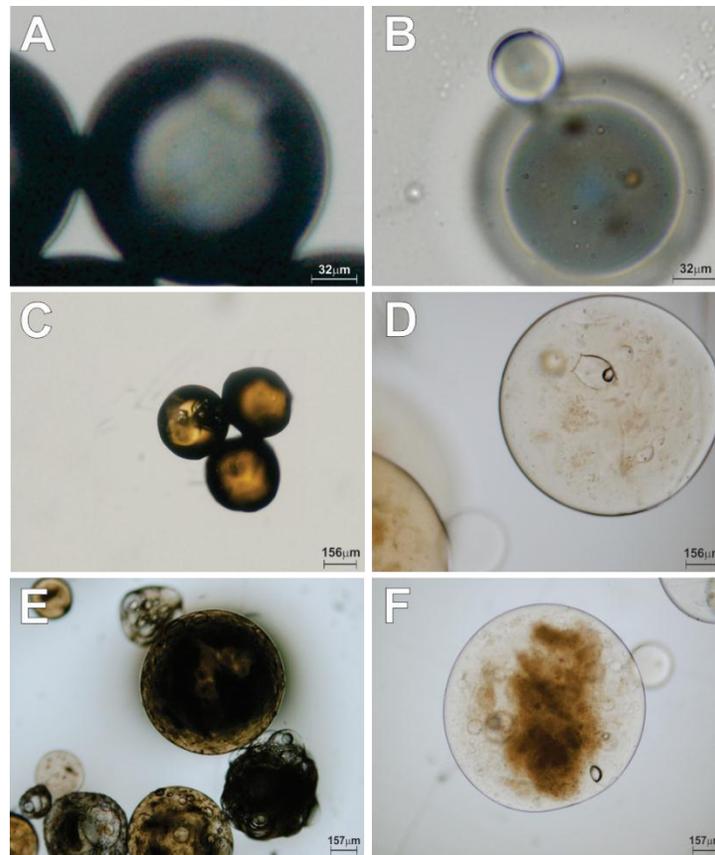


Figura 3.3. Imágenes obtenidas con microscopio de luz de las micropartículas elaborados. Se muestran fotografías representativas de las micropartículas de PVA-colágeno (A); micropartículas de PVA-colágeno en suspensión (pH 5.5) (B); micropartículas de gelatina (C); micropartículas de gelatina en suspensión (pH 5.5) (D); micropartículas de la mezcla colágeno-gelatina (E); micropartículas de la mezcla colágeno-gelatina en suspensión (pH 5.5) (F). Los valores de las barras están incluidos en cada fotografía.

El análisis de las imágenes fotográficas, mostró que el diámetro promedio y la distribución del tamaño de partícula se modifican al incorporar colágeno al PVA y a la gelatina. La **Tabla 3.3**, muestra el diámetro promedio de las micropartículas secas (liofilizados) y en suspensión acuosa (pH 5.5), además del cálculo de la relación entre estos dos diámetros (tasa de hinchamiento).

Tabla 3.3. Tamaño de partícula e hinchamiento.

Micropartícula	Diámetro partícula seca \pm SD (μm)	Diámetro partícula en suspensión \pm SD (μm)	Tasa de hinchamiento \pm SD (μm)
PVA	126.4 \pm 9.2	150.2 \pm 10.9	1.2 \pm 0.2
PVA-colágeno	157.0 \pm 25.1	210.7 \pm 12.6	1.4 \pm 0.1
Gelatina	283.5 \pm 28.3	981.2 \pm 97.1	3.5 \pm 0.3
Colágeno-gelatina	942.0 \pm 235.5	1099.3 \pm 274.8	1.2 \pm 0.3

La capacidad de hinchamiento, depende principalmente de la relajación de las cadenas del polímero. Las cadenas de gelatina al ser más cortas (Mw 40,000-50,000) que las del colágeno (PM= 300kDa) y PVA (Mw=146.000-186.000), permiten una mayor relajación de las cadenas y por consiguiente una tasa de hinchamiento mayor. También, se observó que los micropartículas de PVA presentan una menor dispersión en su diámetro (7.2%), que las partículas de gelatina (9.9%), PVA-colágeno (15.9%), y colágeno-gelatina (25%).

La **Figura 3.4**, muestra claramente que la incorporación de colágeno en las diferentes mezclas de polímeros ensayados, produce micropartículas con superficies rugosas, característica que puede favorecer los procesos de adhesión celular [66] y por tanto su versatilidad para ser usados en diferentes sistemas desarrollados por la ingeniería de tejidos.

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

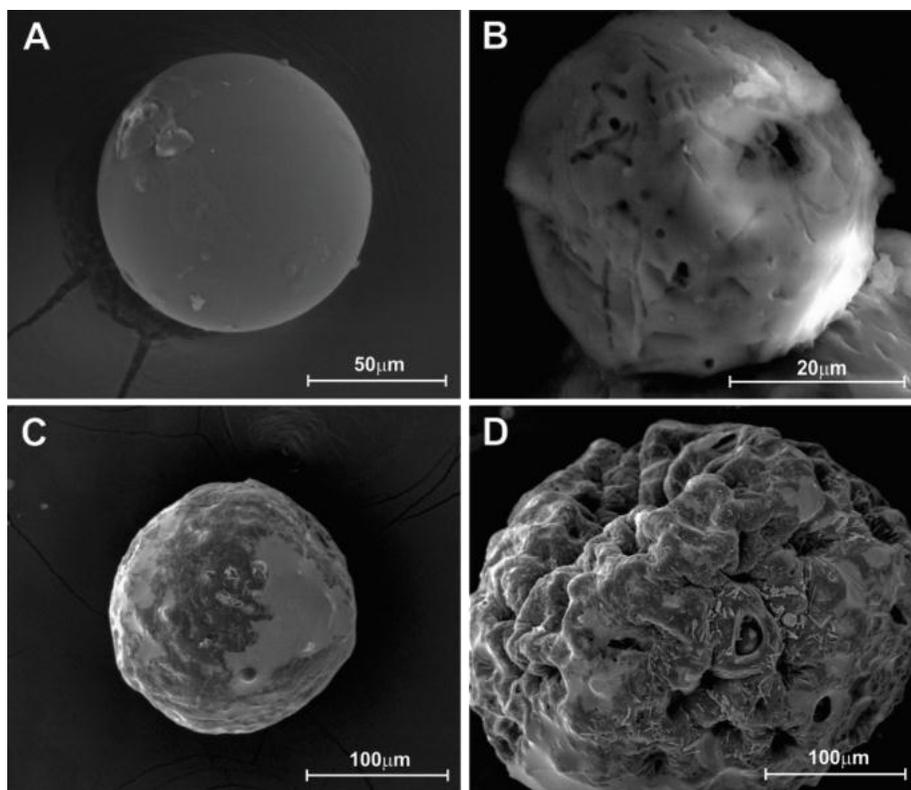


Figura. 3.4. Micrografías electrónicas de superficie (SEM) de los micropartículas elaborados. Micropartículas de PVA (A); micropartículas de PVA-colágeno (B); micropartículas de gelatina (C); Micropartículas de colágeno-gelatina (D). Los valores de las barras están incluidos en cada fotografía.

Para determinar la capacidad de carga de las micropartículas elaboradas con las diferentes mezclas de polímeros, se seleccionaron como marcadores analíticos a los metabolitos secundarios del extracto vegetal más abundantes y responsables de la actividad antioxidativa: Compuestos polifenólicos, flavonoides y compuestos glicosilados. En la **Figura 3.5** se observan los valores de concentración obtenidos para cada uno de ellos.

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

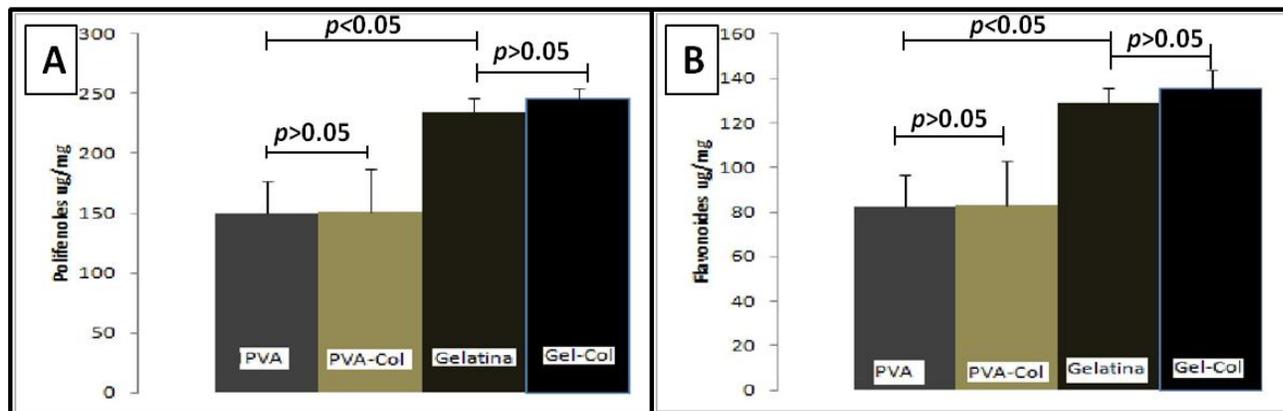


Figura 3.5. Determinación de la capacidad de carga de las micropartículas elaboradas. Se muestran las concentraciones de polifenoles (A) y flavonoides totales (B) obtenidas después de cargar los diferentes tipos de micropartículas. La escala representa μg de compuestos polifenólicos o flavonoides totales por cada mg de micropartículas.

Los datos obtenidos muestran que las micropartículas de gelatina y gelatina-colágeno exhiben mayor capacidad de carga que las micropartículas de PVA y PVA-colágeno ($p < 0.05$). También, que la inclusión del colágeno I no afecta la capacidad de carga ya que no hubo diferencias significativas entre las micropartículas que lo contenían y las que no: capacidad de carga de PVA vs PVA-colágeno ($p > 0.05$), capacidad de carga de gelatina vs gelatina-colágeno ($p > 0.05$).

Para establecer qué porcentaje de la carga total fue adsorbida en la superficie de las micropartículas, se realizaron lavados de micropartículas cargadas con agua destilada y en las aguas de lavado se cuantificaron los marcadores analíticos seleccionados. Los resultados obtenidos muestran que las micropartículas de PVA y PVA-colágeno adsorben un porcentaje mayor del extracto cargado que las micropartículas de gelatina y gelatina-colágeno (**Tabla 3.4**). El porcentaje de adsorción del extracto fue menor en estas últimas, indicando su mayor capacidad para captarlo. Esto puede ocurrir debido a la mayor capacidad de hinchamiento mostrada por las micropartículas de gelatina y las de gelatina-colágeno, lo cual comprueba que el proceso de hinchamiento influye en la capacidad de carga de estas [29].

Tabla 3.4. Cuantificación de los marcadores analíticos adsorbidos sobre la superficie de las micropartículas.

Micropartículas	% Polifenoles	%Flavonoides
PVA	70.1±3.5	67.4±3.7
PVA-colágeno	56.4±2.8	69.6±3.5
Gelatina	32.5±2.3	27.2±1.9
Colágeno-gelatina	38.9±3.3	40.3±3.2

El conjunto de los datos obtenidos durante la caracterización de las micropartículas, indica que los prototipos de sistemas particulados con mejores características para ser incluidos en los soportes de colágeno I y formar el sistema bifásico, son las micropartículas de gelatina y colágeno-gelatina. Estos dos materiales son polímeros naturales, biodegradables y biocompatibles, sin embargo, ya se han descrito soportes de colágeno I con micropartículas de gelatina como sistemas de entrega de moléculas bioactivas [30]. Por lo anterior, en este trabajo se escogió como sistema de carga del extracto de las flores de *C. officinalis* en los soportes de colágeno I, a las micropartículas de gelatina-colágeno.

Capítulo 4. Elaboración de un sistema bifásico microparticulado-soporte de colágeno tipo I. (Objetivo específico 2).

Metodología.

Obtención de hidrogeles de colágeno I.

Se obtuvieron hidrogeles de colágeno tipo I, siguiendo el protocolo desarrollado en nuestro grupo de trabajo [34, 39]. Fascia bovina obtenida como tejido de desecho en el Frigorífico San Mateo (Bogotá), se limpió para remover los tejidos adiposo y muscular contaminantes. El tejido desengrasado y limpio se cortó en pedazos pequeños que fueron sumergidos en ácido acético 0.5 M y mantenidos a 4°C durante 24 horas; a la suspensión resultante se le adicionó NaOH 2N, con el fin de precipitar el colágeno. El precipitado obtenido se lavó con agua desionizada y se resuspendió con ácido acético 0.5 M. Por este método se obtuvieron hidrogeles de colágeno con una concentración final de 5mg/mL. La concentración final fue determinada mediante análisis gravimétrico, según procedimiento descrito por Suesca [40].

Preparación de soportes de colágeno I con micropartículas.

Micropartículas de colágeno-gelatina fueron adicionados, sobre los hidrogeles de colágeno, en diferentes proporciones como se indica en la **Tabla 4.1**. Las mezclas se homogenizaron con agitación magnética por 1 hora, se sirvieron (30.0 g) en cajas de *petri* (polipropileno, 10 cm de diámetro), se desgasificaron al vacío (200 mTorr, 15 minutos), se congelaron a -20°C por 12 horas y se liofilizaron por 48 horas. Se entrecruzaron con una solución de glutaraldehído al 0.02% por 24 horas, se lavaron con agua destilada hasta que no se detectó agente entrecruzante con el test de 2,4-dinitrofenilhidrazina. Después de congelar a -20°C por 12 horas, los soportes con las micropartículas fueron liofilizados por 48 horas [40].

Tabla 4.1. Mezcla de micropartículas e hidrogel de colágeno

Ensayo	Mezcla
S1	Hidrogel de colágeno 5mg/mL
S2	Micropartículas de colágeno-gelatina 1mg/mL. Hidrogel de colágeno 5mg/mL
S3	Micropartículas de colágeno-gelatina 2.5mg/mL. Hidrogel de colágeno 5mg/mL
S4	Micropartículas de colágeno-gelatina 5mg/mL. Hidrogel de colágeno 5mg/mL
M	Micropartículas de colágeno-gelatina 5mg/mL

Análisis por microscopia electrónica de barrido (SEM) de los soportes con las micropartículas.

La metalización de las muestras se realizó en un sputter SDC-050 (Balzers), en condiciones de prevacío (<10⁻¹ torr) con argón como gas de ataque (plasma) sobre una placa (ánodo) de oro-paladio (8:2). La película se depositó sobre las muestras (cátodo) a corriente de descarga de +/- 50 mA y el espesor típico fue de +/- 200 nm. La observación y análisis de muestras se realizó en un microscopio electrónico de barrido (FEI QUANTA 200) y el programa con el cual se tomaron las micrografías fue el xT microscope control versión 2.01.

Ensayo de estabilidad enzimática.

Para evaluar la estabilidad de los soportes con las micropartículas incorporadas, se hizo una digestión con colagenasa manteniendo la muestra y reemplazando el sobrenadante a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas, de la siguiente manera: Fragmentos de los soportes (1cm x 1cm) obtenidos en los ensayos S1, S2, S3, y S4, después de entrecruzar con glutaraldehído, se colocaron en platos de cultivo de 12 pozos. Sobre cada soporte se adicionó 1mL de una solución de colágenasa I (SIGMA) [1ug/mL en PBS (pH 7.4)] y se incubó durante los tiempos establecidos, en un oscilador horizontal (80 rpm) a 37°C. En

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

cada uno de estos tiempos (6, 12, 24, 48 y 72 h), se retiró el sobrenadante de cada pozo y sobre los mismos soportes se adicionó colágenasa fresca (1mL). Debido a que la gelatina es un producto de la degradación del colágeno I, se estableció su concentración en los sobrenadantes muestreados con el método del ácido bicinconínico (BCA). Para esto, se mezclaron **78 uL de reactivo A** [$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.8 g) + NaOH (1.6g) + 1,6g Tartrato de sodio (dihidrato) en una cantidad de agua suficiente para completar 100mL y ajustar pH a 11.25 con 10M de NaOH], **75 uL de reactivo B** (4 g de ácido bicinconínico en 100 mL de agua) y **5uL de reactivo C** (4g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 10 mL de agua), con 100 uL de sobrenadante (muestra). Las mezclas se incubaron durante 1 hora (60°C), se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se determinó su absorbancia a una longitud de onda de 620 nm (TRIAD Multimode Reader). Como control se utilizó la cantidad equivalente de micropartículas que contiene un soporte elaborado bajo las condiciones S4.

Resultados y discusión de resultados.

En el interés de establecer estrategias que permitan diseñar y desarrollar soportes “inteligentes” con aplicaciones en ingeniería de tejidos que modulen la liberación de moléculas bioactivas, se ha explorado la incorporación de micropartículas cargadas con suspensiones de polímeros seguida de un proceso de liofilización [67]. El principal objetivo de estos esfuerzos es lograr la liberación controlada y eficiente de moléculas con actividad terapéutica, durante los procesos de remodelamiento y regeneración de los tejidos dañados [68]. Algunos ejemplos interesantes, son: La incorporación de micropartículas de ácido poliláctico-poliglicólico (PLGA) en soportes de gelatina [67] y de micropartículas de quitosano en soportes de colágeno/quitosano/glicoaminoglicanos [68], la liberación de factores de crecimiento (VEGF, PDGF, BMP-2 y FGF-2) a partir de micropartículas de PLGA incorporadas en soportes de colágeno II [69], y la incorporación de micropartículas de gelatina cargadas con el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF-2) en soportes de colágeno [70].

En la presente tesis, los soportes de colágeno I fueron elaborados siguiendo los procedimientos establecidos en trabajos anteriores [39, 40], y se incorporaron micropartículas de colágeno-gelatina en diferentes proporciones. En la **Figura 4.1**, se muestran microfotografías electrónicas (SEM) que evidencian la porosidad y la interconectividad de los poros del soporte (Panel A); así como, la presencia de una micropartícula de gelatina-colágeno adherida a uno de los poros del soporte (Panel B). Se observa la morfología esférica de esta micropartícula y su integridad después de los procesos a que fue sometida (mezcla con el hidrogel, liofilización, entrecruzamiento con glutaraldehído y una segunda liofilización). En conjunto estos resultados indican que la estrategia desarrollada en este trabajo, es adecuada para la elaboración de micropartículas.

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

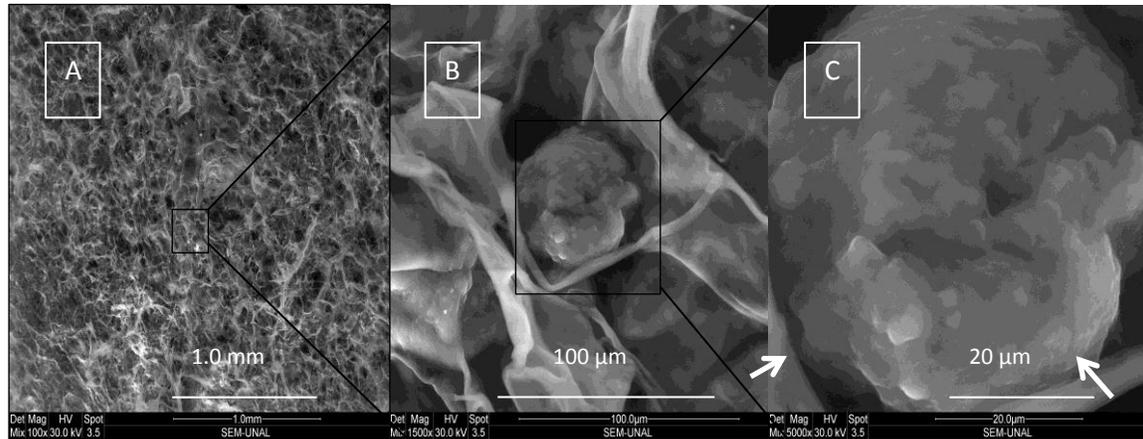


Figura 4.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de los soportes de colágeno I con micropartículas de gelatina-colágeno. Se muestran diferentes magnificaciones de una imagen representativa de un soporte con micropartículas. A menor magnificación, se observa la apariencia porosa e interconectada de los soportes de colágeno I después de la incorporación de las micropartículas (A); zona magnificada en la que se evidencia una micropartícula de gelatina-colágeno dentro de un poro del soporte, las cabezas de las flechas señalan zonas de adhesión de las superficies micropartícula-soporte (B); imagen magnificada de la micropartícula adherida al poro, en la que se observa su apariencia rugosa; la flecha señala una de las zonas de adhesión entre la micropartícula y el soporte (C).

La biodegradabilidad influye en la bioactividad de los soportes, por esta razón, era necesario evaluar la cinética de degradación de los distintos soportes obtenidos en este trabajo. De este modo, enzimáticamente se evaluó la estabilidad de los soportes en los que se incorporaron las micropartículas (ensayos S2, S3 y S4), de los soportes no modificados (ensayo S1) y de las micropartículas libres (no incorporadas).

La **Figura 4.2**, muestra los resultados obtenidos, durante el ensayo de degradación enzimática. Los soportes solos (obtenidos en el ensayo S1), fueron los que más rápidamente se degradaron y los únicos que lo hicieron completamente en el intervalo de tiempo del ensayo. Claramente, la incorporación de las micropartículas de colágeno-gelatina en los soportes S2, S3 y S4 (obtenidos en los ensayos S2, S3 y S4), disminuyó el porcentaje de degradación con respecto a los soportes de colágeno sin micropartículas (S1). Los soportes S4, elaborados con la mayor concentración de micropartículas (ensayo S4), exhibieron el menor porcentaje de degradación. Lo anterior indica que al aumentar la concentración de las micropartículas gelatina-colágeno se aumenta la estabilidad a la degradación enzimática de los soportes. Como se mencionó, los soportes S2 y S3 fueron más estables que los soportes solos; sin embargo, mostraron porcentajes de degradación mayores que los exhibidos por las

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

micropartículas de gelatina-colágeno solas y que los soportes S4. Este hecho se debe a que la concentración de las micropartículas gelatina-colágeno incluidas en estos soportes, fue menor que la concentración de las micropartículas solas y que la concentración de las micropartículas gelatina-colágeno incluidas en los soportes S4. Los resultados obtenidos concuerdan con hallazgos de otros investigadores [67], que concluyen que la incorporación de micropartículas de diferentes materiales modifican la biodegradación de los soportes desarrollados. Estos datos muestran además que la inclusión de las micropartículas en el soporte no solo estabiliza al soporte sino también a las micropartículas, lo que constituye un hallazgo novedoso de este trabajo.

En los soportes con aplicación en ingeniería de tejidos se busca modular su degradación, para que no sea muy rápida ni muy lenta, con el propósito de que en la medida en que esta ocurre se lleve a cabo la síntesis de Novo de tejido y la remodelación de la matriz. La tasa de degradación debe adecuarse al tejido que se quiere reemplazar [40]. Por ejemplo, en tejido conectivo la degradación del soporte debe ocurrir en paralelo con la formación de tejido de granulación y de nuevos vasos sanguíneos, para asegurar un recambio apropiado que mejore la cicatrización y favorezca la regeneración tisular [40]; sin embargo, cuando se diseñan y elaboran válvulas cardíacas, se busca que el soporte mantenga su integridad mecánica por meses o años [40]. Por lo anterior, nuevos experimentos tendrán que llevarse a cabo para determinar si la concentración de micropartículas en los soportes de colágeno más estable (5 mg/mL) posee la bioactividad requerida para promover la regeneración de lesiones dérmicas.

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

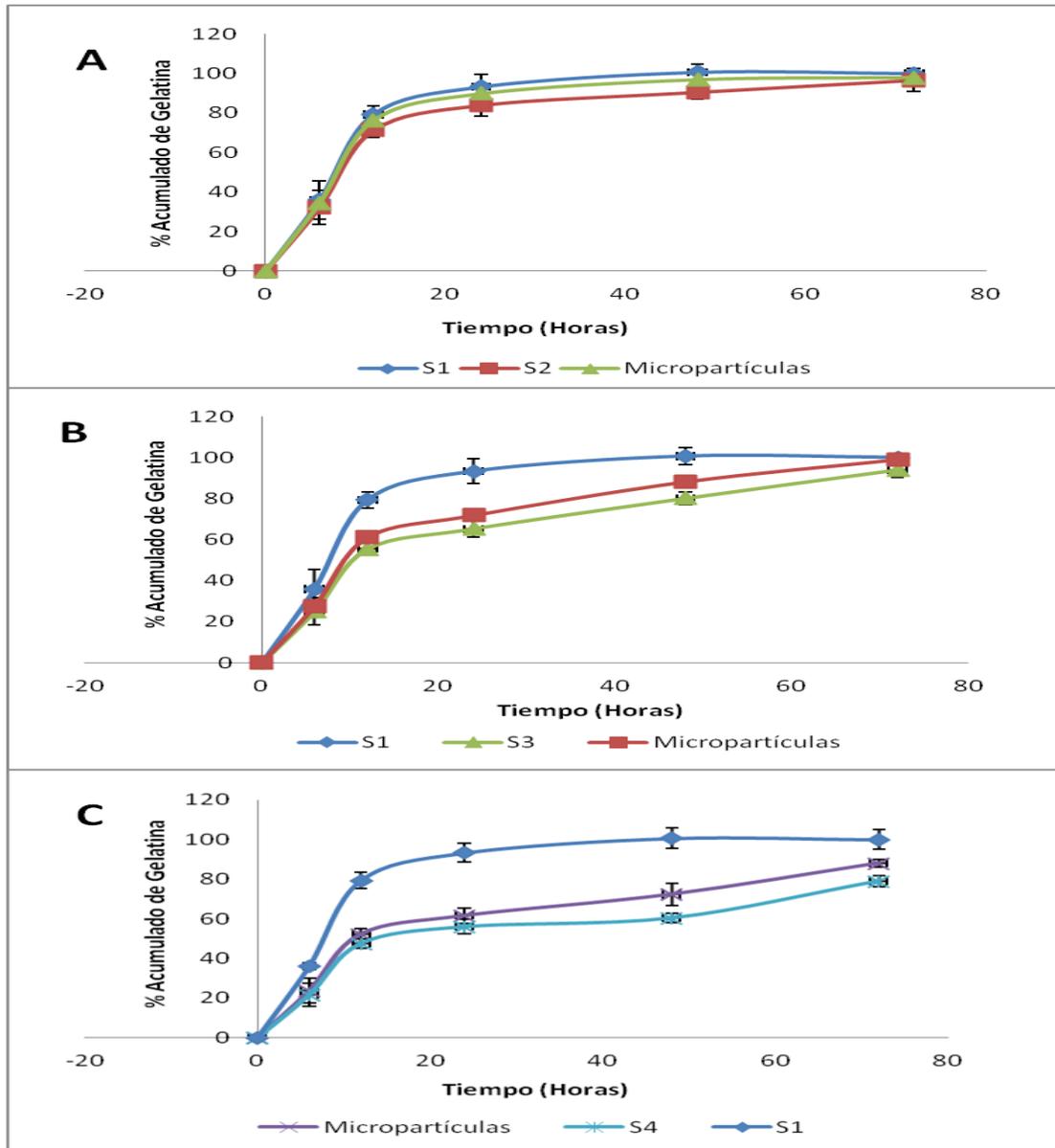


Figura 4.2. Evaluación de la degradación enzimática de los soportes. Se muestra la relación entre el porcentaje acumulado de gelatina en función del tiempo, en las digestiones enzimáticas de los diferentes soportes y de las micropartículas. **Panel A**, Degradación de los soportes con micropartículas a una concentración 1mg/mL (S2) comparado con soportes sin micropartículas (S1) y micropartículas a una concentración de 1mg/mL. **Panel B**, Degradación de los soportes con micropartículas a una concentración 2.5 mg/mL (S3) comparado con soportes sin micropartículas (S1) y micropartículas a una concentración de 2mg/mL. **Panel C**, Degradación de los soportes con micropartículas a una concentración 5mg/mL (S4) comparado con soportes sin micropartículas (S1) y micropartículas a una concentración de 5mg/mL. Se observa el aumento de la estabilidad a la degradación enzimática de los soportes en función de la concentración de micropartículas.

Capítulo 5. Asociación de un extracto comercial hidroglicólico de caléndula (*Calendula officinalis*) al sistema bifásico micropartículas-soporte de colágeno (Objetivo específico 3).

Metodología.

Asociación de un extracto comercial hidroglicólico de *Caléndula officinalis* al sistema bifásico micropartículas-soporte de colágeno.

Soportes de 1cm x 1cm, obtenidos en los ensayos S1, S2, S3, y S4, fueron colocados en cajas de cultivo de 12 pozos, cubiertos con 5mL de una solución al 10% v/v de un extracto comercial hidroglicólico de caléndula, desgasificados al vacío (200 mTorr por 15 min), e incubados (37°C, 12 h) en agitación (80 rpm) en un oscilador horizontal. Posteriormente, se removió el exceso de extracto y la superficie se lavó con agua destilada, para eliminar los excesos de extracto. Finalmente, los soportes fueron congelados (-20°C por 12 h) y liofilizados por 48 h.

Determinación de la capacidad de carga.

Los soportes cargados con caléndula se colocaron en 2 mL de NaOH 1N por una hora, la suspensión resultante se centrifugó (3.000 gravedades, 5 min) y el sobrenadante se tomó para cuantificar la cantidad de compuestos polifenólicos, flavonoides totales y compuestos glicósidos.

Cuantificación de compuestos polifenólicos.

La cuantificación de compuestos polifenólicos se hizo con el ensayo Folin-Ciocalteu, modificando el procedimiento descrito por Singleton y colaboradores [47]. En este ensayo, se mezclaron 100 uL de muestra con 100 uL del reactivo Folin-Ciocalteu (SIGMA) y se adicionaron 50uL de carbonato de sodio. Después de incubar la mezcla a 25°C por 120 minutos, se midió su absorbancia a 725 nm (TRIAD Multimode Reader) y los valores medidos fueron interpolados en una curva de calibración elaborada con los

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

valores de absorbancia de soluciones de ácido gálico (SIGMA) de concentraciones conocidas.

Cuantificación de flavonoides totales.

El contenido total de flavonoides se determinó modificando la metodología descrita por Moreno M.I. [48]. Brevemente, 100uL de muestra se mezclaron con 10 uL de cloruro de aluminio (SIGMA) al 10% y 10 uL de acetato de potasio. Después de 30 minutos de reacción a temperatura ambiente, se realizaron las lecturas de la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 415 nm (TRIAD Multimode Reader). En este ensayo se usó quercitina (SIGMA) como estándar para la elaboración de la curva de calibración.

Resultados y discusión de resultados.

Los extractos elaborados a partir de diferentes órganos de las plantas, son empleados tradicionalmente por diferentes culturas para el tratamiento de quemaduras y heridas en la piel [20]. De hecho, la medicina tradicional ayurvédica describe la mayor cantidad de plantas y extractos utilizados en el tratamiento de heridas de la piel [46]. En nuestro país, el INVIMA autoriza el uso de varios extractos y mezclas de extractos vegetales para el tratamiento tópico de heridas de piel [42]. De hecho, acepta el uso tópico del extracto hidroglicólico de *C. officinalis* como antiinflamatorio y cicatrizante [42].

Debido a que nuestro grupo de investigación desarrolló soportes de colágeno que al ser aplicados en lesiones de piel promueven su regeneración, decidimos evaluar si colocar extracto de caléndula en ellos potencia su actividad regeneradora. El primer paso fue modificar el soporte de colágeno incorporando micropartículas cargadas con el extracto de caléndula, para entregar controladamente los componentes activos (metabolitos secundarios) de los extractos de la flor de esta planta. Convencionalmente, la mayoría de extractos vegetales se incorporan a preparaciones tópicas, como cremas y ungüentos, en porcentajes entre 2-10% v/v [71]. Por esta razón, el diseño y desarrollo de soportes de colágeno I modificados con micropartículas asociadas a extracto de caléndula es una aproximación novedosa para la incorporación de extractos vegetales en productos con aplicación en ingeniería de tejidos.

En un sistema bifásico de liberación, las micropartículas, se comportan como microdominios dispersos dentro del soporte (fase continua), que controlan la difusión de moléculas hacia el interior (proceso de carga por inmersión) y hacia el exterior del soporte (liberación) [72]. La **Figura 5.1**, muestra una representación de un sistema bifásico para la liberación controlada de fármacos, estrategia ampliamente utilizada en farmacia en el diseño de sistemas de entrega controlada de moléculas bioactivas [67, 72-74].

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

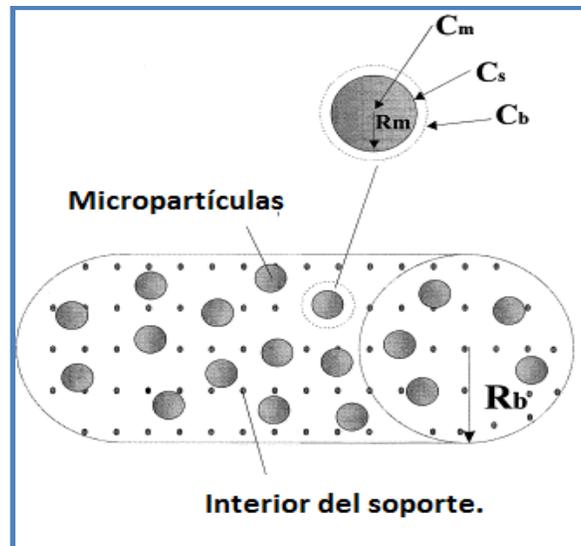


Figura 5.1. Esquema de un dispositivo de liberación controlada de dos fases.

Tomado y modificado de Kikkinides et al., [72].

Para evaluar si la incorporación de micropartículas en los soportes de colágeno (S2, S3 y S4), modifica su asociación con el extracto, se cuantificó la cantidad de metabolitos secundarios incorporados en los soportes con micropartículas y en los soportes solos (S1). Los datos obtenidos muestran que la capacidad de carga de los soportes S2, S3 y S4, aumenta en la medida que aumenta la concentración de micropartículas incorporadas. Igualmente, que los soportes sin micropartículas (S1) y que las micropartículas solas (M), exhiben la misma capacidad (**Figura 5.2**). Estos resultados que concuerdan con los obtenidos por otros grupos de investigación [75].

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

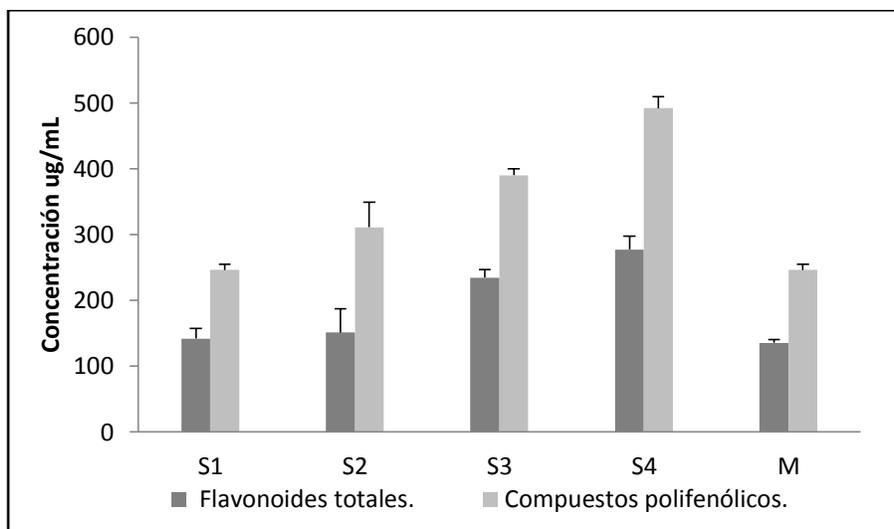


Figura. 5.2. Determinación de la capacidad de carga de los metabolitos secundarios que del extracto hidroglicólico de caléndula, exhibida por los soportes de colágeno I. Los datos representan el promedio de tres determinaciones independientes $\pm 2 \delta$ (desviación estándar).

La capacidad de carga de los soportes, está determinada por la capacidad de hinchamiento y la facilidad de difusión de los metabolitos hacia el interior del soporte; a su vez, los procesos de difusión dependen del área libre para el flujo de los metabolitos [76]. En los soportes sin micropartículas, el área libre de flujo depende del tamaño de poro de los soportes [72]; por el contrario, en los soportes con micropartículas el flujo de los metabolitos se ve interrumpido por la presencia de micropartículas en algunos poros del soporte. En el primer caso, este hecho lleva a que los metabolitos del extracto se difundan libremente y queden adsorbidos en las superficies de las hebras del soporte. En el segundo, a que los metabolitos al difundirse por los poros con micropartículas queden adsorbidos en la superficie o en el interior de estas, comportándose cada poro que contiene una micropartícula en un microdominio de reserva dentro de los soportes [77]. Por esta razón, adsorben y atrapan mayor cantidad de metabolitos aumentando su capacidad de carga.

Capítulo 6. Evaluación *in vitro* de la liberación de metabolitos secundarios del extracto de caléndula a partir del sistema bifásico Micropartículas-soporte de colágeno (Objetivo específico 4).

Metodología

Ensayo de liberación *in vitro*.

De cada uno de los soportes (S1, S2, S3, y S4), se colocó un fragmento de 1cm x 1cm por pozo (Cajas de poliestireno de 12 pozos). A cada pozo se le adicionaron 2mL de una solución buffer de fosfatos 0,02M (pH 7.4) o una solución buffer de acetatos 0,02M (5.2). Las cajas se incubaron (37°C o 32°C) con agitación A 80 rpm en un oscilador horizontal. Cada 24h, durante 15 días, los sobrenadantes fueron retirados, reemplazados por 2 mL de solución buffer fresca y congelados a -20°C. En el momento del análisis, las muestras se descongelaron y analizaron para cuantificar compuestos polifenólicos.

Cuantificación de compuestos polifenólicos.

La cuantificación de compuestos polifenólicos se hizo con el ensayo Folin-Ciocalteu, modificando el procedimiento descrito por Singleton y colaboradores [47]. En este ensayo, se mezclaron 100 uL de muestra con 100 uL del reactivo Folin-Ciocalteu (SIGMA) y se adicionaron 50uL de carbonato de sodio. Después de incubar la mezcla a 25°C por 120 min, se midió su absorbancia a 725 nm (TRIAD Multimode Reader) y los valores medidos fueron interpolados en una curva de calibración elaborada con los valores de absorbancia de soluciones de ácido gálico (SIGMA) de concentraciones conocidas.

Resultados y discusión de resultados.

Los ensayos de liberación *in vitro*, son una herramienta importante en el estudio del impacto de las variables del proceso de elaboración sobre el mecanismo de liberación del sistema de entrega [78].

Un trabajo anterior del grupo reportó que al asociar el soporte de colágeno con el extracto hidroglicólico de flores de caléndula, aproximadamente el 60% de su carga inicial se liberaba en menos de 24 horas [43]. Este comportamiento fue relacionado con las características microestructurales del soporte (tamaño de poro $\sim 172.9 \mu\text{m}$ y una porosidad $>90\%$ altamente interconectada) [40], que favorecen los fenómenos de transporte por difusión a través del mismo [43]. En este capítulo, se estudió el efecto de la incorporación de las micropartículas de gelatina-colágeno, sobre la cinética de liberación de los compuestos polifenólicos (metabolitos secundarios) del extracto de caléndula (*C. officinalis*).

En este trabajo los ensayos de liberación *in vitro* se realizaron según los lineamientos de la Asociación Americana de Ciencias Farmacéuticas (AAPS, por sus siglas en inglés), para formas farmacéuticas nuevas o especiales-tópicas o transdérmicas (pH: $5.0 < 5.2 < 6.0$ y 32°C) [79]. También, se realizaron bajo las condiciones recomendadas para formas farmacéuticas tradicionales (pH 7.4 a 37°C), para confirmar que el perfil difiere del establecido en circunstancias que semejan las mostradas por la piel.

La **Figura 6.1 (Paneles A y B)**, muestra los dos perfiles de liberación obtenidos. En conjunto, los resultados indican que la incorporación de micropartículas en los soportes disminuye la cantidad de compuestos polifenólicos liberados durante el tiempo del ensayo. Resultados semejantes han sido reportados por Galeska y colaboradores, para la liberación *in vitro* de dexametasona en micropartículas de PLGA en hidrogeles de PVA [75] y por DeFail y colaboradores, para la liberación de doxorubicina en microesferas de PLGA embebidos en soportes de gelatina [80].

Las gráficas muestran una fase inicial en que los metabolitos que se encuentran en la superficie del soporte se liberan rápidamente, en un tiempo menor de 48 horas. También, muestran una segunda fase en que la liberación es más lenta debido

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

probablemente al tiempo requerido para la desorción y difusión de los polifenoles desde la superficie de los poros (hebras de colágeno) y desde la superficie y el interior de las micropartículas [43].

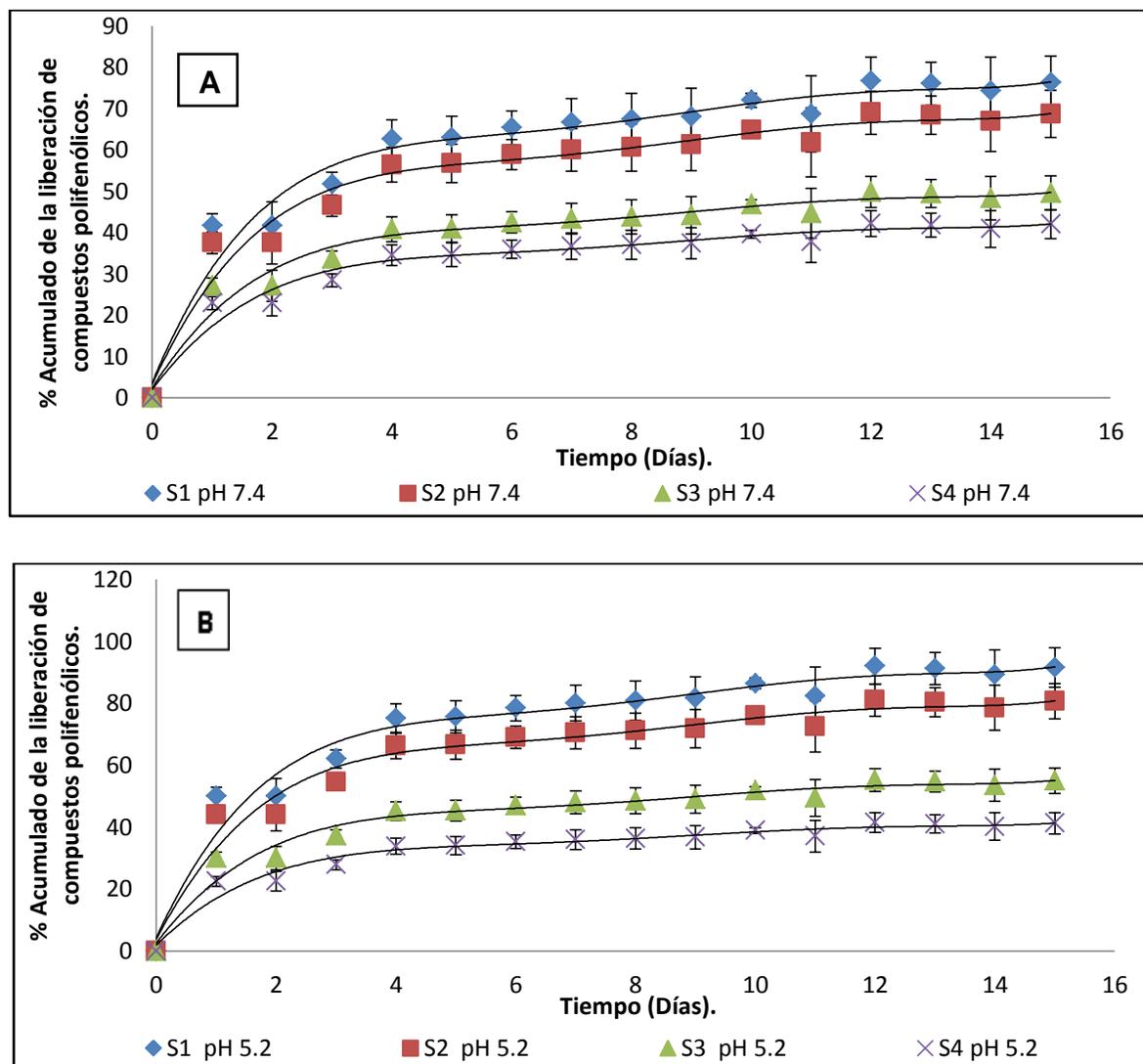


Figura. 6.1. Curvas de liberación *in vitro*. A). Medio de liberación a pH 7.4 y temperatura de 37°C; B). Medio de liberación a pH 5.2 y 32°C. Se observa el efecto de la incorporación de micropartículas en el perfil de liberación de compuestos polifenólicos, tanto en la cantidad inicial liberada rápidamente “burst effect”, como en la pendiente de la curva que indica la liberación de la carga remanente.

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

Para estudiar el efecto de las condiciones de pH y la temperatura del medio sobre la liberación *in vitro*, se utilizó el parámetro de comparación f_2 (factor de similaridad) (ecuación 6.1.)[81].

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{0.5} \times 100 \right\}$$

Ecuación 6.1. Cálculo del factor de similaridad f_2 .

En donde n corresponde al número de puntos tomados en el tiempo; R_t corresponde al valor promedio en cada punto de la curva 1; T_t corresponde al valor promedio en cada punto de la curva 2.

El parámetro de similaridad f_2 , es una transformación de raíz cuadrada recíproca logarítmica de la suma de error al cuadrado y es una medida de la similitud en el porcentaje (%) entre dos curvas, si el valor de f_2 es más cercano al 100%, hay mayor similitud entre las dos curvas comparadas, tal como se observa en la **Tabla 6.1**.

Tabla 6.1. Diferencia promedio de dos perfiles de disolución [81].

Diferencia.	2%	5%	10%	15%	20%
f_2	83	65	50	41	36

En la **Tabla 6.2**, se muestran los resultados obtenidos al comparar las curvas de liberación de los soportes (S1, S2, S3 y S4), modificando el pH o la temperatura del medio de liberación. La liberación *in vitro* de polifenóles fue mayor en pH ácido que en pH 7.4; probablemente, porque los soportes elaborados con colágeno se hinchan más a pH ácido que a pH neutro [43]. Lo anterior, debido a que los entrecruzamientos intermoleculares del tipo aldimina son disociados en concentraciones diluidas de ácidos y a que las cargas repelentes repulsivas en la triple hélice, conducen al hinchamiento de las estructuras fibrilares [82]. Por el contrario, los resultados mostrados en la tabla indican que la variación de la temperatura no afecta la liberación *in vitro* de polifenóles en los dos modelos estudiados.

Tabla 6.2. Factor de similaridad (f_2) calculado.

Curva 1	Curva 2	f_2
S1 (pH 7.4 y 37°C)	S1 (pH 5.2 y 37°C)	46.3
S2 (pH 7.4 y 37°C)	S2 (pH 5.2 y 37°C)	44.1
S3 (pH 7.4 y 37°C)	S3 (pH 5.2 y 37°C)	39.0
S4 (pH 7.4 y 37°C)	S4 (pH 5.2 y 37°C)	45.7
Micropartículas (pH 7.4 y 37°C)	Micropartículas (pH 5.2 y 37°C)	50.8
S1 (37°C y pH 7.4)	S1 (32°C y pH 7.4)	87.1
S2 (37°C y pH 7.4)	S2 (32°C y pH 7.4)	85.0
S3 (37°C y pH 7.4)	S3 (32°C y pH 7.4)	88.3
S4 (37°C y pH 7.4)	S4 (32°C y pH 7.4)	84.9
micropartículas (37°C y pH 7.4)	micropartículas (32°C y pH 7.4)	89.4

El tiempo requerido para el diseño de un sistema de liberación puede ser reducido si su mecanismo de liberación es comprendido y si se usa un modelo matemático apropiado para caracterizar el sistema. Estos modelos pueden ser clasificados como modelos empíricos o modelos mecanicistas. Los empíricos se basan en el comportamiento experimental del sistema estudiado; los mecanicistas se basan en modelos matemáticos-predictivos que incorporan las principales variables fisicoquímicas que controlan los procesos de transferencia de masa [83].

Para determinar el modelo de liberación *in vitro* a partir de las curvas obtenidas en las condiciones de pH 5.2 y 32°C, los datos se ajustaron a tres modelos matemáticos (cinética de orden cero, cinética de primer orden y al modelo de Higuchi) y para cada modelo se determinaron los coeficientes de correlación. Los datos (**Tabla 6.3**), señalan que la liberación de polifenoles de los soportes de colágeno asociados con el extracto de caléndula sigue una cinética de orden cero, en la que la liberación no depende de la cantidad de metabolitos presentes en el medio de liberación. También, que este comportamiento no se ve afectado por la incorporación de micropartículas en los soportes, ya que estas también presentan una cinética de liberación de orden cero.

Al ajustar nuestros datos al modelo de Higuchi, los valores de los coeficientes de correlación también fueron cercanos a 1, aunque menores que los obtenidos en la

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

cinética de orden cero. Aunque este modelo se aplica en sistemas que no dependen del hinchamiento [82], para evidenciar el posible mecanismo de liberación de los soportes de colágeno, se empleó el modelo “Ley de la Potencia” (**Ecuación 6.2**) desarrollado por Ritger y Peppas [84].

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

Ecuación 6.2. Ley de la potencia de Ritger y Peppas[84].

Donde k es una constante que incorpora características estructurales y geométricas del mecanismo y n, es el exponente de liberación, indicando de acuerdo al valor numérico que tome, cuál es el mecanismo de liberación que ocurre.

Esta ecuación puede verse como el resultado de la combinación de dos procesos aparentemente independientes, uno el debido al transporte del analito (metabolito) que obedece a las leyes de Fick’s y el otro al hinchamiento del soporte (expansión dinámica), que involucra a la transición de un estado semirrígido (*glass*) a otro más flexible (*rubber*), llamado “transporte-caso II” [85]. Es decir en esta ecuación se tiene en cuenta no sólo la difusión del metabolito, sino también la relajación de las fibras del soporte como determinantes de la liberación.

Tabla 6.3. Coeficientes de correlación de los diferentes modelos matemáticos ajustados a las curva de liberación in vitro.

Ensayo	Cinética de Orden Cero. $\frac{Mt}{M_{\infty}} = kt$	Cinética de primer orden $\frac{Mt}{M_{\infty}} = 1 - e^{-kt}$	Ecuación de Higuchi. $\frac{Mt}{M_{\infty}} = kt^{1/2}$	Ecuación de Ritger–Peppas. $\frac{Mt}{M_{\infty}} = kt^n$
S1	0,993	0,883	0,981	0,967(n = 0.2969)
S2	0,995	0,872	0,975	0,976(n = 0.3969)
S3	0,993	0,873	0,973	0,954(n = 0.3269)
S4	0,992	0,875	0,972	0,96(n = 0.35969)
M	0,997	0,881	0,983	0,973(n = 0.5969)

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

Cuando $n=1$, la ecuación corresponde a una cinética de liberación de orden cero. En este caso se dice que hay un “hinchamiento controlado” en la liberación. Este mecanismo interpreta que la relajación del soporte ocurre cuando el agua se embebe en el soporte, controlando la velocidad de liberación. El agua en este caso actúa como agente plastificante, es decir, disminuye la temperatura de transición vítrea T_g . Cuando T_g es igual a la temperatura del sistema de liberación, las cadenas de polímero sufren la transformación de un estado cristalino a uno del tipo más flexible, con incremento del volumen del soporte y aumento de la movilidad. El valor $n < 0,5$ indica que el mecanismo principal de liberación es la difusión. Cuando n está entre 0,5 y 1, coexisten los dos mecanismos y se dice que el fenómeno de transporte es anómalo [86].

Los valores mostrados por la **Tabla 6.3**, sugieren que en los soportes S1, S2, S3 y S4 el mecanismo de liberación que prevalece es la difusión ($n < 0,5$), sin que la incorporación de las micropartículas modifique este mecanismo. En el caso de las micropartículas solas ($0,5 < n < 1,0$), es posible que la liberación ocurra por transporte anómalo: hinchamiento de la micropartícula y difusión de los metabolitos a través de las fibras de gelatina-colágeno, siendo el transporte por difusión el de mayor prevalencia.

Conclusiones finales.

- En nuestro laboratorio, se estandarizaron las metodologías para elaborar micropartículas de PVA, PVA-colágeno, gelatina y colágeno-gelatina, estables durante el proceso de liofilización, y mediante la estrategia de transición sol-gel.
- La incorporación de colágeno en las micropartículas de PVA y gelatina, afecta el diámetro promedio, la tasa de hinchamiento y la capacidad de carga de las micropartículas.
- Por su capacidad de carga, biodegradabilidad y biocompatibilidad, las micropartículas de gelatina-colágeno constituyen un buen sistema de entrega de sustancias bioactivas.
- Se elaboraron soportes de colágeno tipo I que incluyen micropartículas de gelatina-colágeno en diferentes proporciones.
- Los soportes de colágeno I en los que se incluyen micropartículas de gelatina-colágeno son más estables a la degradación enzimática por colagenasa que los soportes sin micropartículas.
- La capacidad de carga de los soportes con micropartículas aumenta en función de la concentración de micropartículas dentro de soporte.
- La incorporación de las micropartículas de gelatina-colágeno en los soportes de colágeno, modifica el perfil de liberación *in vitro* de los compuestos polifenólicos que componen el extracto de *C. officinalis*, debido a la modificación de los mecanismos de liberación.

Recomendaciones

1. Optimizar el proceso de elaboración de micropartículas de gelatina-colágeno, mediante el uso de un diseño experimental factorial, que evalué las variables de proceso más importantes, que influyan en la distribución de tamaño de partícula, el rendimiento del proceso de elaboración y la biodegradación enzimática de las partículas.
2. Evaluar el efecto de la incorporación de las micropartículas sobre las características microestructurales de los soportes (tamaño de poro, porosidad e interconectividad de poro), propiedades que determinan la bioactividad de los sustitutos dérmicos desarrollados.
3. Caracterizar mediante ensayos mecánicos (ensayo de tracción) los soportes modificados con la incorporación de las micropartículas.
4. Determinar la biocompatibilidad de los soportes modificados, mediante ensayos *in vitro* (citotoxicidad) e *in vivo*.
5. Estudiar en un modelo *in vivo*, el potencial como sustituto dérmico de los soportes modificados con micropartículas y asociados con el extracto de *C. officinalis*, como potencial sustituto dérmico.

Referencias

1. Venus., M., J. Waterman., and I. McNab., *Basic physiology of the skin*. SURGERY 2011. **29:10**(BASIC SCIENCE).
2. Garcia, M., et al., *Modeling normal and pathological processes through skin tissue engineering*. Mol Carcinog, 2007. **46**(8): p. 741-5.
3. Martinez-Santamaria, L., S. Guerrero-Aspizua, and M. Del Rio, *Skin bioengineering: preclinical and clinical applications*. Actas Dermosifiliogr, 2012. **103**(1): p. 5-11.
4. Gelsea, K., E. Po"schlb, and T. Aigner, *Collagens—structure, function, and biosynthesis*. Advanced Drug Delivery Reviews 2003. **55**: p. 1531– 1546
5. Shi, J., et al., *Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications*. Nano Lett, 2010. **10**(9): p. 3223-30.
6. Soni., M., S. Kumar., and G.D. Gupta., *Transdermal Drug Delivery: A Novel Approach to Skin Permeation*. Journal of Pharmacy Research, 2009. **2**(8): p. 1184-1190.
7. Yildirimer, L., N.T. Thanh, and A.M. Seifalian, *Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach*. Trends Biotechnol, 2012. **30**(12): p. 638-48.
8. Velnar, T., T. Bailey, and V. Smrkolj, *The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms*. J Int Med Res, 2009. **37**(5): p. 1528-42.
9. Beldon, P., *Basic science of wound healing*. SURGERY, 2010. **28:9**: p. 409–412.
10. Young., A. and C.-E. McNaught., *The physiology of wound healing* SURGERY 2011. **29**(10): p. 475-479.
11. Lamel, S.A. and R.S. Kirsner, *New approaches to enhanced wound healing: future modalities for chronic venous ulcers.* , Drug Discov Today: Dis Mech 2013.
12. Tabata, Y., *Regeneration Based on Drug Delivery Technology*, in *Topics in Tissue Engineering* N.A.P. Ferretti-©, Editor. 2003.
13. Billeter, A.T., et al., *Sequential improvements in organ procurement increase the organ donation rate*. Injury, 2012. **43**(11): p. 1805-10.
14. Pruitt Jr, B.A., et al., *Burn wound infections: current status* World journal of surgery, 1998. **22**(2): p. 135-145.

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

15. ANT. *Asociacion Nacional de Trasplantados, informe anual*. 2012 [cited 2012 Oct 2012]; Available from: <http://www.trasplantados.com/web/index.php/donacion>.
16. Drinnan., C.T., et al., *Tissue Engineering in Drug Delivery, en: Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*, in *Advances in Delivery Science and Technology*, M.J. Rathbone, Editor. 2012, Controlled Release Society. p. 533-566.
17. Yannas, I.V., *Emerging rules for inducing organ regeneration*. *Biomaterials*, 2013. **34**(2): p. 321-30.
18. Langer, R., *Perspectives and challenges in tissue engineering and regenerative medicine*. *Adv Mater*, 2009. **21**(32-33): p. 3235-6.
19. Holzapfel, B.M., et al., *How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012.
20. Shailajan, S., et al., *Wound healing efficacy of Jatyadi Taila: in vivo evaluation in rat using excision wound model*. *J Ethnopharmacol*, 2011. **138**(1): p. 99-104.
21. Atala, A., *Tissue engineering of reproductive tissues and organs*. *Fertil Steril*, 2012. **98**(1): p. 21-9.
22. Spiller, K.L. and G. Vunjak-Novakovic, *Clinical translation of controlled protein delivery systems for tissue engineering*. *Drug Delivery and Translational Research* 2013:p. 1-15.
23. Fa-MingChen, MinZhang, and Zhi-FenWu, *Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering*. *Biomaterials*, 2010. **31**: p. 6279e6308.
24. Damanhuri M, Boyle J, and S. Enoch, *Advances in tissue-engineered skin substitutes*. *Wounds International* 2011. **2**(1).
25. Place, E.S., N.D. Evans, and M.M. Stevens, *Complexity in biomaterials for tissue engineering*. *Nat Mater*, 2009. **8**(6): p. 457-70.
26. Shores JT, Gabriel A, and G. S., *Skin substitutes and alternatives: a review*. *Adv Skin Wound Care* 2007. **20**: p. 493-508.
27. Williams, D.F., *The Williams dictionary of biomaterials*. 1999, Liverpool: Liverpool University Press. xvii, 343 p.

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

28. Albu, M.G., I. Titorencu, and M.V. Ghica, *Collagen-based drug delivery systems for tissue engineering*. Biomaterials applications for nanomedicine, Intech Open Acces Publisher, 2011: p. 339-342.
29. Friess, W., *Collagen in drug delivery and tissue engineering-Preface* Advanced Drug Delivery Reviews 2003. **55** p. 1529–1530.
30. Nair, R., et al., *Collagen based drug delivery systems: a review*. JTPS, 2010. **1**(7): p. 288-304.
31. Gelse, K., E. Poschl, and T. Aigner, *Collagens--structure, function, and biosynthesis*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(12): p. 1531-46.
32. Ricard-Blum, S., *The collagen family*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2011. **3**(1): p. 1-19.
33. Fontanilla, M.R. and L.G. Espinosa, *In vitro and in vivo assessment of oral autologous artificial connective tissue characteristics that influence its performance as a graft*. Tissue Eng Part A, 2012. **18**(17-18): p. 1857-66.
34. Espinosa, L., A. Sosnik, and M.R. Fontanilla, *Development and preclinical evaluation of acellular collagen scaffolding and autologous artificial connective tissue in the regeneration of oral mucosa wounds*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(5): p. 1667-79.
35. Pignatello, R., *Biomaterials Applications for Nanomedicine*. Croatia, InTech, 2011: p. 333-358.
36. Santo, V.E., et al., *Controlled Release Strategies for Bone, Cartilage, and Osteochondral Engineering-Part II: Challenges on the Evolution from Single to Multiple Bioactive Factor Delivery*. Tissue Eng Part B Rev, 2013.
37. Sokolsky-Papkov, M., et al., *Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(4-5): p. 187-206.
38. Schmidt, C., et al., *Biological studies on Brazilian plants used in wound healing*. J Ethnopharmacol, 2009. **122**(3): p. 523-32.
39. Perez, S., et al., *Estandarización de un método para la elaboración de un análogo de dermis humana*. Revista Colombiana De Ciencias Químico Farmacéuticas, 2001. **30**(1): p. 9-15.

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

40. Suesca, Q.E., *Optimización de la obtención de soportes de colágeno y estudio del efecto de su microestructura en el desarrollo de mucosa oral artificial*. Tesis Doctoral en Ciencias Farmacéuticas. Univesidad Nacional de Colombia, 2013.
41. Reuter, J., *Botanicals in dermatology and skin health*. Botanical medicine. From bench to bedside ed. R. Cooper, Kronenberg, F. . 2009, New Rochelle, NY. USA: Mary Ann Liebert Inc. 33–65.
42. INVIMA, *Plantas Medicinales Aceptadas con fines terapéuticos*. <http://www.invima.gov.co/images/pdf/tecnovigilancia/documentos-tecnicos/PlantasMedicinales.pdf>, Consultado Julio 01 de 2013.
43. Zea, G., *Evaluación de soportes de colágeno tipo I como un sistema de entrega para la liberación de un extrato de Caléndula (*Calendula officinalis*)*. Tesis de grado. Pregrado en Química Farmacéutica. Universidad Nacional de Colombia., 2012.
44. Rossler, B., J. Kreuter, and D. Scherer, *Collagen microparticles: preparation and properties*. J Microencapsul, 1995. **12**(1): p. 49-57.
45. Kawai, K., et al., *Accelerated tissue regeneration through incorporation of basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres into artificial dermis*. Biomaterials, 2000. **21**(5): p. 489-99.
46. Sabale, P., et al., *An overview of medicinal plants as wound healers*. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2012. **2**(11): p. 143-150.
47. Singleton, V.L. and J.A. Rossi., *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents* American journal of Enology and Viticulture 1965. **16**(3): p. 144-158.
48. Moreno, M.I., et al., *Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina*. J Ethnopharmacol, 2000. **71**(1-2): p. 109-14.
49. Loh, Q.L. and C. Choong, *Three-dimensional Scaffolds for Tissue Engineering: Role of Porosity and Pore Size*. Tissue Eng Part B Rev, 2013.
50. Freiberg, S. and X.X. Zhu, *Polymer microspheres for controlled drug release*. Int J Pharm, 2004. **282**(1-2): p. 1-18.

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

51. Tran, V.T., J.P. Benoit, and M.C. Venier-Julienne, *Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy?* Int J Pharm, 2011. **407**(1-2): p. 1-11.
52. Hu, L., H. Zhang, and W. Song, *An overview of preparation and evaluation sustained-release injectable microspheres.* J Microencapsul, 2013. **30**(4): p. 369-82.
53. Kim, H.W., H.J. Gu, and H.H. Lee, *Microspheres of collagen-apatite nanocomposites with osteogenic potential for tissue engineering.* Tissue Eng, 2007. **13**(5): p. 965-73.
54. Jansen, R.G., et al., *Tissue reactions to collagen scaffolds in the oral mucosa and skin of rats: environmental and mechanical factors.* Arch Oral Biol, 2008. **53**(4): p. 376-87.
55. Chan, B.P., et al., *Mesenchymal stem cell-encapsulated collagen microspheres for bone tissue engineering.* Tissue Eng Part C Methods, 2010. **16**(2): p. 225-35.
56. Berthold, A., K. Cremer, and J. Kreuter, *Collagen microparticles: carriers for glucocorticosteroids.* Eur J Pharm Biopharm, 1998. **45**(1): p. 23-9.
57. Chowdhury, D.K. and A.K. Mitra, *Kinetics of in vitro release of a model nucleoside deoxyuridine from crosslinked insoluble collagen and collagen-gelatin microspheres.* Int J Pharm, 1999. **193**(1): p. 113-22.
58. Bhatnagar, B.S., R.H. Bogner, and M.J. Pikal, *Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization.* Pharm Dev Technol, 2007. **12**(5): p. 505-23.
59. Jeong, B., S.W. Kim, and Y.H. Bae, *Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels.* Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(1): p. 37-51.
60. Vinogradov, S.V., *Colloidal microgels in drug delivery applications.* Curr Pharm Des, 2006. **12**(36): p. 4703-12.
61. Zhang, H.Z., et al., *The negative biodegradation of poly(vinyl alcohol) modified by aldehydes.* Polymer Degradation and Stability, 2006. **91**(8): p. 1740-1746.
62. Paradossi, G., et al., *Poly(vinyl alcohol) as versatile biomaterial for potential biomedical applications.* J Mater Sci Mater Med, 2003. **14**(8): p. 687-91.

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

63. Jiang, S., S. Liu, and W. Feng, *PVA hydrogel properties for biomedical application*. J Mech Behav Biomed Mater, 2011. **4**(7): p. 1228-33.
64. Olsen, D., et al., *Recombinant collagen and gelatin for drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(12): p. 1547-67.
65. Young, S., et al., *Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules*. J Control Release, 2005. **109**(1-3): p. 256-74.
66. Holzapfel, B.M., et al., *How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(4): p. 581-603.
67. Banerjee, I., D. Mishra, and T.K. Maiti, *PLGA Microspheres Incorporated Gelatin Scaffold: Microspheres Modulate Scaffold Properties*. Int J Biomater, 2009. **2009**: p. 143659.
68. Lee, J.E., et al., *Effects of the controlled-released TGF-beta 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffold*. Biomaterials, 2004. **25**(18): p. 4163-73.
69. Santo, V.E., et al., *Controlled Release Strategies for Bone, Cartilage, and Osteochondral Engineering-Part II: Challenges on the Evolution from Single to Multiple Bioactive Factor Delivery*. Tissue Eng Part B Rev, 2013. **19**(4): p. 327-52.
70. Kimura, Y., et al., *In situ adipogenesis in fat tissue augmented by collagen scaffold with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor*. J Tissue Eng Regen Med, 2010. **4**(1): p. 55-61.
71. Social, M.d.I.P., *Vademécum colombiano De plantas medicinales*.
72. Kikkinides, E.S., et al., *A two-phase model for controlled drug release from biphasic polymer hydrogels*. J Control Release, 1998. **51**(2-3): p. 313-25.
73. Varelas, C.G., D.G. Dixon, and C.A. Steiner, *Zero-order release from biphasic polymer hydrogels*. Journal of Controlled Release, 1995. **34**: p. 185-192.
74. Galeska, I., et al., *Controlled release of dexamethasone from PLGA microspheres embedded within polyacid-containing PVA hydrogels*. AAPS J, 2005. **7**(1): p. E231-40.
75. Galeska, I., et al., *Controlled Release of Dexamethasone from PLGA Microspheres Embedded Within Polyacid-Containing PVA Hydrogels*. The AAPS Journal 2005. **7**(1): p. E231-E240.

Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*).

76. Hoare, T.R. and D.S. Kohane, *Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges*. Polymer 2008. **49**: p. 1993-2007.
77. Grassi, M. and G. Grassi, *Mathematical modelling and controlled drug delivery: matrix systems*. Curr Drug Deliv, 2005. **2**(1): p. 97-116.
78. Siewert, M., et al., *FIP/AAPS Guidelines for Dissolution/In Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms*. Dissolution Technologies, 2003. **FEBRUARY 2003**.
79. Brown, C.K., et al., *FIP/AAPS Joint Workshop Report: Dissolution/In Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms*. AAPS PharmSciTech, , June 2011. **12**(2): p. 782-794.
80. DeFail, A.J., et al., *Controlled release of bioactive doxorubicin from microspheres embedded within gelatin scaffolds*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, December 2006. **79A**(4): p. 954–962.
81. Shah, V.P., et al., *In Vitro Dissolution Profile Comparison—Statistics and Analysis of the Similarity Factor, f2*. Pharmaceutical Research June 1998. **15**(6): p. June 1998.
82. Friess, W., *Collagen – biomaterial for drug delivery*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, March 1998. **45**(2): p. 113–136.
83. Kaunisto, E., et al., *Mechanistic modelling of drug release from polymer-coated and swelling and dissolving polymer matrix systems*. Int J Pharm, 2011. **418**(1): p. 54-77.
84. Ritger, P.L. and N.A. Peppas, *A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices*. Journal of Controlled Release, 1987. **5**(1): p. 37-42.
85. Andreetta, H.A., *Fármacos de Acción Prolongada: Mecanismos de Liberación. Usos de Distintos Modelos*. Lat. Am. J. Pharm, 2003. **22**(4): p. 355-364.
86. Ritger, P.L. and N.A. Peppas, *A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs* Journal of controlled release 1987. **5**(1): p. 23-36.