



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**MEMBRANAS POLIMÉRICAS CON ACEITE ESENCIAL DE
ROMERO (*ROSMARINUS OFFICINALIS*) E INSULINA PARA LA
RECUPERACIÓN DE HERIDAS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

LUIS ENRIQUE PÉREZ CALTZONTZIN



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: M. en C. ALMA MIRIAM NOVELO TORRES
VOCAL: Profesor: M. en I. VERONICA ZAMORA SALAZAR
SECRETARIO: Profesor: Dr. GERARDO LEYVA GOMEZ
1er. SUPLENTE: Profesor: Dra. VIRIDANA GISELA LLERA ROJAS
2° SUPLENTE: Profesor: AURORA ANAIS ZURITA CRUZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNAM, CIUDAD UNIVERSITARIA, FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO F,
LABORATORIO 307, Laboratorio de Investigación
Farmacéutica y Biomateriales (LIFAB)

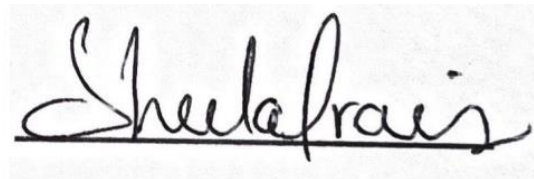
ASESOR DEL TEMA:

DR. GERARDO LEYVA GÓMEZ



SUPERVISOR TÉCNICO

DRA. SHEILA IRAIS PEÑA CORONA



SUSTENTANTE (S):

LUIS ENRIQUE PÉREZ CALTZONTZIN



Agradecimientos

Se agradece a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico por la asistencia otorgada mediante el Programa de Apoyo a Proyectos para Innovar y Mejorar la Educación (PAPIME) con el título “Implementación de nuevas estrategias de fabricación en la enseñanza de formas farmacéuticas no convencionales en el laboratorio de tecnología farmacéutica II de la licenciatura de Química Farmacéutica Biológica de la Facultad de Química”, con número de registro PE205524. Además del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la misma dependencia con el proyecto titulado “Evaluación del efecto de fármacos encapsulados con nanopartículas recubiertas en la inhibición de agregados proteicos de ataxina 7 anormal en modelos neuronales in vitro”, con número de registro IN204722

Dedicatorias

Índice general

| | |
|---|----|
| 1. Introducción | 8 |
| 2. Marco teórico | 11 |
| 2.1. Piel..... | 11 |
| 2.2. Herida | 12 |
| 2.2.1. Cicatrización..... | 13 |
| 2.3. Epidemiología de heridas en México..... | 14 |
| 2.3.1. Enfermedades y heridas | 15 |
| 2.3.2. Quemaduras..... | 15 |
| 2.3.3. Cirugías | 16 |
| 2.3.4. Enfermedades de la piel | 16 |
| 2.4. Microorganismos en heridas | 17 |
| 2.5. Insumos: atención e impacto económico | 19 |
| 2.6. Apósito/membrana | 21 |
| 2.7. Las plantas en la medicina | 22 |
| 2.8. Romero (<i>Rosmarinus officinalis L.</i>)..... | 23 |
| 2.9. Polímeros | 24 |
| 2.10. Pluronic F-127 | 25 |
| 2.11. Quitosano | 26 |
| 2.12. Alginato | 27 |
| 2.13. Insulina en heridas | 28 |
| 3. Objetivo..... | 30 |
| 3.1. Objetivo General | 30 |
| 3.2. Objetivos particulares | 30 |
| 4. Hipótesis | 30 |
| 5. Metodología | 30 |
| 5.1. Solución de quitosano | 31 |
| 5.2. Obtención de gel base. | 31 |
| 5.3. Elaboración de mezcla Pluronic 127 hidrogel e insulina | 31 |
| 5.4. Fabricación de membranas | 31 |
| 5.5. Infrarrojo | 32 |
| 5.6. Pruebas físicas y mecánicas | 32 |
| 5.6.1. Apariencia | 32 |
| 5.6.2. Cuantificación de insulina | 32 |
| 5.6.3. Espesor y peso promedio | 32 |
| 5.6.4. Ensayos mecánicos | 33 |
| 5.6.5. pH superficial..... | 33 |
| 5.6.6. Ángulo de contacto | 33 |
| 5.6.7. Capacidad de absorción de agua | 34 |

| | | |
|--------|--|----|
| 5.6.8. | Disolución | 34 |
| 5.6.9. | Permeabilidad al vapor | 34 |
| 5.7. | Ensayos sobre microorganismos..... | 35 |
| 6. | Resultados | 37 |
| 6.1. | Fabricación de membranas | 37 |
| 6.1. | Infrarrojo | 40 |
| 6.2. | Apariencia | 41 |
| 6.3. | Cuantificación de insulina | 42 |
| 6.4. | Espesor y peso promedio | 44 |
| 6.5. | Ensayos mecánicos | 44 |
| 6.6. | pH superficial..... | 46 |
| 6.7. | Angulo de contacto | 46 |
| 6.8. | Capacidad de absorción de agua | 47 |
| 6.9. | Disolución..... | 48 |
| 6.10. | Permeabilidad al vapor | 49 |
| 6.11. | Ensayos biológicos con microorganismos | 49 |
| 7. | Discusión..... | 52 |
| 7.1. | Fabricación de membranas | 52 |
| 7.2. | Infrarrojo | 52 |
| 7.3. | Apariencia | 53 |
| 7.4. | Cuantificación de insulina | 53 |
| 7.5. | Espesor y peso promedio | 56 |
| 7.6. | Ensayo mecánico..... | 56 |
| 7.7. | pH Superficial | 57 |
| 7.8. | Ángulo de contacto | 57 |
| 7.9. | Capacidad de absorción de agua | 58 |
| 7.10. | Disolución..... | 58 |
| 7.11. | Permeabilidad al vapor | 59 |
| 7.12. | Ensayos biológicos con microorganismos | 59 |
| 8. | Conclusiones | 62 |
| 9. | Perspectivas | 62 |
| 10. | Bibliografía | 63 |

Índice de cuadros

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Microorganismos predominantes en heridas | 19 |
| Cuadro 2. Promedio de curaciones por semana y tiempo promedio de curación..... | 20 |
| Cuadro 3. Insumos tradicionales utilizados en la curación de heridas | 20 |
| Cuadro 4. Costo en pesos mexicanos de algunos tratamientos | 21 |
| Cuadro 5. Clasificación de apósitos | 22 |
| Cuadro 6. Datos de seguridad de aceite español de romero | 24 |
| Cuadro 7. Microorganismos para prueba microbiológica | 35 |
| Cuadro 8. Controles para la prueba microbiológica | 35 |
| Cuadro 9: Concentración de insulina en membrana completa | 44 |
| Cuadro 10. Capacidad máxima de hinchamiento y volumen por cm ² | 48 |
| Cuadro 11. Estudios referentes a insulina aplicada en heridas | 54 |

Índice de imágenes

| | |
|---|----|
| Imagen 1. Esquema general del proceso de cicatrización. | 14 |
| Imagen 2. Estructura de la quitina. | 26 |
| Imagen 3. Reacción de desacetilación de quitina. | 27 |
| Imagen 4. Estructura general del alginato de sodio. | 28 |
| Imagen 5. Esquema para prueba microbiológica | 36 |
| Imagen 6. Membranas con alta concentración de plastificante | 38 |
| Imagen 7. Membranas con calcio en concentración superior al 0.1 %.. | 38 |
| Imagen 8. Membranas con diferente orden de adición respecto al quitosano. | 39 |
| Imagen 9. Espectros de infrarrojo de componentes | 40 |
| Imagen 10. Espectros de infrarrojo para geles sin insulina y con insulina.. | 41 |
| Imagen 11. Membranas poliméricas | 42 |
| Imagen 12. Identificación de señal de insulina..... | 43 |
| Imagen 13. Curva de calibración de insulina | 43 |
| Imagen 14. Señal de insulina obtenida a partir de membranas en disolución. | 44 |
| Imagen 15. Gráfica de Esfuerzo (N/mm ²) vs deformación..... | 45 |
| Imagen 16. Ensayo mecánico.. | 45 |
| Imagen 17. Evaluación de pH superficial.. | 46 |
| Imagen 18. Evaluación en ángulo de contacto.. | 46 |
| Imagen 19. Prueba absorción de agua.. | 47 |
| Imagen 20. Gráfica de % Hinchamiento vs Tiempo (min) | 47 |
| Imagen 21. Gráfica % Disolución vs Tiempo (min) | 48 |
| Imagen 22. Gráfica de Permeabilidad al vapor (g/m ²) vs Tiempo (min)..... | 49 |
| Imagen 23. Gráfica % Inhibición vs Concentración de membranas. | 50 |
| Imagen 24. Gráficas de % Inhibición vs Concentración con controles..... | 51 |
| Imagen 25. Resumen de las propiedades en la membrana obtenida | 61 |

1. Introducción

A lo largo de la historia, el ser humano ha enfrentado eventos que lo han hecho susceptible a sufrir heridas en la piel, como son las guerras, la caza para obtener alimento, invención de herramientas, accidentes de trabajo, entre otros. Para curar este tipo de heridas, en un principio, el hombre se valió de técnicas que implementaban los animales, como emplastes (mezcla sólida de componentes naturales y líquido, generalmente de tipo acuoso u oleoso) y protección de la herida con hojas. Con el avance de la era moderna, la medicina y la tecnología, las técnicas e insumos dirigidos a la atención de heridas se desarrollaron y optimizaron paulatinamente, y hoy en día, podemos encontrar desde gasas simples de tela para la protección física de las heridas, hasta sistemas complejos como los apósitos elaborados con biopolímeros (1–3).

A pesar de los avances tecnológicos y científicos, en la ingeniería de tejidos enfocados a la regeneración de heridas, actualmente existen diferentes complicaciones que dificultan la regeneración del daño en la piel, siendo una de estas las comorbilidades. Según la Asociación Americana de la Diabetes, 34.2 millones de personas (10,5% de la población total de los Estados Unidos) padecieron diabetes en el 2018 (3). En México, 8 de cada 10 personas sufren de obesidad, lo que las predispone a desarrollar diabetes y “en casos no controlados” úlceras por pie diabético (3,4). Los costos mensuales de la atención de heridas por pie diabético superan los casi de 400 millones de pesos mexicanos y coloca el uso de gasas en el insumo para la cicatrización con mayor empleo durante el tratamiento (5). Otro sector de suma importancia es la población que sufre quemaduras, donde se estima un gasto en etapas pre y hospitalarias, 30 mil y 499 999 pesos mexicanos en casos severos/leve, de 500 mil a 5 millones de pesos mexicanos en casos de severidad moderada, y de 5 a 40 millones de pesos mexicanos en casos severos (6), volviéndolo un problema de suma importancia para la salud pública, con una incidencia de cerca de 13 mil personas al año en México, de las cuales entre el 5 y 8 % es población infantil (7).

Complicando aún más el escenario de las heridas, se suma la resistencia bacteriana la cual visibiliza la necesidad de atacar con moléculas nuevas este sector, ya que para la Organización Mundial de la Salud (OMS) las infecciones por microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, son catalogadas con atención “prioritaria” y “urgente” (8,9). Los datos anteriores reflejan la gran necesidad de innovar en la fabricación de productos que sirvan como apoyo para la regeneración de la piel herida, ya que son un problema que afecta la calidad de vida y la economía de las personas, representando un reto para la salud pública a nivel mundial.

La necesidad de alternativas que se puedan emplear para contrarrestar problemas como la resistencia bacteriana, permite evaluar diferentes métodos de obtención de sistemas enfocados al tratamiento de heridas, así como explorar la combinación de materiales que en conjunto sean una formulación lo más completa posible, dando pauta al reposicionamiento de fármacos, estrategia que permite identificar nuevos efectos y propiedades de las que convencionalmente tienen (8).

En la presente tesis, se utilizaron los conocimientos contemporáneos sobre la gran diversidad de materiales que existen y los antecedentes sobre herbolaria y etnobotánica, para elaborar una membrana polimérica que, en conjunto con fuentes de origen natural, signifiquen un apoyo en el tratamiento de heridas, con la función de una barrera semipermeable, control de humedad y resistencia a la degradación, además de ser biodegradable y biocompatible (10). Las preguntas de investigación que se abordan son: ¿la membrana que se fabricará con biopolímeros, aceite esencial de romero e insulina, será estable, presentará control sobre el crecimiento bacteriano, y mostrará características físicas y mecánicas adecuadas para su posible uso en la terapéutica de las heridas en la piel?

Los biopolímeros son compuestos de origen natural, por ejemplo: el alginato que proviene de algas; el quitosano, producto de la desacetilación de la quitina y componente del caparazón de algunos insectos y crustáceos. Funcionan en una concentración de 0.5-3 % en la formulación y tienen propiedades como lo son la biodegradación y biocompatibilidad (11). Los polímeros tienen cualidades donde pueden interaccionar con iones como el calcio, con el cual forman estructuras mediante entrecruzamiento, donde un ion es rodeado por las cadenas poliméricas y forma enlaces (reversibles o irreversibles), obteniendo estructuras generalmente más rígidas y resistentes (12). Los plastificantes son aditivos, los cuales son moléculas de bajo peso molecular, intercalándose entre las cadenas poliméricas, modificando la temperatura de transición vítrea (T_g), generando productos más elásticos, flexibles o más rígidos y resistentes, siempre dependiendo de su concentración y tipo (13). Una de las técnicas más comunes para producir membranas, es la técnica de solvent-casting que se basa en la evaporación del disolvente, permitiendo la formación de una membrana o película sólida (14). El efecto demostrado por algunos de los componentes, como lo son el quitosano y el aceite esencial de romero, han reflejado efecto bacteriostático y control de crecimiento bacteriano, mediante la obstaculización de la reproducción (15).

Si bien, existen una gran diversidad de heridas, algunas pueden ser atendidas de manera inmediata con el sistema propuesto, tales como son las heridas por úlcera a razón de pie diabético, o las heridas de tipo quirúrgicas, inclusive quemaduras de hasta segundo grado, ya que el sistema está enfocado en heridas de alta incidencia y tamaño delimitado, siendo limitado en heridas abiertas, quemaduras más graves (tercer grado) e inclusive como sistema oclusivo en cirugías.

Esta tesis está compuesta de 6 capítulos, en el marco teórico se dan las bases para comprender la importancia de las heridas como problema de salud pública; en la parte de objetivos e hipótesis, se muestran las metas planteadas para el presente trabajo; en la metodología se explican los pasos para la obtención de una membrana polimérica que presente no solo propiedades adecuadas físicas y mecánicas para su posible uso en heridas, además, que contenga propiedades en el control de crecimiento bacteriano, y contenga aceite esencial de romero e insulina y las pruebas que se realizaron para caracterizar física y mecánicamente la membrana y para evaluar su comportamiento sobre el control de crecimiento bacteriano. En los resultados se muestran los valores obtenidos en las diferentes pruebas realizadas para caracterizar a la membrana polimérica; en la discusión, se presenta una comparativa de los resultados con diferentes artículos y proyectos similares ya publicados. Finalmente, en la conclusión se presenta de manera general que las metas planteadas fueron logradas y la respuesta a la pregunta de investigación.

2. Marco teórico

En el presente capítulo se llevó a cabo una revisión teórica acerca de los principales puntos que se involucran cuando hablamos de heridas. Comenzando con la parte fisiológica de las heridas y la piel, puntualizando la reacción y fenómenos celulares que se llevan a cabo al generarse un daño, seguido de la delimitación en México, revisando la epidemiología presente, así como el panorama general entre causas y efectos, contemplando no solo el impacto social que una herida representa, y exponiendo información que ejemplifique el impacto económico de las mismas. Finalmente, se muestran las cualidades e información de los componentes utilizados en el sistema propuesto.

2.1. Piel

Es el órgano más grande del cuerpo, con un gran número de funciones siendo algunas de las principales: protección y comunicación entre el medio interno y externo, regulación térmica, almacenamiento de agua y grasa (16).

Las capas de la piel se dividen en:

- Epidermis: es la capa externa de la piel y contiene células escamosas como las correspondientes al estrato córneo y las basales, que son la base de la epidermis.
- Dermis: es la capa intermedia de la piel y contiene: vasos sanguíneos, folículos capilares, glándulas sudoríparas y estructuras de colágeno, además de fibroblastos, nervios y glándulas sebáceas, siendo esta capa la que le da a la piel flexibilidad y fuerza, conteniendo por sobre todo los receptores de dolor y tacto.
- Hipodermis: capa grasa subcutánea más profunda, constando de una red de colágeno y grasa las cuales ayudan al cuerpo a mantener la regulación térmica, así como células para posterior reparación de daños a la piel en general.

Sin embargo, a pesar de las diferentes funciones que tiene la piel, está expuesta a diferentes situaciones y fenómenos que pueden dañarla.

2.2. Herida

Una herida puede definirse como el daño que sufre un determinado tejido, a causa de un agente físico o químico. Tras una herida viene un proceso de recuperación o cicatrización, éste puede definirse como el proceso mediante el cual los tejidos van a reparar el daño que sufrieron, interviniendo un gran número de procesos químicos celulares y que se desarrollan en un tiempo determinado, dependiendo de la gravedad de la herida (17). El tipo de herida puede clasificarse de manera general en agudas y crónicas. Las agudas son aquellas que se curan sin complicaciones, caracterizándose por una recuperación óptima. Por otro lado, las heridas crónicas son aquellas en las que el tiempo de sanación es mayor, existe una inflamación severa y baja oxigenación en la zona, lo que dificulta su recuperación (18). Así mismo, las heridas agudas y crónicas se clasifican en:

- Heridas Agudas:
 - Heridas cortantes: hechas con un objeto afilado como lo son navajas, cuchillos o vidrios, se caracterizan por tener bordes limpios y una baja hemorragia (19).
 - Punzantes: causadas por objetos puntiagudos como clavos, anzuelos, mordeduras. Es de importancia ya que la profundidad que tome puede dañar órganos vitales, siendo una de sus mayores complicaciones el tétanos (19).
 - Raspaduras: producidas por fricción con superficies duras, donde se pierde la capa externa de la piel, produciendo ardor y dolor. Regularmente, son de fácil infección (20).
 - Aplastamientos: cuando las partes del cuerpo son atrapadas o presionadas por objetos pesados, incluyéndose fracturas internas o externas, con riesgo de hemorragia (21).
 - Quemaduras: lesiones producidas por contacto con agentes térmicos, químicos o físicos que laceran la piel, generando desde inflamación hasta muerte celular. Existen 3 grados o niveles: primer grado (es una herida superficial, causando solo inflamación, dolor, y eritema generalmente), segundo grado (se pierde la epidermis, presentando exudado, ampollas dolorosas, deteriorando estructuras como los folículos pilosos y glándulas sudoríparas) y tercer grado (son las más graves, se afecta totalmente dermis y epidermis, afectando tanto músculo como sistema nervioso con una pérdida de sensibilidad en la zona de la quemadura debido al daño, pero con dolor intenso en las zonas que aún preserven su sensibilidad).

Las infecciones y el daño interno son el principal reto en la recuperación de este tipo de heridas (22).

- Heridas Crónicas (23) :
 - Úlceras por presión: este tipo de heridas se presentan en personas con muy baja o nula movilidad, se generan por permanecer extensos periodos de tiempo en una misma posición, generalmente en cama. Iniciando con una inflamación, empeorando hasta producir una úlcera y finalmente se produce un cráter significativo (24).
 - Úlceras vasculares: hay de tipo arterial, venoso o mixto, dan origen a la baja oxigenación de la zona y baja irrigación sanguínea por lo general (25).
 - Úlceras neuropáticas: de origen secundario, una de sus causas es el mal control de la diabetes, generando pérdida de sensibilidad, inflamación y una desregulación, en la zona afectada (26).
 - Úlceras neoplásicas: relacionadas con eventos tumorales, requieren cirugía (27).

2.2.1. Cicatrización

La cicatrización es un proceso que el organismo utiliza para reparar el daño en un determinado tejido, en el intervienen diversas rutas de señalización que las células realizan (28). El proceso de recuperación será más acelerado o lento, dependiendo de factores como: la edad, la superficie de la herida, la vascularización, si hay o no una infección, las alteraciones del individuo, enfermedades presentes y el tipo de fármacos que se utilicen en el tratamiento de recuperación, entre otros (29). En la fase de inflamación, la acción inicial se da mediante la interacción entre la colágena y las plaquetas, a través de diversos mediadores en esta señalización, como la fibronectina, propiciando la desgranulación e inicio de la cascada de coagulación. Como parte del proceso, las primeras células en intervenir son los neutrófilos, catalogados como la primera línea de defensa, los cuales comienzan a atacar las bacterias que pudieran comenzar un proceso infeccioso, esto mediante patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), por patrones de reconocimiento (RRP) o mediante el reconocimiento directo de bacterias opsonizadas por receptores (Fc). La desgranulación de la superficie de los neutrófilos y la extrusión de ácidos nucleicos, crean un medio antimicrobiano en el sitio de inflamación. Posteriormente, entre las 24-48 horas, intervienen los monocitos, quienes sufrirán los cambios necesarios para convertirse en macrófagos activados, dando paso a señalizadores de factores de crecimiento, como las interleucinas.

En la fase de proliferación, se lleva a cabo el proceso de epitelización, es estimulado por los factores de crecimiento EGF y el factor transformante alfa TGF- α , los cuales se promueven por las interleucinas. También es llevado a cabo el proceso de angiogénesis, éste es uno de los procesos críticos para una adecuada recuperación de la herida, ya que sin ella no se podrían transportar los nutrientes a células como fibroblastos, encargados de la síntesis de colágeno, quienes también estimulados por los factores de crecimiento derivados de plaquetas. Por último la fase de remodelación, es donde se van formando capas de colágeno y va recuperando el espesor de la herida (30).

El proceso de cicatrización podría dividirse en 4 partes (29):

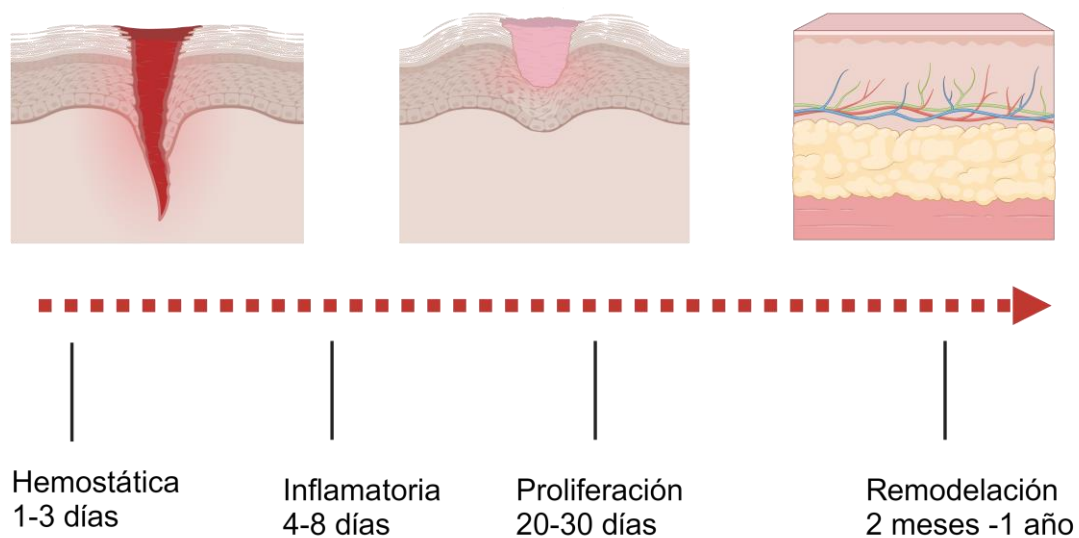


Imagen 1. Esquema general del proceso de cicatrización. Elaboración propia en <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

El proceso de recuperación de una herida no solo depende de los factores individuales del paciente, ya que se ven involucrados otros puntos fuera de su alcance.

2.3. Epidemiología de heridas en México

Existen una gran diversidad de fenómenos y padecimientos por los que una persona puede sufrir una herida en piel, sin embargo, algunos de ellos generan de manera crónica daños tan graves que pueden ser irreversibles.

2.3.1. Enfermedades y heridas

El Síndrome Metabólico, es el conjunto de padecimientos conformado por: diabetes, hipertensión, hiperlipidemia y obesidad, esto conlleva en muchas ocasiones a un estado donde el paciente presenta alteraciones vasculares, que concluyen en daños celulares provocando heridas a forma de úlceras, que se agravan generando dolor y complicaciones de índole infecciosa. Para el 2018, de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, de 82,767,605 personas mayores a 20 años, el 10.32% (8 542 718) reportó contar con un diagnóstico médico previo de diabetes mellitus (4,31).

Es de interés conocer este panorama, ya que la diabetes es el integrante del Síndrome Metabólico más propenso a generar heridas de importancia, con estadísticas, tales que, un paciente diabético tiene hasta un 25 % de posibilidad de generar una úlcera (32).

Desde el punto de vista económico, se estima que el costo del manejo de una herida por pie diabético puede llegar a ser de hasta 300,000 pesos. Una herida infectada en un paciente diabético puede resultar desde la necesidad de una degradación hasta requerir la amputación de parte de una extremidad, inclusive una extremidad completa (33).

2.3.2. Quemaduras

Según datos de la Secretaría de Salud, “en México cada año cerca de 13 mil personas sufren quemaduras y entre el 5 al 8 % es población infantil” (7). Las técnicas para el tratamiento de este tipo de heridas van desde el manejo clásico, que utiliza apósitos de tela con cremas y ungüentos, para promover la recuperación de la piel, manteniendo humedad y funcionando como barrera, además, de ser necesario, se debe realizar desbridamiento, para retirar las escaras que impidan el crecimiento de nueva piel. Actualmente, se utilizan técnicas basadas en injertos de piel, hidrogeles con promotores del crecimiento celular y nuevos tipos de apósitos, que permitan un manejo menos doloroso al ser aplicados y retirados, con características que promueven una recuperación más acelerada y “en un ambiente” donde las bacterias no proliferan con facilidad.

En ese sentido, es necesario tener en cuenta que un paciente con quemaduras enfrentará un impacto económico muy alto, estimándose un gasto en etapas pre y hospitalarias entre 30 mil y 499 999 pesos, en casos severos/leve; de 500 mil a 5 millones de pesos, en casos de severidad moderada y, de 5 a 40 millones de pesos, en casos severos (6).

2.3.3. Cirugías

Día con día, en hospitales se efectúan diferentes procedimientos quirúrgicos. En 2019, 1, 400,000 intervenciones quirúrgicas se llevaron en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (34). Desde ese aspecto, la necesidad de nuevos productos en el uso cotidiano para la recuperación de una herida, en el ambiente hospitalario, es de suma importancia, ya que faltaría agregar a estas cifras los procedimientos donde no es necesario una intervención dentro de un quirófano.

2.3.4. Enfermedades de la piel

Las enfermedades específicas de la piel son otra fuente de heridas. En México, existen reportes de una serie de enfermedades que afectan a la población mexicana y que abordaremos a continuación (35). Dentro de los indicios que nos pueden dar pauta para inferir una afección en la piel están (36) :

- Protuberancias rojas o blanca
- Sarpullido
- Piel escamosa
- Úlceras
- Llagas
- Piel seca o agrietada
- Enrojecimiento

Algunas razones que originan o predisponen al individuo este tipo de patologías son:

- Bacterias
- Hongos
- Virus
- Inmunocompromiso
- Transmisión
- Enfermedades genéticas
- Problemas endocrinos

Según la Fundación Mexicana para la Dermatología (37), en México prevalecen 2 tipos de afectaciones en piel:

- Dermatitis atópica: Enfermedad de tipo crónico caracterizada por inflamación, en donde se acompaña de una sensación irritativa y descamativa. Comúnmente, en infantes menores a 3 años, se ve una evolución y se asocia con enfermedades como asma, rinitis alérgica y alergia alimentaria. Se estima que en México existen al menos 12 millones de personas en México con DA (38).
- Acné: Se presenta principalmente en las áreas de cara, cuello y “en general” en la parte superior del cuerpo. Es causado por razones como: factores hormonales, seborrea, herencia, y bacterias como: *Corynebacterium acnés* y *Estafilococo blanco coagulasa negativo*, bacterias que son parte de la flora normal de la piel, pero que se visualiza como brotes o quistes blanquecinos, llegando a producir gran dolor en casos severos. Su tratamiento es muy diverso, sin embargo, en muchas ocasiones es erróneo, lo cual deriva en un daño grave de la zona afectada, concluyendo en cicatrices profundas y una pigmentación de la piel debido al daño (39). En datos de la Fundación Mexicana para la Dermatología, es la primera causa de consulta dermatológica en México, iniciando en mujeres después de los 10 años y en hombres después de los 12, siendo entre los 16 y 19 años la etapa donde se agudiza la problemática. Se estima que alrededor del 80 % de la población mexicana lo padece, donde el 70 % de los masculinos va a desarrollarla en un nivel grave. Los recientes eventos de SARS COV-2, han reportado alteraciones en piel debido al uso de las mascarillas, lo cual ha desencadenado un aumento en este tipo de problemas (40).

2.4. Microorganismos en heridas

Existen diversas razones por las cuales una herida puede tener complicaciones durante el tiempo de su recuperación, por ejemplo (29):

- La edad y enfermedades del paciente
- La magnitud de la herida
- La zona de la herida
- Una mala asepsia
- Un farmacológico inadecuado
- Un proceso infeccioso

Este último punto, en la actualidad ha cobrado mayor relevancia, debido a la resistencia bacteriana, lo cual significa que los tratamientos que hay en el mercado, ya no presentan la efectividad con la que contaban, en el combate de infecciones por microorganismos.

El proceso infeccioso es bien conocido, y podría ser resumido en 5 etapas (41):

- Contaminación: los microorganismos están presentes, sin observar indicios de infección sobre la herida ni causar impacto significativo que cause síntomas en el infectado. El número de células viables es muy bajo.
- Colonización: los microorganismos están por debajo del límite, no hay señales de infección clínicamente visibles, ni en la zona de la lesión ni en general, en el paciente.
- Infección local: se presenta un incremento de exudado y en ocasiones también de sangrado en la zona de la lesión, con una desgranulación activa en conjunto un claro retraso en el proceso de la cicatrización, además, podemos encontrar eritema, aumento del dolor en la zona y en las zonas de su alrededor, y en la mayoría de las ocasiones, mal olor.
- Extensión de la infección: la piel comienza a endurecerse en la zona de la herida y su perímetro, retrasando la recuperación del tejido; la zona de la inflamación supera los 2 cm alrededor de la herida, puede presentarse crepitación y, además, la mayoría de los síntomas que se presentan durante una infección, como lo son: fiebre, temblor general, dolor muscular, aumento o variaciones en la frecuencia cardíaca, dolor de cabeza y malestar general. En este punto, la zona de la herida puede incluso aumentar.
- Infección sistémica: en este punto la infección alcanza un punto general, donde se distribuye a más zonas en el paciente. Se puede presentar mareos, dolores de cabeza intenso, letargia, pérdida de apetito, fiebre alta. El cuidado de la infección es vital, ya que puede concluir en una sepsis y posterior, en la pérdida de la vida del paciente.

Dentro de los microorganismos responsables de infecciones en heridas, predominan los mencionados en el cuadro 1.

Cuadro 1. Microorganismos predominantes en heridas (42)

| Clasificación | Microorganismo |
|----------------------|--|
| Gram (+) | <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus spp.</i> |
| Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> |

La dificultad de combatir una infección bacteriana no solo radica en todo lo que conlleva el proceso infeccioso y la presencia del microorganismo en sí.

Actualmente, uno de los más grandes retos en el combate contra las infecciones en el ámbito clínico/hospitalario, se direcciona a la resistencia bacteriana, por lo que la ciencia cuenta con la gran meta de encontrar nuevos métodos y fuentes de moléculas, con actividad antibacteriana. Debido a ello, la investigación acerca de nuevos materiales con funciones adicionales a la protección que pueda ofrecer, son de gran interés.

2.5. Insumos: atención e impacto económico

Al existir una gran diversidad de razones, por las que se genera una herida, debemos tener presente que existen 2 factores fundamentales: tiempo e insumos, ya que una herida requiere cuidados y curaciones, en conjunto de un uso variado de recursos, dependiendo de la gravedad. El tiempo en el tratamiento es un recurso invaluable, el cual puede dimensionarse en el cuadro 2, donde se exponen algunos tipos de heridas y la manera en que se emplea este recurso en su atención.

Cuadro 2. Promedio de curaciones por semana y tiempo promedio de curación (n = 36 022) (5)

| Tipo de Herida | Promedio de curaciones por semana | Promedio de tiempo en minutos por curación |
|----------------------------|--|---|
| Heridas Traumáticas | 2.9 | 21.9 |
| Úlceras de pie diabético | 3.7 | 22.4 |
| Lesiones por presión | 2.9 | 20.9 |
| Úlceras vasculares | 2.7 | 26.7 |
| Dehiscencias quirúrgicas | 3.0 | 21.8 |
| Quemaduras | 3.1 | 22.0 |
| Heridas neoplásicas | 5.5 | 20.6 |
| Lesiones por Incontinencia | 3.2 | 21.6 |
| Media | 3.4 | 22.2 |

Los insumos utilizados en el tratamiento de heridas impactan directamente a la organización hospitalaria, ya que algunos de ellos son usados en el 90 % de los tratamientos a heridas, tal y como se presenta en el cuadro 3.

Cuadro 3. Insumos tradicionales utilizados en la curación de heridas (n = 36 022) (5)

| Insumos Tradicionales | Promedio de cantidad por curación | Frecuencia de uso (%) |
|------------------------------|--|------------------------------|
| Gasas convencionales | 13.9 (pieza) | 95.3 |
| Tela adhesiva | 16.0 (cm) | 57.7 |
| Venda elástica (10 cm) | 1.4 (pieza) | 47.7 |
| Tela transparente | 17.2(cm) | 17 .6 |
| Apósito de algodón | 1.8 (piezas) | 8.1 |

Económicamente, las heridas son un golpe directo a los recursos del sector salud, ejemplo de ello, los costos presentados en el cuadro 4.

Cuadro 4. Costo en pesos mexicanos de algunos tratamientos (n = 36 022) (5)

| Tipo de herida | Costo mensual en pesos mexicanos (atención ambulatoria) | Costo mensual (atención hospitalaria) |
|--------------------------|--|--|
| Heridas traumáticas | 17 520 599.65 | 389 975 080.76 |
| Úlceras de pie diabético | 11 029 189.80 | 398 388 469.99 |
| Lesiones por presión | 2 647 210.96 | 715 416 914.19 |
| Úlceras vasculares | 8 628 456. 22 | 91 060 396.40 |
| Dehiscencias quirúrgicas | 2 552 137.03 | 148 373 352.92 |
| Quemaduras | 3 188 899. 12 | 86 132 540.24 |
| Heridas neoplásicas | 996 577 .99 | 34 777 682 .38 |
| Total | 46 563 070.76 | 1 864 124 436. 89 |

Debido a esta problemática económica, la búsqueda de mejores tratamientos para la recuperación de heridas es una cuestión que está dentro de los temas principales de la investigación por razones, como mejorar la calidad de recuperación del paciente y a un bajo costo. Ofrecer sistemas que reduzcan el tiempo de atención a una herida, el costo, ofreciendo control sobre el crecimiento bacteriano, representaría una alternativa viable para la salud pública.

2.6. Apósito/membrana

Un apósito es un material con determinada estructura para imitar algunas funciones de la piel, promoviendo una adecuada cicatrización.

Los requisitos que se deben tener favorablemente en un apósito son (43):

- Mantener un ambiente húmedo que favorece la granulación.
- Fungir como barrera entre una herida y el ambiente, protegiéndola de posibles contaminaciones.
- Tener la capacidad eliminar exudado y absorberlo.
- De manejo sencillo y económicos.
- De remoción sencilla y que no dañe o genere un mayor traumatismo.
- Que no obstaculice la valoración de la herida y no genere olores.

Existe una gran diversidad de apósitos, en el cuadro 5 se muestra su clasificación.

Cuadro 5. Clasificación de apósitos (5)

| Especificación | Clasificación |
|----------------------------|---|
| Estructura | Tradicional o avanzado |
| Origen | Natural o sintético |
| Interacción con el exudado | Permeable, Semipermeable u Oclusivo |
| Funcionalidad | Pasivo, Interactivo o Bioactivo |
| Efecto Biológico | Formación de tejido, Hemostático, Formación de tejido de Granulación, Manejo de exudado, Antigénico |

Dentro de los beneficios que ofrecen algunos de los nuevos sistemas de apósitos se encuentran (44):

- Ambiente húmedo
- Fácil inspección de la herida
- Biodegradabilidad
- Biocompatibilidad con el paciente
- Disminución de curaciones invasivas en la zona afectada
- Disminución de escaras

La posibilidad de incorporar componentes con diversas funciones y actividades, a este tipo de sistemas, representa la oportunidad de aprovechar recursos de origen natural y considerar su relevancia no solo como métodos o insumos tradicionales utilizándolos en técnicas avanzadas contemporáneas.

2.7. Las plantas en la medicina

El uso de plantas y fuentes naturales con orientación medicinal es una actividad que se ha practicado durante toda la historia de la humanidad. La búsqueda por encontrar sustancias que tengan efectos terapéuticos ha llevado al ser humano a investigar principalmente su entorno, siendo su fuente de primera mano las plantas y la naturaleza. Un ejemplo sobre una molécula activa, derivada de la investigación dentro de la naturaleza, es el caso de la aspirina, la cual fue perfeccionada por el Dr. Félix Hoffman en 1897, como ácido acetilsalicílico, con base al antecedente de un compuesto “milagroso” obtenido a partir de la corteza del árbol del Sauce, que era investigado y reportado por científicos como, Edward Stone y Charles Frederick Gerhart (45).

Es así como a la par de las rutas sintéticas de nuevas moléculas activas, se desarrolla una gran labor de investigación utilizando las fuentes naturales como fuente de moléculas con actividad curativa. México, puede presumir de una base histórica en botánica y herbolaria medicinal, que se encuentra documentada.

Nuestros antepasados, adquirieron conocimientos sobre este tipo de remedios y tratamientos basados en plantas medicinales en forma empírica, estos dieron origen, por ejemplo, a textos como *el Libellus Medicinalibus Indorum Herbis*, el cual es considerado el primer libro de plantas medicinales en América, el cual fue escrito en México (46). Por todo esto dentro de la ciencia en México se mantiene de aplicar esta información en investigaciones actuales.

México cuenta con acervo de aproximadamente 4500 variedades de plantas medicinales, y para la población continúa siendo un recurso para su vida cotidiana, el 90 % de la población asegura haber utilizado algún remedio natural durante su vida (47).

Extractos de origen vegetal, como lo son los aceites (ej. aceite de romero), presentan un efecto de control bacteriano, contienen una mezcla de componentes con actividad antiinflamatoria, antioxidante y se emplean en el tratamiento de heridas. Continúan siendo un recurso con futuro (48).

2.8. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

Pertenece a la familia *Lamiaceae*, una de las más grandes, tiene un acervo de más de 7000 especies (48). Algunos de sus miembros más importantes son: tomillo, albahaca, romero, menta, orégano y salvia al igual que hierbabuena. Una característica de esta familia es el contener polifenoles, saponinas y algunos alcaloides, entre otros componentes (49). El romero, es una planta de hojas aromáticas y color verde, de entre 1 y 2 metros de altura. Su principal uso es en cosméticos (fragancias), alimentos (saborizantes y aditivos), así como para mejorar la vida de anaquel. Dentro de sus propiedades biológicas se han identificado: efecto antiinflamatorio, antihelmíntico, antitoxigénicos, antimicrobianos, entre otros (48). La variedad de los componentes del romero, lo convierten en una planta con gran potencial. Dentro de los principales metabolitos se encuentran flavonoides como la diosmetina y diosmina, algunos terpenos como la rosmar quinona o el ácido oleanólico. Dichas moléculas fenólicas, le transfieren una capacidad natural de atrapar radicales libres, por lo tanto, funciona como un antioxidante natural (50).

Además, su composición varía dependiendo del tipo de extracción y manejo, se puede encontrar la siguiente composición según la literatura, en el caso del romero: piperitona (21,9 %), α -pineno (14,9 %) y linalool (14,9) (51).

Se ha comprobado que el ácido rosmarínico incrementa la producción de prostaglandina E2 y reduce la producción de leucotrieno, al igual que inhibe el sistema del complemento. El ácido carnósico y el carnosol, representan el 90% de la actividad antioxidante y captación de radicales libres (52). De manera particular, la seguridad en el uso de aceite de romero lo convierte en un gran candidato para ser utilizado en sistemas enfocados al tratamiento de heridas, tal y como se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Datos de seguridad de aceite romero de origen español (53)

| Toxicidad aguda | Dosis | Animal |
|------------------------|--------------|---------------|
| DL 50 oral | 4400 mg/ kg | Rata |
| DL 50 cutánea | No relevante | -- |
| DL 50 inhalación | 11 mg/L | Rata |

DL50: Dosis letal 50

La actividad antibacteriana del aceite esencial de romero presenta intervalos desde 7 a 9 mg/ml (54), sin embargo, el margen de seguridad que tiene permite abrir la posibilidad de utilizar intervalos mayores de confianza. El reto del uso de los aceites radica en estabilizarlos en sistemas que permitan su contención y uso de manera segura.

2.9. Polímeros

Son moléculas grandes conformadas por subunidades generalmente repetidas, denominadas monómeros, con carbono e hidrogeno como componentes estructurales. Dentro de este concepto, encontramos los dos principales tipos de polímeros: naturales y sintéticos. Algunas cualidades de los polímeros, como flexibilidad y rigidez, dependen de su longitud y peso molecular, de los grupos funcionales presentes, además de otros componentes. Dependiendo como se manejen, se puede generar productos duros o suaves, con porosidad o no, si se desea (55).

Estructuralmente, hay de 3 tipos de polímeros:

- Lineales: cadenas de monómeros ordenados y repetidos uno tras otro (56).
- Ramificados: cadenas de monómeros ordenados, con extensiones en puntos específicos de otros grupos funcionales o monómeros de igual forma (57).
- Entrecruzados: contienen uniones entre ellos o con otros polímeros, adquiriendo mayor estabilidad y fuerza, entre otras propiedades. Con respecto al peso molecular, generalmente, está determinado por la extensión de monómeros que lo conforman. Además, dicha extensión, también brinda propiedades como elasticidad y flexibilidad.

Una propiedad que pudiera verse afectada por dicha longitud o conformación es la temperatura de fusión (T_m) y la temperatura de transición vítrea (T_g). T_m determina el grado de rigidez, dureza y fragilidad del material, y T_g la temperatura que afecta la estructura de nuestro material pasando de un estado cristalino a tener flujo y cierta viscosidad. Tanto T_g como T_m pueden ser medidos a través de un Termograma, en un estudio de calorimetría diferencial de barrido (DSC) (55).

2.10. Pluronic F-127

También nombrado poloxámero 407, es un tensoactivo no iónico, generalmente de color blanco, presentado en forma de gránulos ceroso, químicamente conformado por cadenas de unidades de polioxietileno-polioxipropileno. A bajas concentraciones, puede formar micelas, sin embargo, en concentraciones altas forma agregados hidrofóbicos con un centro hidrofílico, lo cual lo caracteriza sistema con posible aplicación en sistemas de liberación. Las soluciones con poloxámero son estables bajo condiciones ácidas y básicas, incluso cuando hay presencia de iones metálicos (58). Otro punto importante, relacionado a la concentración de este polímero es la temperatura de transición en un estado gel a un estado de solución, el cual aumenta o disminuye en función a la concentración, al igual que la temperatura a la cual se lleve a cabo este cambio (59).

Clasificados como polímeros no tóxicos por la FDA, han sido aprobados para su uso en dispositivos médicos e implantes, debido a su biocompatibilidad, además de que, dado a su comportamiento, se ha visto que alcanza una gelificación variable, dependiendo de su concentración (60) .

2.11. Quitosano

El quitosano es producto de la desacetilación de la quitina, una sustancia presente en forma abundante en la corteza protectora de algunos insectos hongos y “principalmente” crustáceos, presenta una conformación lineal la cual puede ser variable dependiendo del grado de desacetilación que presente, lo cual se traduce en un producto de alto o bajo peso molecular.

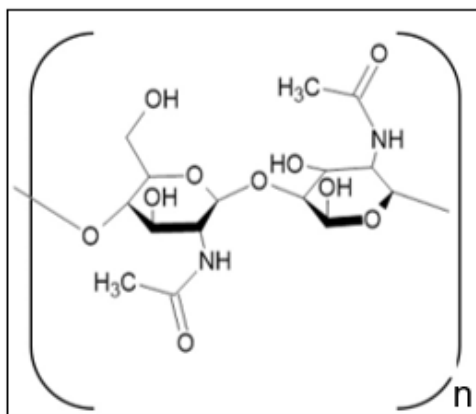


Imagen 2. Estructura de la quitina. Elaboración propia en ACD/ChemSketch.

Esta de desacetilación es llevada a cabo mediante un álcali fuerte, en la cual se sustituyen grupos acetamido por grupos amino. Algunas de las propiedades, que muestran al quitosano como un polímero de interés es la linealidad de su estructura, conformada por unidades repetitivas de N-acetil glucosamina y glucosamina, lo que transfiere resistencia al producto donde se utilice, es biodegradable, de fácil aplicación, y si bien su solubilidad, posterior al tratamiento, podría significar un problema, se compensa mediante el uso de diferentes plastificantes como sorbitol, glicerol o etilenglicol.

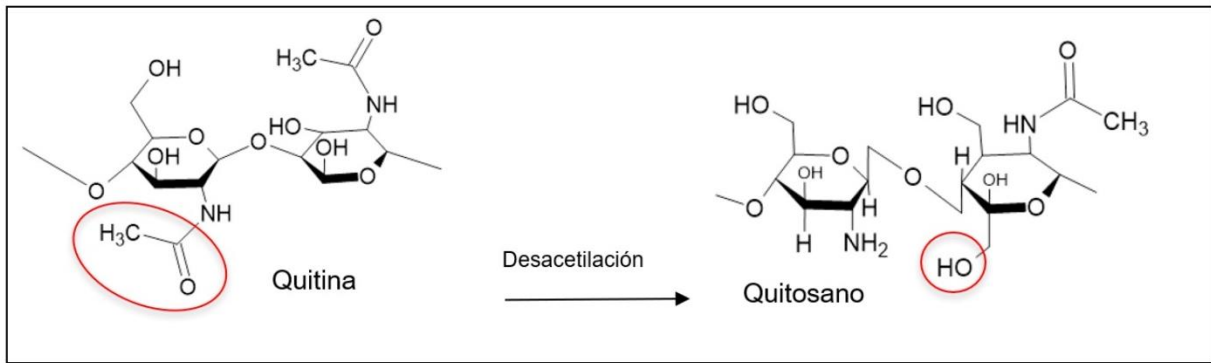


Imagen 3. Reacción de desacetilación de quitina. En círculos rojos se representa la pérdida del grupo acetilo. Elaboración propia con ACD/ChemSketch.

El quitosano, además, presenta actividad antibacteriana mediante 3 vías (61) :

- La superficie iónica desestabiliza, de la pared celular, entre los grupos de protonados NH_3^+ del quitosano y los residuos negativos de la bacteria.
- La inhibición de la síntesis de ARNm y proteínas.
- El recubrimiento de superficie de los microorganismos y quelar provocando la supresión de nutrientes esenciales.

El uso de apósitos para heridas es una de las aplicaciones médicas más prometedoras para el quitosano, debido a su naturaleza adhesiva en conjunto con su carácter bactericida y antifúngico, y su permeabilidad al oxígeno, propiedades asociadas al tratamiento de heridas y quemaduras (62,63).

2.12. Alginato

Es un biopolímero que se extrae generalmente de algas cafés, con una alta solubilidad en agua. Su uso es tanto alimentario como cosmético y en la industria farmacéutica se utiliza para la formulación de hidrogeles como buen emulsificante, en apósitos para heridas y quemaduras, quelante de metales pesados, andamiaje en ingeniería tisular y liberación controlada, entre otras propiedades (64). Como actividad biológica, el alginato puede mejorar la cicatrización de heridas al estimular a los monocitos para que produzcan niveles elevados de citoquinas como la interleuquina-6 y el factor de necrosis tumoral- α (63). La producción de estas citoquinas, en los sitios de las heridas, da como resultado factores proinflamatorios que son ventajosos para la cicatrización de heridas.

Estructuralmente, el alginato está compuesto por bloques de β -D-manurónico y α -L-gulurónico, distribuidos de una forma no homogénea a lo largo del polímero (65).

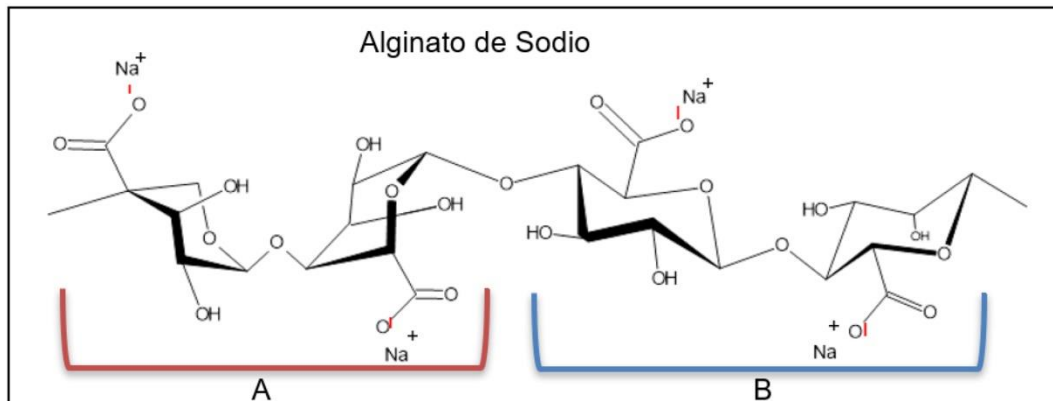


Imagen 4. Estructura general del alginato de sodio. En rojo (A) se presentan los bloques α -L-gulurónico y en azul, se presentan los bloques de β -D-manurónico (B). Elaboración propia con ACD/ChemSketch.

Las características de las cadenas poliméricas del alginato también dependen de la zona donde se extraigan las algas y el método de su extracción y purificación, lo cual hace que la variabilidad en propiedades físicas de este polímero sea muy diversa (66). Al modelo, donde el alginato forma una estructura cerrada en conjunto con el catión, se le conoce como modelo de “caja de huevo”, y es de gran utilidad, ya que es una forma de modificar la solubilidad del alginato y mejorar su resistencia (67).

2.13. Insulina en heridas

Es una hormona que regula los niveles de glucosa en la sangre, es secretada por las células beta en el páncreas, tiene un peso de cerca de 5.8 KDa, también se encarga de regular el metabolismo de lípidos y proteínas (68).

Actualmente, la insulina comercial se puede clasificar en:

- Convencionales: regular o rápida
- Premezclada: mezcla entre rápida y de acción intermedia
- Análogos de insulina: análogos de acción rápida y lenta
- Lispro
- Aspart
- Glulisina
- Glargina

Es importante considerar los tipos de insulina existentes, ya que la actividad varía dependiendo del tipo seleccionado. En la literatura, se ha reportado el uso de insulina mejora la capacidad de cicatrización en modelos in vivo e in vitro, no solo promoviendo un cierre en menor tiempo, además promueve la proliferación de las células de dicho proceso, propiciando un cierre de mejor calidad (69–71). En algunos estudios se ha comparado el efecto de solución salina contra una solución de insulina, con resultados significativos, demostrando una recuperación mayor, en el mismo tiempo de aplicación, incluso un 40% mayor (72). Generalmente la vía de uso es la tópic, mediante soluciones o directamente del vial, sin embargo, actualmente existen propuestas de administración vía nanopartículas de PLGA inyectadas en la zona, demostrando efectividad (73). Si bien algunos de los múltiples tratamientos de heridas incluyen apósitos con sales de plata o zinc, se ha demostrado que incluso ante este tipo de tratamientos tiene mayor efectividad si se complementa con insulina (74)

El mecanismo de la insulina en las heridas no es totalmente claro, sin embargo, la ruta más aceptada es la siguiente: al interactuar con los receptores de factores de crecimiento ubicados en las células, se desenvuelve como si fuera el factor de crecimiento insulínico, de tal manera que ocurre una serie de reacciones donde, se activa la vía Ras/Raf, activando la MEK y la EPK (vía de las proteína cinasas activadas por mitógenos), vías encargadas de señalar e iniciar la proliferación de fibroblastos y queratinocitos; además de que, a razón de esta activación, se hacen presentes factores como el VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), el IGF-I e IGF-II (factores de crecimiento similares a la insulina) y el TGF- α (factor de crecimiento transformante alfa) (75).

Los métodos que estudian el efecto de la insulina abarcan técnicas donde se cuantifica expresión de genes o proteínas, y también, técnicas donde visualmente es apreciable el efecto, ya sea in vivo, directamente en heridas tanto en humanos como en animales, o in vitro, directamente sobre líneas celulares (62). De manera general, conocer los puntos críticos que participan en una herida, de manera directa e indirecta, permite visualizar la magnitud del problema, por lo que recabar información acerca de la fisiopatología de las heridas, la epidemiología de un área determinada, los puntos de impacto económico y social y las propiedades que transferirán los componentes a nuestra membrana polimérica, permitirá plantear una estrategia para los objetivos planteados.

3. Objetivo

3.1. Objetivo General

Elaborar una membrana conformada con biopolímeros, aceite esencial de romero e insulina, y probar su posible actividad antibacteriana contra algunas de las principales bacterias que infectan heridas.

3.2. Objetivos particulares

- Estandarizar la fabricación de una membrana polimérica con aceite esencial de romero e insulina incorporados.
- Caracterizar física y mecánicamente la membrana obtenida.
- Evaluar su posible potencial antibacteriano sobre bacterias de interés clínico.

4. Hipótesis

La membrana fabricada a base de polímeros contendrá incorporados aceites de romero e insulina, presentará propiedades adecuadas para el tratamiento de heridas en piel y efectos sobre el control de crecimiento bacteriano.

5. Metodología

En este capítulo, se presentan los diferentes métodos mediante los cuales se elaboraron las disoluciones y mezclas necesarias para obtener la membrana polimérica, y el planteamiento de diferentes pruebas físicas, mecánicas y bacteriológicas, así como las respectivas metodologías, bajo las cuales serán sometidas las formulaciones seleccionadas.

Estos resultados permitirán determinar la posibilidad de obtener una membrana de características adecuadas, con componentes oleoso y proteínico como la insulina.

5.1. Solución de quitosano

Como medio de disolución se utilizó ácido acético al 1 % v/v. El quitosano utilizado fue de bajo peso molecular marca ALDRICH Lot #BCCC6268, el cual se disolvió mediante una parrilla de agitación magnética a 40°C, durante 2 horas aproximadamente.

5.2. Obtención de gel base.

Para la obtención de las membranas base, se utilizó la técnica de solvent-casting, con las siguientes proporciones de los componentes: alginato 2% m/v, polivinilpirrolidona K-30 0.3% m/v, y quitosano 5.6% v/v; como plastificantes se seleccionó: propilenglicol 7% m/v y sorbitol 14% m/v. Como agente entrecruzante, se utilizó cloruro de calcio 0.03 % m/v. En forma molécula activa contra el crecimiento bacteriano, se utilizó aceite de romero 4%.

5.3. Elaboración de mezcla Pluronic 127 hidrogel e insulina

Se preparó una solución de Pluronic F-127 marca, SIGMA Lot # BCBV8048 al 16% p/v, en condiciones de temperatura entre 5-6 °C. Una vez solubilizado, se adicionó 1 ml de poloxámero por cada ml de insulina marca AURAX (insulina humana recombinante de acción intermedia), en concentración teórica de 50 UI / mL. En todo momento, la mezcla se conservó en un cuarto frío hasta su uso.

5.4. Fabricación de membranas

Se evaluaron diferentes concentraciones de cada componente, hasta obtener las proporciones adecuadas, analizando las características cualitativas del producto final. Para la fabricación de las membranas, se pesó una masa de 15 gramos de gel base y se les adicionó 20 mL de agua destilada, para facilitar el moldeado. Se vertió la mezcla sobre cajas petri de vidrio y se dejó secar durante 2 días, a temperatura ambiente. Una vez obtenida la membrana seca, se midió el volumen necesario de la mezcla poloxámero-insulina, para obtener un total de 50 UI en la membrana, se aplicó sobre la membrana y se dejó secar por aproximadamente 15 min. En este punto obtendríamos el producto final.

5.5. Infrarrojo

Se realizó la evaluación por infrarrojo de las diferentes materias que se utilizaron en la formulación, para verificar su composición. Se prepararon 10 mL de disolución por cada componente a la concentración establecida.

5.6. Pruebas físicas y mecánicas

5.6.1. Apariencia

La apariencia se evaluó cualitativamente a través de una inspección visual y una manipulación directa, contemplando si la membrana presentaba transparencia, resistencia a la manipulación manual, adherencia y presencia o no de burbujas, así como de grumos.

5.6.2. Cuantificación de insulina

La cuantificación de insulina se realizó mediante el método espectrofotometría UV. Se verificó la posibilidad de discriminar las señales obtenidas entre una membrana con insulina y una membrana sin insulina. Como medio de disolución, se utilizó buffer de fosfato de sodio con pH aproximado de 7.4. El volumen de disolución fue de 50 mL, donde se solubilizaron las membranas completas, por 40 minutos. La disolución se sometió a vortex por 1 minuto. Posteriormente, se tomó un volumen de 8 mL y se centrifugó a 10 000 RPM (revoluciones por minuto) por 5 minutos. En el tubo de centrifugado se tomó una muestra de 3 ml de la parte intermedia del tubo, ya que fue la parte más traslúcida y sin gel en el tubo. Las lecturas efectuaron en un intervalo de 500-200 nm, en donde la insulina, según la literatura, presentaría señal a los 270 nm, aproximadamente. El cálculo de la concentración se realizó mediante una curva de calibración con valores de 0.8-3.2 UI/ml.

5.6.3. Espesor y peso promedio

El espesor se determinó con un calibrador digital, mediante el cual se realizaron 5 mediciones en diferentes puntos aleatorios de las membranas completas. Para el peso promedio, se pesaron 5 membranas completas en una balanza analítica por cada variante, se calcularon promedio y desviación estándar.

5.6.4. Ensayos mecánicos

Para esta prueba, se utilizaron membranas de 4 cm x 4 cm de lado, utilizando el equipo MultiTes-1-i, bajo las siguientes condiciones: carga máxima 45 N, desplazamiento máximo 1000 mm, velocidad máxima 50 mm / min, velocidad de dial 1mm / min. Los cálculos fueron realizados con las siguientes ecuaciones.

$$(\sigma) \text{ RT (Resistencia a la tensión)} = \frac{F \text{ max}}{At}$$

$$(\%E) \text{ (porcentaje de elongación)} = \frac{Lf-Li}{Li} \times 100$$

$$\text{ME (módulo de elasticidad)} = \frac{F}{At} \times \frac{1}{\varepsilon}$$

FMax: Fuerza máxima en el punto de Fractura (Mpa)

At = Área transversal de la muestra (mm²)

Lf = Longitud final (mm)

Li = Longitud inicial mm

F = Fuerza correspondiente al esfuerzo

ε = Elongación correspondiente al esfuerzo

5.6.5. pH superficial

Se evaluó el pH de la membrana terminada, sometiéndola a 2 tratamientos diferentes: agua destilada y solución PBS pH 7.4, durante 1 minuto, en un volumen de 5 mL de cada uno, por separado. Posterior al tratamiento, se decantó el excedente de medio y mediante tira reactiva de pH, se realizó la evaluación.

5.6.6. Ángulo de contacto

Se utilizó una pipeta montada en soportes, con un volumen por gota aproximado de 24.5 ± 0.632 μL de agua y una separación de 0.5 cm, entre la membrana y la boca de la pipeta. El diámetro de la salida en la pipeta fue de 1.2 mm. El análisis de las imágenes se realizó mediante el software ImageJ.

5.6.7. Capacidad de absorción de agua

Se pesaron por triplicado muestras de diferentes membranas y se colocaron en un recipiente con 5 ml de PBS, posteriormente, se incubaron a 37 °C por 30 min y, durante 1, 3, 6, 12 y 24 horas. Transcurrido la membrana se colocó sobre un tubo ependorf y se pesó de nueva cuenta por triplicado.

La capacidad de Absorción se calculó de la siguiente forma:

$$CAA = (pf-pi) / pf$$

pf= peso final de la película húmeda

pi= peso inicial seco de la película

5.6.8. Disolución

Se obtuvieron cuadros de 1 x 1 cm de membranas con y sin insulina, se incubaron a 37 °C por 30 min, y, durante 1, 3, 6, 12 y 24 horas en 5 mL de PBS medio pH 7.4. Después del tiempo, el agua se eliminó y se secaron las membranas en un horno a 60 °C a peso constante. Se obtuvo el peso final de la membrana y por diferencia de peso se determinó la integridad de la membrana.

El cálculo se realizó con la siguiente equiparación:

$$\% \text{ de degradación} = (Wt \text{ (mg)} - Wo \text{ (mg)}) / (Wo \text{ (mg)}) \times 100$$

Wt es el peso de la membrana seca después de la inmersión en el tiempo seleccionado

Wo es el peso de la membrana inicial seca.

5.6.9. Permeabilidad al vapor

Se evaluó la difusión del vapor de agua a través de la membrana. En tubos falcón de 15 mL, se pesó una masa de agua equivalente a 10 mL. La boquilla se cubrió con Parafilm y círculos cortados de 2 cm de diámetro de las membranas. Al final del tiempo, se pesó nuevamente y por diferencia de pesos se obtuvo el % de permeabilidad, utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de permeabilidad: } (vial M) / (M C) \times 100$$

M vial corresponde a la masa de agua al final de la prueba, con respecto a la vez anterior

M C corresponde a la masa de agua para el control positivo para cada momento

5.7. Ensayos sobre microorganismos

Las membranas fueron sometidas a 2 bacterias de interés clínico, una Gram (+) y una Gram (-), para evaluar su posible efecto sobre el control bacteriano, en cepas de interés clínico mostradas en el cuadro 7.

Cuadro 7. Microorganismos para prueba microbiológica

| Clasificación | Microorganismo |
|----------------------|--|
| Gram (+) | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 |
| Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 |

Se elaboraron membranas conformadas como se presenta en el cuadro 8.

Cuadro 8. Controles para la prueba microbiológica

| Membrana | Quitosano | Aceite | Poloxámero F-127+Insulina |
|-----------------|------------------|---------------|----------------------------------|
| 1 | X | - | - |
| 2 | - | X | - |
| 3 | - | - | X |
| 4 | - | - | - |
| 5 | X | X | X |

(X): Componente presente en la membrana a prueba

(-): Componente ausente en la membrana a prueba

A partir de cada membrana, se pesó una masa de 30 mg de cada formulación y se esterilizó por 20 min, bajo luz UV. Finalmente se, colocaron en un tubo ependorf con 2 mL de agua estéril, durante 24 horas.

Pasadas las 24 horas, en una placa de 96 pozos se colocaron 100 µL de medio de cultivo Mueller Hinton en cada pozo. La primera columna fue el control positivo, por lo tanto, no se agregó muestra.

A la segunda columna le fue agregado 100 µL del stock de cada tratamiento, y se traspasó 100 µL más a cada pozo hacia la derecha, descartando 100 µL del final. Finalmente, a cada pozo le fue agregado 100 µL de cultivo bacteriano de las cepas de interés, el cual fue cultivado 24 horas previas. La concentración fue de 0.3 McFarland, y se dejó en tratamiento 24 y 48 horas más.

La concentración bacteriana se determinó por densidad óptica ($\lambda=620\text{ nm}$). Como controles se utilizó clindamicina y ciprofloxacino tópicos.

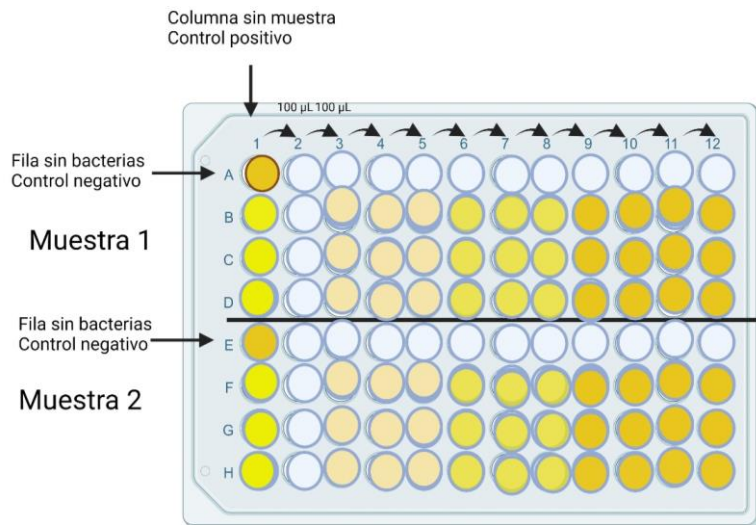


Imagen 5. Esquema para prueba microbiológica.

6. Resultados

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de las pruebas físicas, mecánicas y del control de crecimiento bacteriano, a las cuales se sometió la membrana final. En ellas podemos encontrar pruebas que permiten canalizar su posible comportamiento sobre una herida desde su aplicación, al entrar en contacto con un exudado ligero o intenso, así como en la actividad sobre algunas de las bacterias, que comúnmente infectan una herida y complican la recuperación de la piel.

Las membranas fueron denominadas como: membranas sin insulina (MB) y membranas con insulina (MINS).

6.1. Fabricación de membranas

Se obtuvieron membranas transparentes, sin burbujas, con buena adhesividad, adherencia, flexibilidad y elasticidad al tacto.

Como plastificante, el propilenglicol aportó a las membranas una mayor estructura y resistencia, además de que, en conjunto con el alginato, se obtenían membranas flexibles y fáciles de manejar, y el sorbitol propiciaba flexibilidad y elasticidad, al combinarse con propilenglicol. Al evaluar las proporciones de los componentes podemos observar los siguientes fenómenos: al incorporar una concentración superior al 30 % total de plastificantes, se propiciaba que las interacciones intermoleculares de las cadenas poliméricas fueran muy altas, obteniendo membranas totalmente secas y rígidas al tacto, sin flexibilidad ni adherencia.

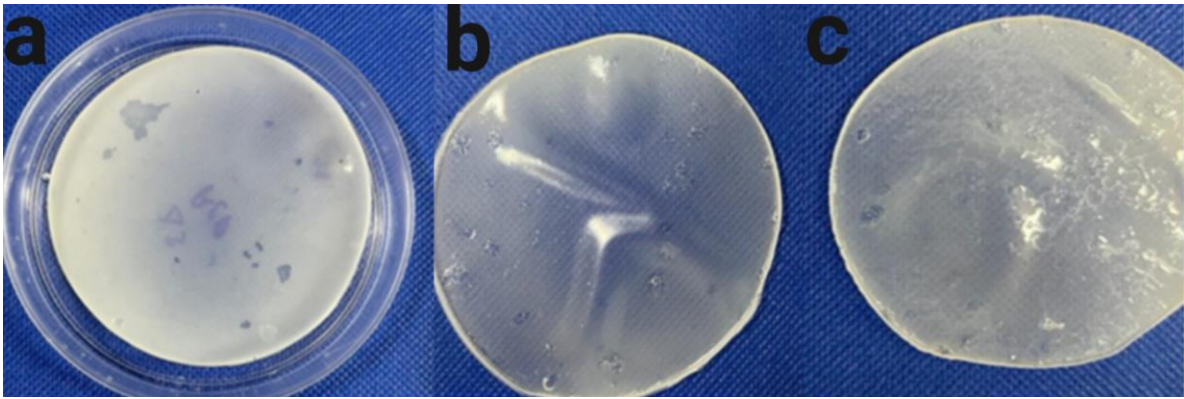


Imagen 6. Membranas con alta concentración de plastificante. En las figuras anteriores, podemos observar las membranas totalmente plastificadas debido al plastificante en exceso.

La concentración de cloruro de calcio no debía superar un 0.1 % ya que de hacerlo el entrecruzamiento con el alginato provocaba un efecto de rigidez en las membranas, además de una apariencia totalmente blanca, porosa y con burbujas.

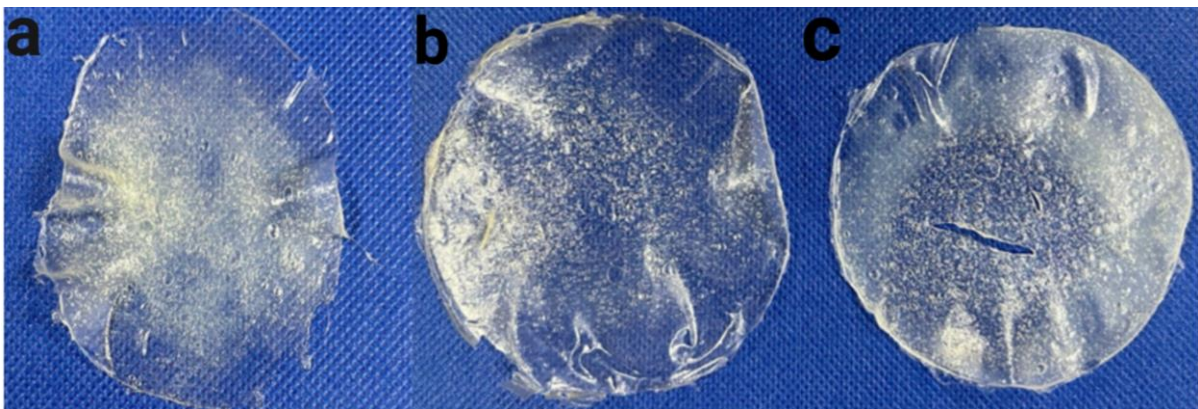


Imagen 7. Membranas con calcio en concentración superior al 0.1 %. Al ser un agente entrecruzante, el calcio permite la resistencia del alginato a la solubilidad, pero genera membranas con mayor rigidez y dureza.

Se sugiere que la concentración sea menor al 8 %, debido a que la formulación no lograba incorporar más aceite después de ese porcentaje, también se apreciaba al dejar el gel en reposo por unos segundos, donde era perceptible la separación del aceite de la formulación. El quitosano debía ser incorporado lentamente y mezclado lentamente en calentamiento.

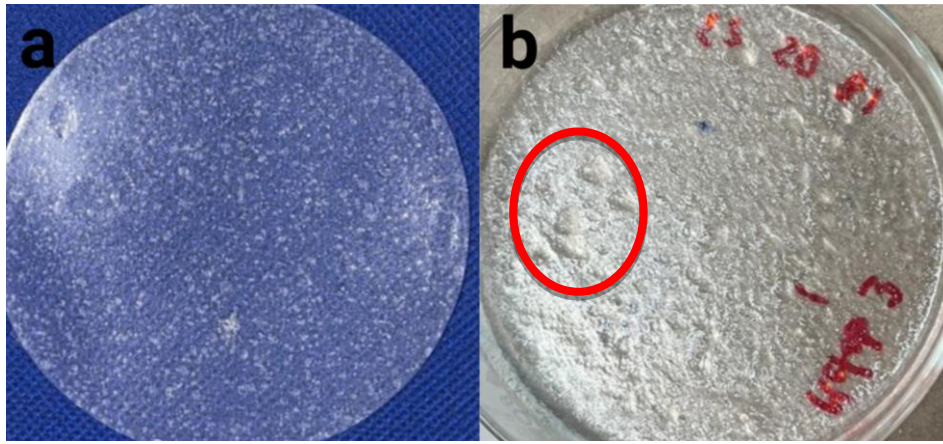


Imagen 8. Membranas con diferente orden de adición respecto al quitosano En la imagen 8b, enmarcado en rojo, se muestran el tipo de grumos que se forman, al incrementar las concentraciones de componentes como el quitosano.

El estudio realizado, para definir las proporciones adecuadas de cada componente, permitió identificar los puntos críticos del proceso de fabricación de membranas, permitiendo corregir el producto final, obteniendo membranas cualitativamente adecuadas, mediante un método reproducible. Posterior a la evaluación de todos los componentes, a diferentes concentraciones, la formulación sin insulina fue la siguiente:

- 2% m/v de alginato
- 7 % m/v de propilenglicol
- 14 % m/v de sorbitol
- 0.3 % m/v de PVP k-30
- 0.03 % m/v de cloruro de calcio
- 4 % v/v aceite de romero
- 5.6 % v/v quitosano en una concentración del 1 % m/v

La insulina, se incorporó en forma de recubrimiento, de tal forma que se impregna en la membrana terminada. El volumen ocupado del stock, de insulina-poloxámero, es de 2 mL, volumen que contiene 44 UI de insulina. Las concentraciones anteriores fueron definidas posterior al estudio del comportamiento integral en las membranas. Modificar las concentraciones establecidas, interviene directamente en la reproducibilidad de la membrana final.

6.1. Infrarrojo

Se realizó, la caracterización de cada componente mediante el análisis de infrarrojo, con la finalidad de tener una referencia de los componentes que fueron utilizados y el comportamiento de los componentes mezclados.

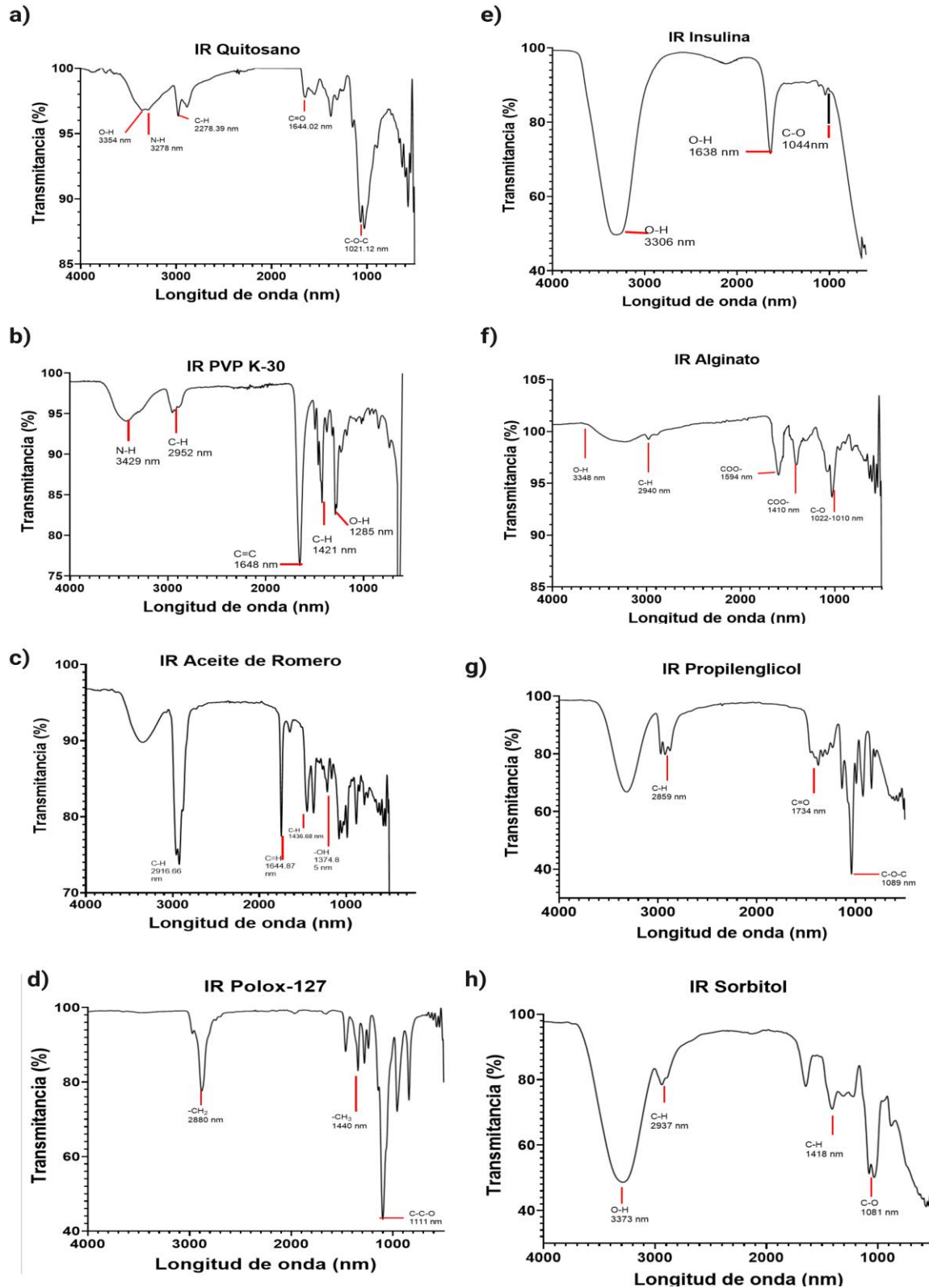


Imagen 9. Espectros de infrarrojo de los componentes: a) quitosano, b) polivinilpirrolidona K30, c) aceite de romero, d) poloxámero F-127, e) insulina, f) alginato, g) propilenglicol, h) sorbitol

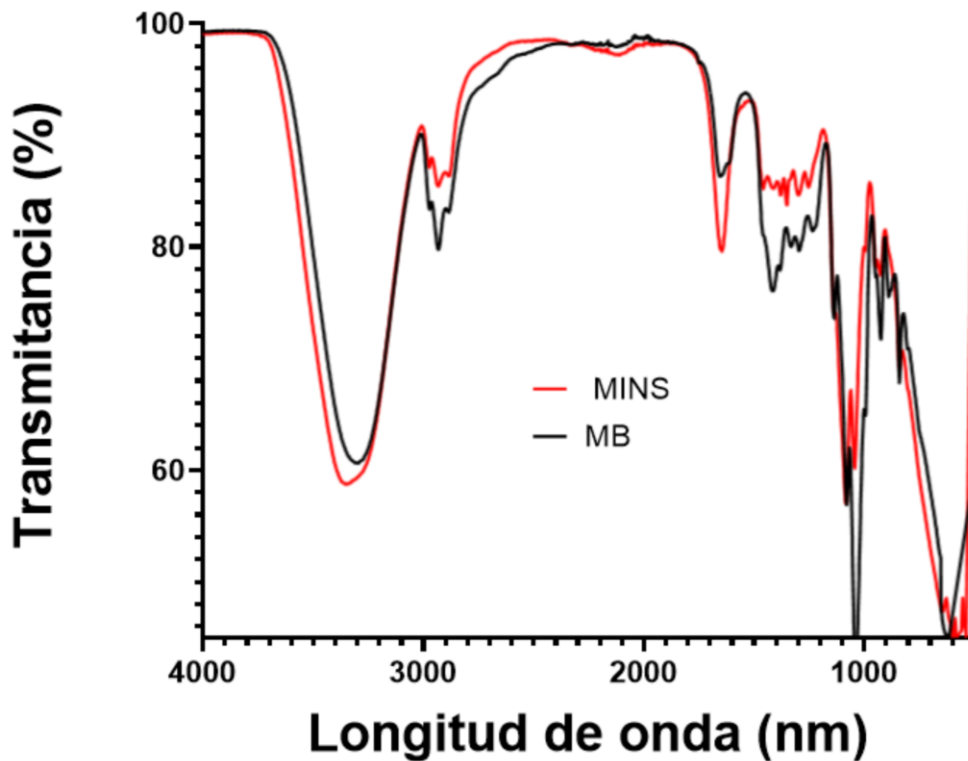


Imagen 10. Espectros de infrarrojo para geles sin insulina y con insulina. En negro se observa la membrana blanca y en rojo la membrana con insulina.

6.2. Apariencia

Se obtuvieron membranas elásticas a la manipulación, transparentes visualmente, flexibles y adhesivas al tacto con diferentes superficies en primer contacto. Su manipulación y desmoldeo no requirió ningún equipo o herramienta específica, olor característico a romero y ligeramente al ácido acético presente en el quitosano. La membrana con insulina era ligeramente más opaca que la que no la contenía. Ambas formulaciones (sin insulina y con insulina) eran cualitativamente similares.

Obtener productos visualmente con propiedades adecuadas, permite establecer un antecedente sobre la funcionalidad de la fórmula establecida, dando pie a pruebas cuantitativas que evalúen dichas propiedades y algunas otras denominadas como óptimas para este tipo de sistemas.

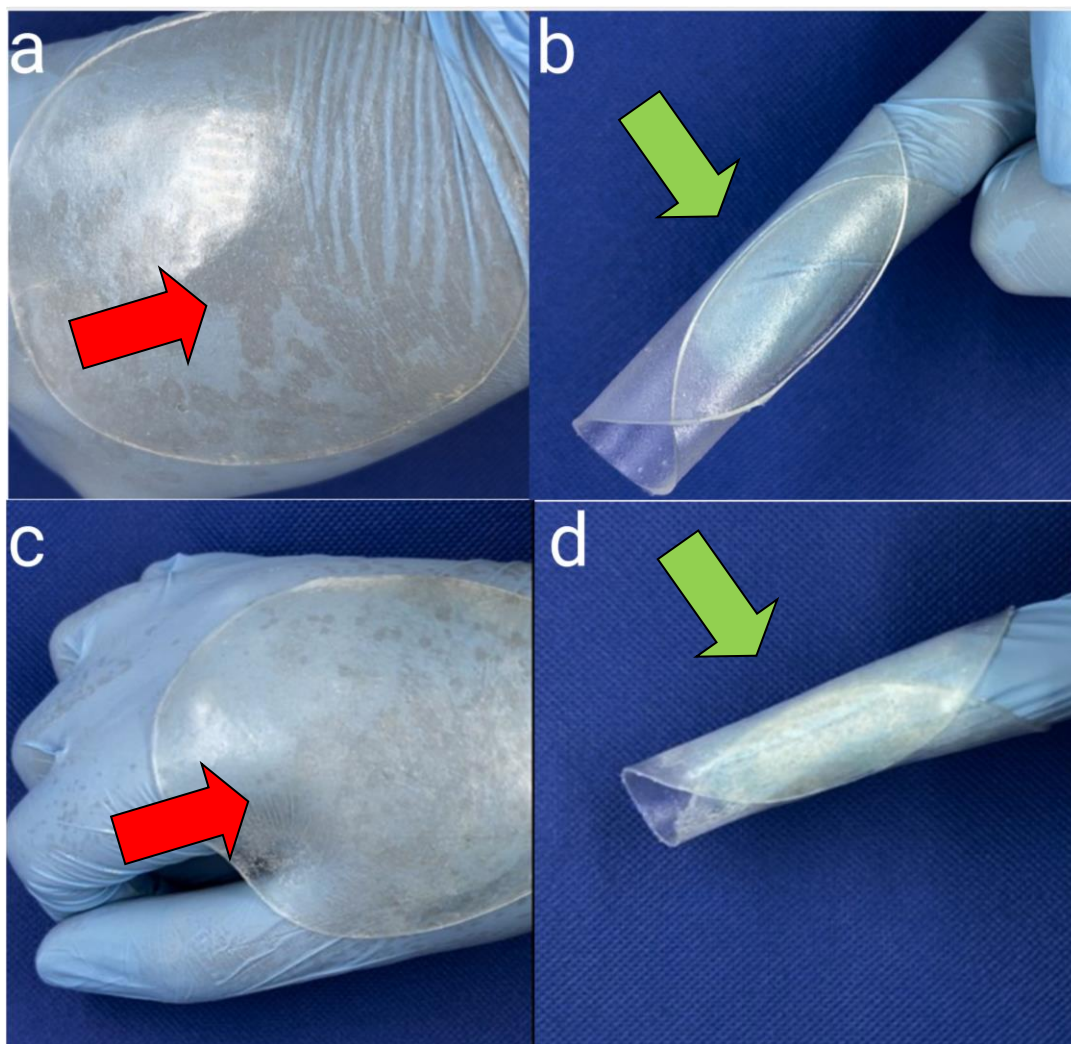


Imagen 11. Membranas poliméricas. 11a y 11b son membranas libres de insulina (MB); 11c y 11d son membranas de insulina. La flecha verde muestra la flexibilidad y la adherencia. La flecha roja muestra la transparencia de las membranas.

6.3. Cuantificación de insulina

Para la cuantificación de insulina, de manera inicial se evaluó la señal obtenida por una membrana sin insulina (MB) y una membrana con insulina (MINS), donde pudo ser discriminada, entre una y otra, mediante la longitud donde se presenta la insulina. Se estableció una curva de calibración en la cual se plantearon concentraciones de 0.8 UI/ml a 3 UI/ml. Se evaluó la precisión del sistema obteniendo un CV% de 0.75 y desviaciones de 0.003. Para la prueba de linealidad del sistema se obtuvo una $r^2 = 0.9963$ y un $IC(\beta_1) = -0.02 \pm 0.923$, con un límite de detección de 0.211 UI/ml y un límite de cuantificación de 0.272 UI/ml. En la parte de reproducibilidad, se obtuvo un Error < 1%. Se obtuvo una gráfica de diferentes concentraciones, como se muestra en la imagen 8, estableciendo las concentraciones que permitieran obtener linealidad en los resultados y un espectro amplio de lectura.

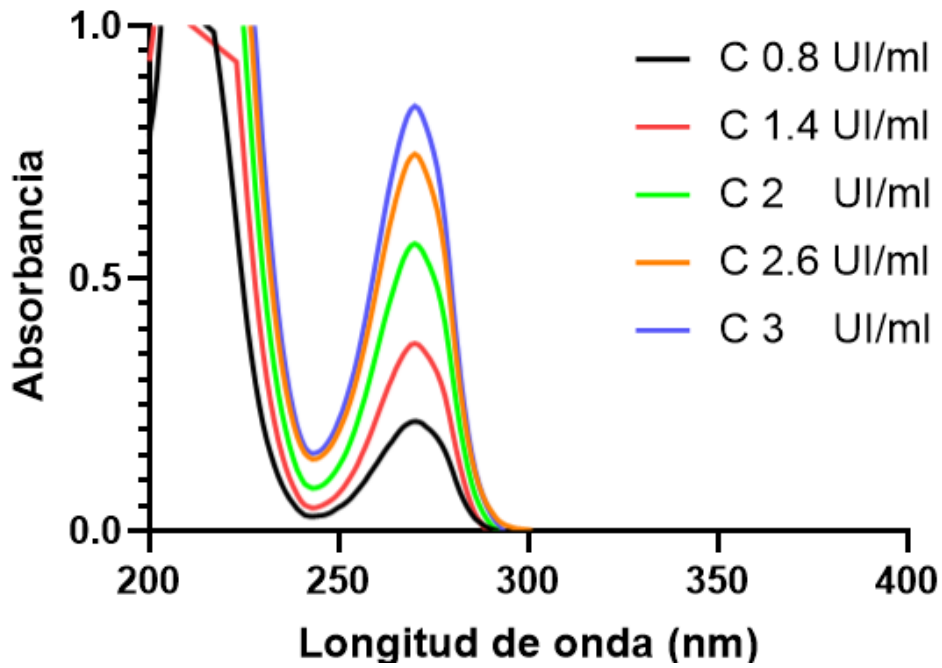


Imagen 12. Identificación de señal de insulina. Se analizaron diferentes concentraciones de insulina mediante UV.

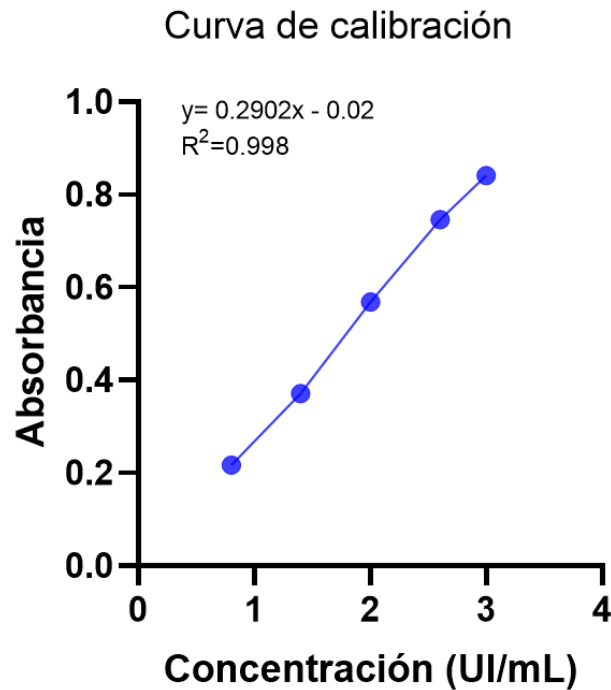


Imagen 13. Curva de calibración de insulina.

Finalmente, se realizó una lectura por triplicado de las membranas, obteniendo los siguientes resultados:

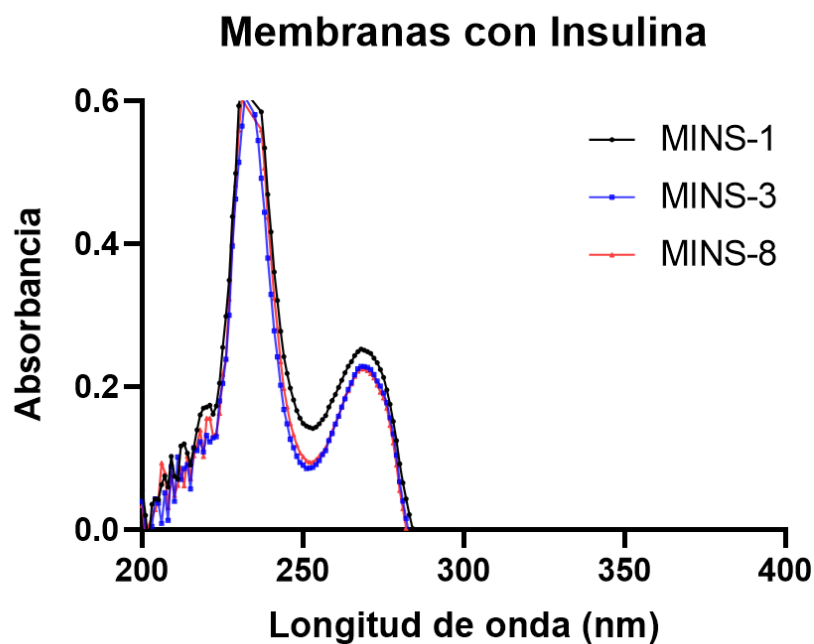


Imagen 14. Señal de insulina obtenida a partir de membranas en disolución.

La concentración final por membrana y en el volumen de disolución, se muestra en el cuadro 9.

Cuadro 9: Concentración de insulina en membrana completa.

| | |
|-----------------------------|--------------------|
| Insulina por mL | 0.879 ± 0.052 |
| Insulina total por membrana | 43.964 ± 2.578 |

6.4. Espesor y peso promedio

Al evaluar su espesor y peso, para la membrana blanco se obtuvieron valores de 0.400 ± 0.040 mm y 3.065 ± 0.237 g; para las membranas con insulina, se obtuvo un valor de 0.493 ± 0.012 mm y un valor de 3.007 ± 0.043 g.

6.5. Ensayos mecánicos

Para las formulaciones se encontró que, en el caso de no haber incorporado el complejo de insulina con poloxámero F-127, se tiene un valor de TS igual a 0.073 ± 0.021 MPa, con un %E igual a 19.413 ± 2.365 y un Módulo de Young igual a 0.0373 ± 0.08217 Mpa.

Para la formulación que contiene el complejo, se obtuvo un valor de TS igual a 0.103 ± 0.0193 MPa, un %E de 22.793 ± 2.541 y un Módulo de Young igual a 0.0454 ± 0.073 MPa.

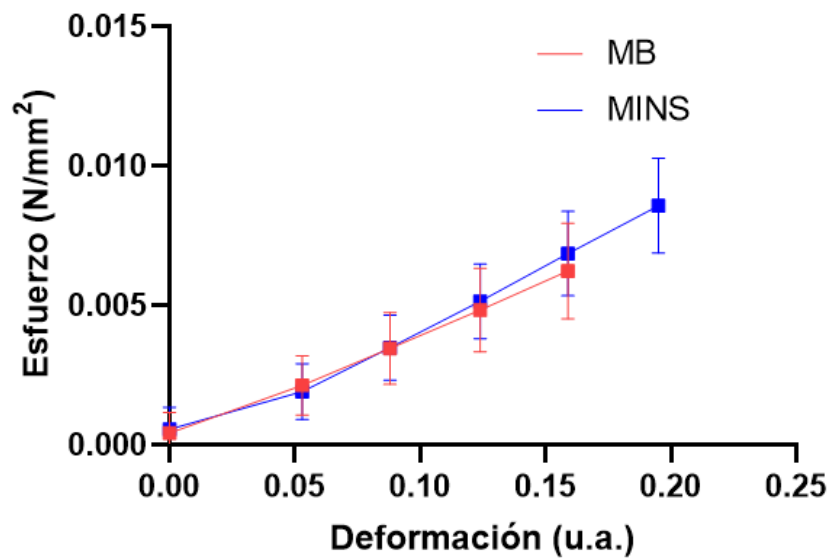


Imagen 15. Gráfica de Esfuerzo (N/mm²) vs deformación.

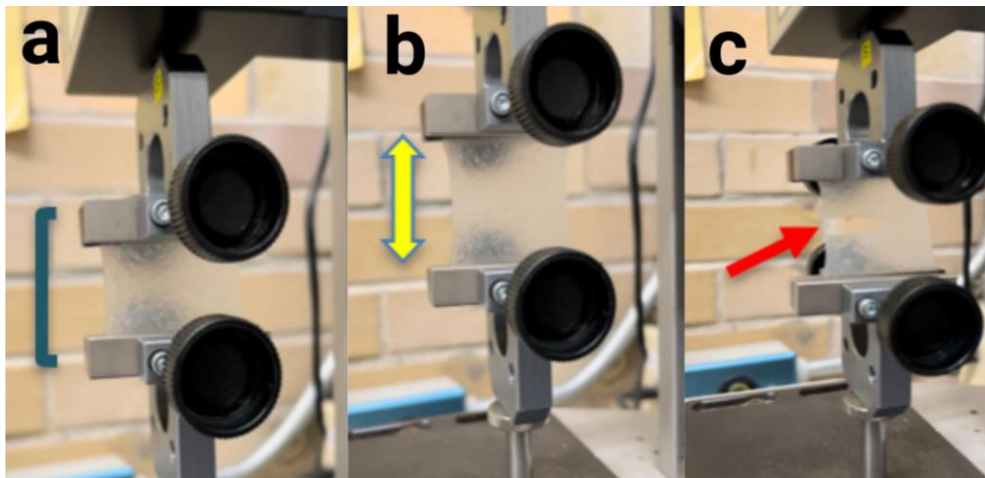


Imagen 16. Ensayo mecánico. Se puede observar el proceso mediante el cual se miden los valores para la determinación de TS y %E, en la caracterización físico-mecánica de las membranas. En 16a (corchete azul) se aprecia la posición inicial de la prueba; en 16b el movimiento mediante el cual se somete a estrés la membrana estirándola (flecha amarilla), hasta el punto de ruptura ejemplificado en 16c (flecha roja).

Los ensayos mecánicos evalúan el comportamiento ante un estrés físico-mecánico, permitiendo prever el desempeño que tendrán al momento de la aplicación en la herida.

6.6. pH superficial

Después del tratamiento establecido, la mayor parte del medio (agua y PBS cada uno por aparte), en el que fueron sometidas ambas membranas, fue decantado cuidando la integridad de la membrana, colocando la tira reactiva sobre la membrana permitiéndole detectar el pH de la superficie. El resultado fue para ambos medios, un pH igual a 7.

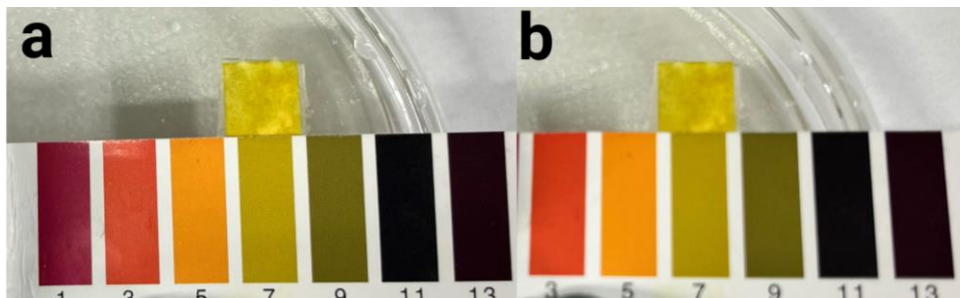


Imagen 17. Evaluación de pH superficial. En 17a, se encuentra el resultado ante agua destilada y en 17b ante solución PBS pH 7.4.

La prueba de pH superficial es de importancia ya que se busca causar el menor daño adicional a la herida al interactuar con la membrana.

6.7. Angulo de contacto

Para las membranas sin el complejo de insulina con poloxámero F-127, se determinó un ángulo de $12.690 \pm 1.611^\circ$; para las membranas con poloxámero F-127 con insulina, se obtuvo un valor de $28.523 \pm 0.625^\circ$.

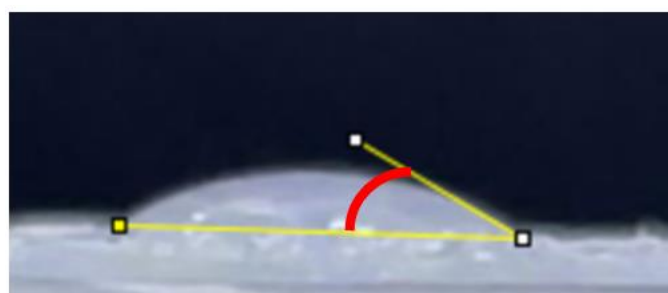


Imagen 18. Evaluación en ángulo de contacto, marcado entre líneas amarillas, se observa el ángulo de contacto, formado entre la horizontal de contacto y la tangente a la curva. En color rojo se marca el arco que forma este ángulo.

Materiales hidrofílicos permiten el control sobre el exudado de la herida, por lo que el valor del ángulo de contacto provee un indicio de dicho control.

6.8. Capacidad de absorción de agua

Para esta prueba, la membrana sin insulina presentó una absorción de 23.427 ± 2.198 g de medio/ 100 cm^2 y para la membrana con insulina y poloxámero F-127, de 22.773 ± 1.757 g de medio/ 100 cm^2 .

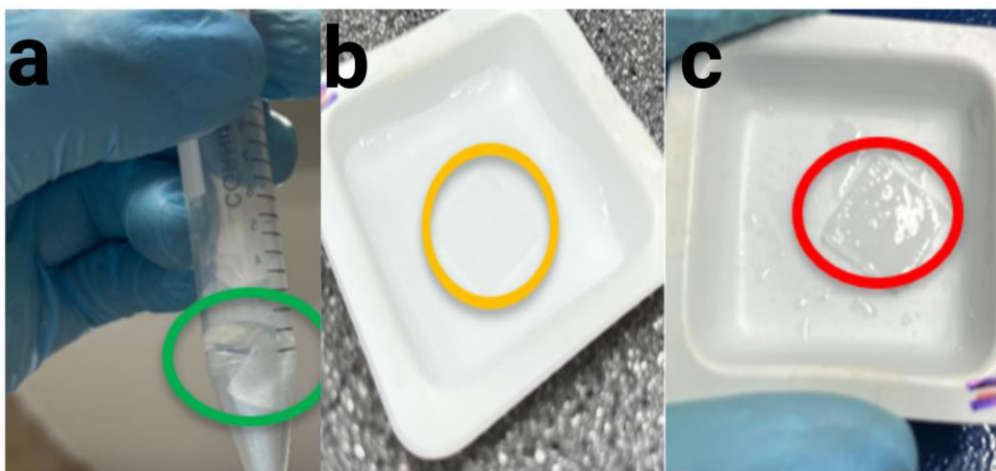


Imagen 19. Prueba absorción de agua: 19a en el círculo verde, se aprecia la membrana en condiciones de la prueba; en 19b círculo amarillo, se ejemplifica el proceso de decantación de medio; en 19c círculo rojo, se representa la membrana al finalizar la prueba.

Se determinó un hinchamiento máximo a los 360 minutos, para ambas formulaciones, presentando 434.318 ± 25.942 % para la formulación sin insulina, y un 464.428 ± 16.514 % para la formulación con insulina. El comportamiento a través del tiempo se puede visualizar a mayor detalle en la imagen 20.

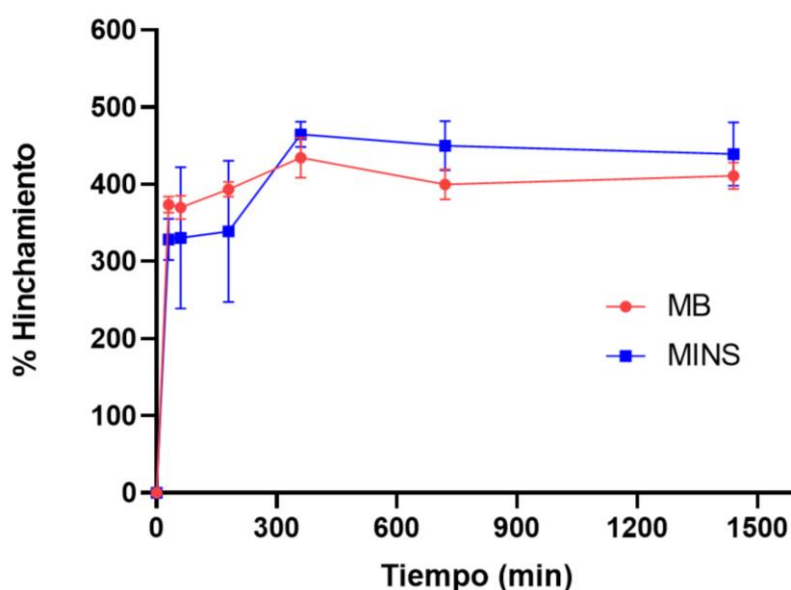


Imagen 20. Gráfica de %Hinchamiento vs Tiempo (min)

Cuadro 10. Capacidad máxima de hinchamiento y volumen por cm².

| Tipo de membrana | %Hinchamiento máximo (360 min) | gramos de líquido (g) / 100 cm ² |
|------------------------------|--------------------------------|---|
| Membrana sin insulina (MB) | 434.318 ± 25.942 | 23.427 ± 2.198 |
| Membrana con insulina (MINS) | 464.428 ± 16.514 | 22.773 ± 1.757 |

Un alto grado de absorción de líquido, permite identificar una buena interacción con el posible exudado presente en las heridas.

6.9. Disolución

En esta prueba, la tendencia de disolución es diferente para cada formulación. La formulación MB pierde aproximadamente el 50% de su integridad después de 30 minutos, permaneciendo entre 40-50% hasta 360 minutos, donde comienza a degradarse hasta un 60%, en el punto donde terminó la prueba. En el caso de la formulación MINS, aproximadamente el 40% se pierde en los primeros 30 minutos, manteniéndose estable en ese punto hasta finalizar la prueba. El seguimiento de la disolución puede visualizarse en la imagen 21.

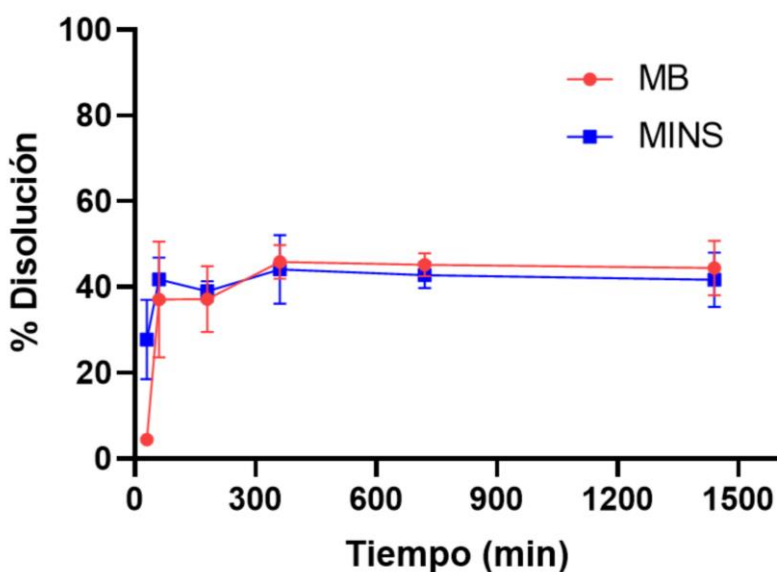


Imagen 21. Gráfica % Disolución vs Tiempo (min)

6.10. Permeabilidad al vapor

En esta evaluación, se determinó que la membrana presenta un carácter semipermeable, ya que los resultados muestran un comportamiento frente al tiempo, donde hay una pérdida de masa de agua en el tubo. La permeación de MINS (1220.807 g/m²) ligeramente menor con respecto a MB (1254.777 g/m²), sin embargo, se preserva la permeabilidad al vapor a través del tiempo para ambas formulaciones. La permeabilidad al vapor con respecto al tiempo puede ser visualizada en imagen 22.

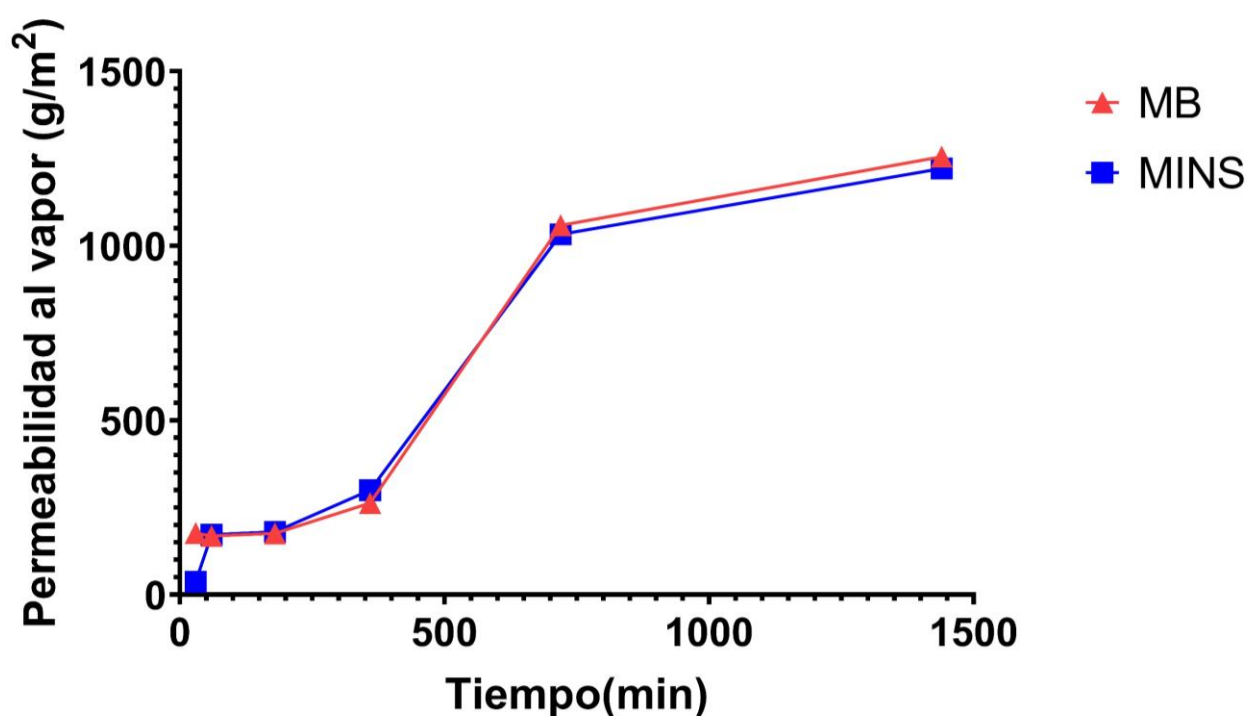


Imagen 22. Gráfica de Permeabilidad (g/m²) al vapor vs Tiempo (min)

Una membrana no oclusiva permite el natural funcionamiento de la piel, controlando algunas de las condiciones donde podrían generarse bacterias y provocar una infección.

6.11. Ensayos biológicos con microorganismos

En esta prueba, se evaluó el efecto sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, a las 24 y 48 horas, donde se observó una disminución en la densidad de población de microorganismos. A las 24 horas, la disminución del crecimiento es mayor, debido a la alta concentración de los componentes, lo que puede deberse a un efecto de difusión de los diferentes componentes del aceite de

romero al medio, y el efecto de acidificación probablemente debido al quitosano. Los controles fueron denominados: (MB) membrana sin insulina; (MB+Q) membrana sin insulina y quitosano incorporado; (MB + INS) membrana con insulina y poloxámero incorporado; (MB+AcR) membrana con aceite de romero; (MINS) membrana con todos los componentes incorporados. El efecto sobre el crecimiento bacteriano con respecto a la concentración para cada control seleccionado se muestra en las imágenes 23 y 24.

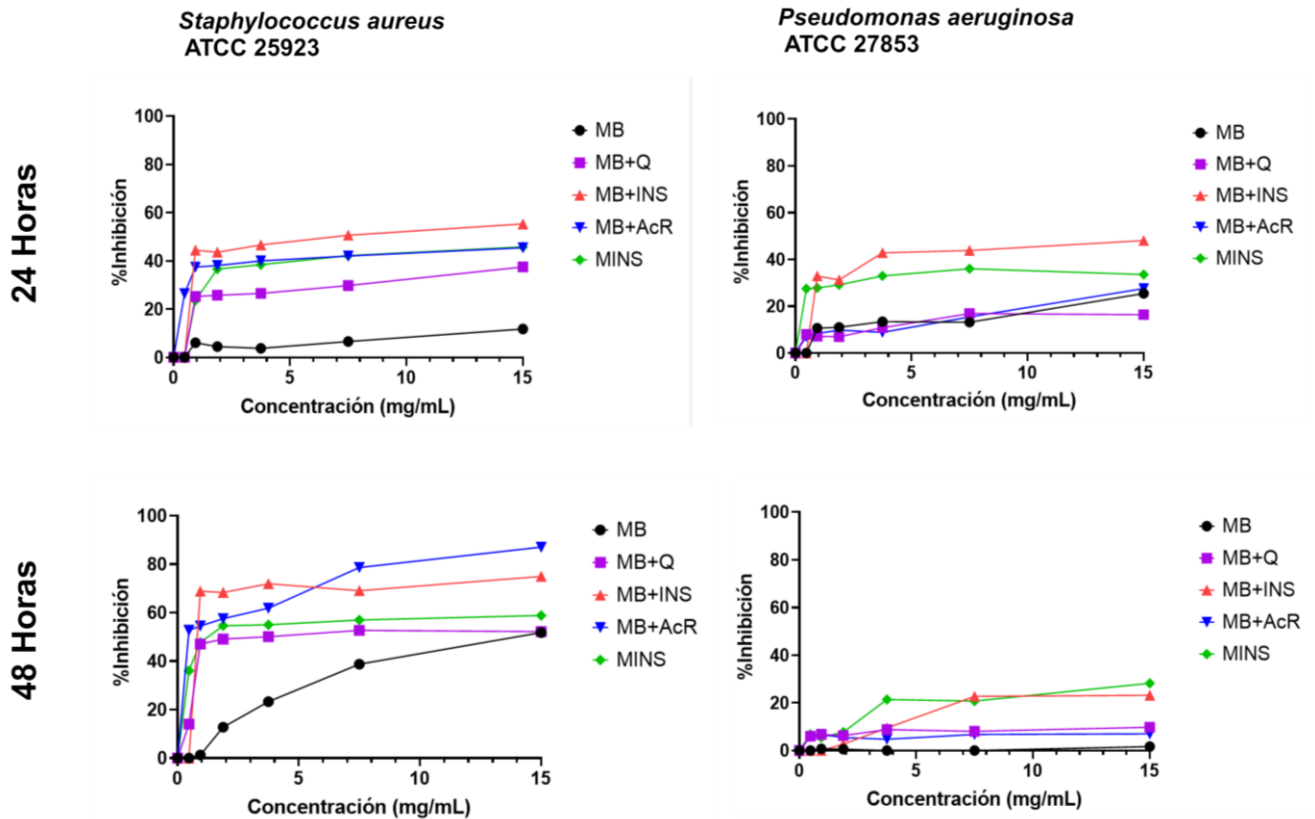


Imagen 23. Gráfica % Inhibición vs Concentración de membrana. En la primer columna, se muestra el seguimiento para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; en la segunda columna, se evidencia el comportamiento para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

24 Horas

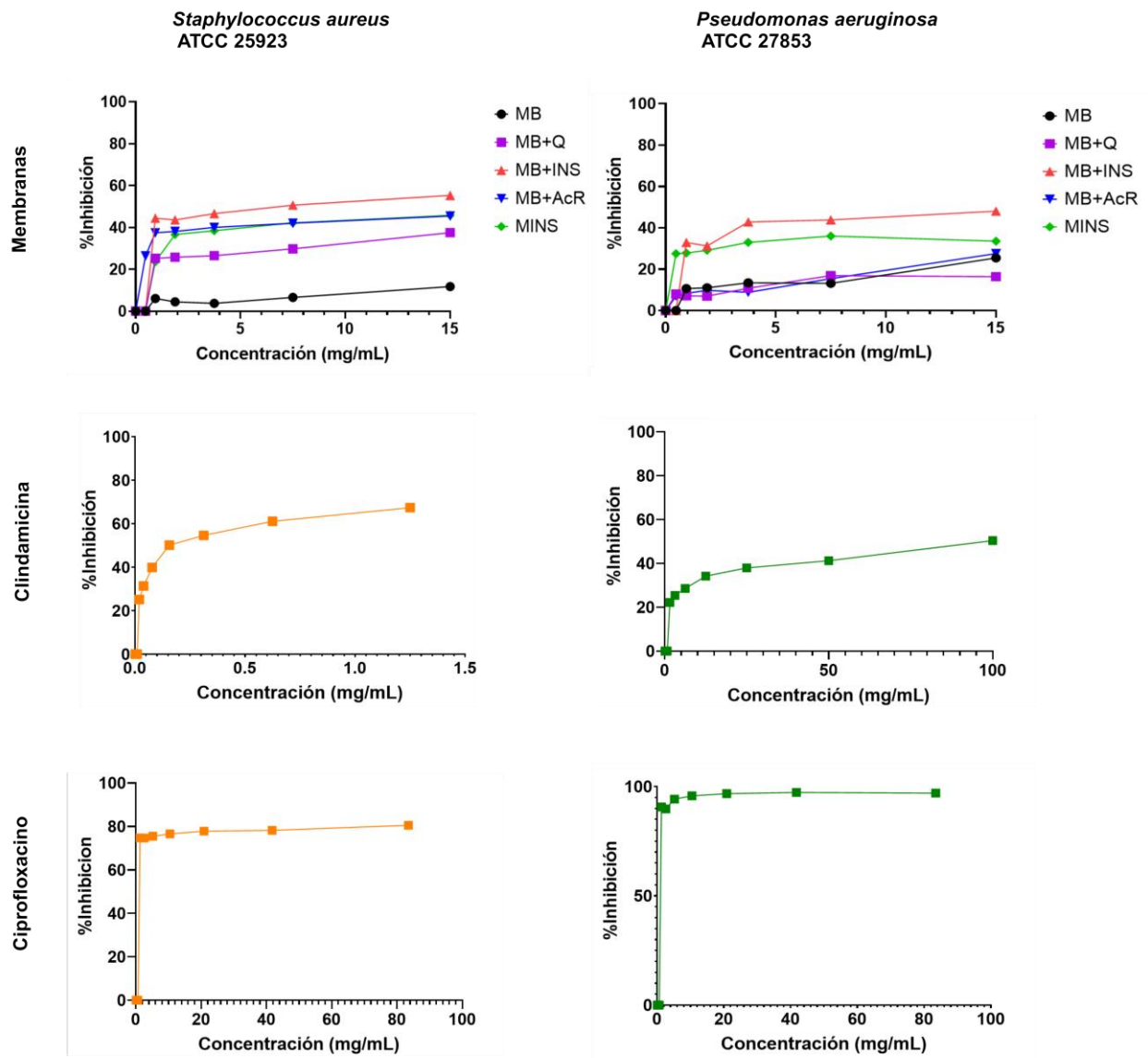


Imagen 24. Gráficas de % Inhibición vs Concentración con controles a 24 horas. En la primera columna, se muestra el monitoreo para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; en la segunda columna, el comportamiento para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Controles de comparación: Ciprofloxacino en presentación tópica y Clindamicina en presentación tópica.

7. Discusión

En este apartado se comparan los diferentes resultados obtenidos con lo que se ha reportado en la literatura. Durante las diferentes pruebas la membrana se sometió a evaluaciones físicas, mecánicas y sobre agentes microbiológicos de interés, con la finalidad de constatar si contaba con propiedades que le permitiesen interaccionar de manera adecuada en una herida. Algunos de los estudios se realizaron en condiciones de estrés para la membrana y condiciones similares a una herida. El identificar los puntos fuertes y débiles del sistema, permiten obtener una visión más amplia de la membrana, así como, la participación de cada componente en la misma.

7.1. Fabricación de membranas

De forma inicial se estipularon los puntos críticos en el desarrollo del sistema, siendo uno de estos la forma de secado. Se establecieron tres formas de secado: horno, parrilla y temperatura ambiente. Se eligió el secado a temperatura ambiente, obteniendo un proceso lento y homogéneo, evitando burbujas, lo que permitió obtener un producto homogéneo y reproducible. Las soluciones y mezcla final, no genero complicaciones en su elaboración ni incorporación, lo que reduce el uso de tecnología especializada. De manera general, fue posible establecer un método por el cual se logró incorporar todos los componentes, obteniendo membranas con potencial para ser utilizadas en heridas mediante un proceso reproducible (76).

7.2. Infrarrojo

La técnica de infrarrojo permite la caracterización e identificación mediante la excitación de las moléculas, para obtener un gráfico bajo cierta longitud, permitiendo identificar las moléculas presentes (77). En los gráficos obtenidos, se logró apreciar las bandas características para cada reactivo. De manera particular, estas bandas se siguen apreciando en ambas formulaciones (con y sin insulina); se aprecia un incremento de las señales en el porcentaje de transmitancia en las bandas propias de la insulina en la membrana que la contiene, por lo que se infiere que, dichos desplazamientos e incrementos, son el resultado de la adición del poloxámero F-127 con la insulina. Con esta caracterización se establece que los componentes interaccionan entre sí y la membrana al final del proceso si contiene insulina.

7.3. Apariencia

La apariencia de las membranas poliméricas debe ser de acabado liso y sin grumos, que permita la visualización a través de estas (78). Promover la visibilidad de la herida a permite monitorear la condición de la herida y su proceso de recuperación, reduciendo el número de procedimientos invasivos en el paciente, además, evita el daño por remoción, como es el caso de gasas o apósitos de tela (43). Las membranas obtenidas en el presente trabajo mostraron transparencia, adhesividad, flexibilidad, así una nula cantidad de burbujas y grumos, propiedades adecuadas para sistemas de esta naturaleza.

7.4. Cuantificación de insulina

Si bien durante el proceso de aplicación, puede perderse unidades de insulina, las que son cuantificables resultan suficientes para promover un posible efecto en la recuperación de una herida. La literatura refleja que, a una concentración de 10-50 UI de insulina, es posible observar una mejoría en el cierre de la herida. En el cuadro 11, se presenta un resumen de algunos artículos que permiten dimensionar el reposicionamiento de la insulina para el tratamiento de tratamiento para heridas

Cuadro 11. Estudios referentes a insulina aplicada en heridas.

| Autor | Dosis de insulina cutáneo (UI) | de | Forma farmacéutica | Días de duración de tratamiento | de | Resultados principales | Pruebas realizadas |
|--------------------------|--------------------------------|---|-------------------------------|--|----|---|--|
| Estudios clínicos | | | | | | | |
| SR Ort, Gerber | Van RM | 10 UI/día | Tópica | 5 días | | Hay evidencia de seguridad en el uso de insulina, y eficacia en úlceras de cúbito. | Evaluación del cierre de la herida y monitoreo de glucosa sistémica. |
| Omiid et al., 2009 | | 10 UI/10 cm ² | Aerosol | Varios días dependiendo del paciente | | Mayor tasa de recuperación de herida tratada con insulina, respecto a la que no. | Evaluación del cierre completo de herida y monitoreo de glucosa sistémica. |
| Enas et al., 2014 | | 10 UI/aplicación | Suspensión en solución salina | Varios días dependiendo la herida y tamaño | | La insulina regular fue la mejor en las pruebas, con una tasa más alta de cierre la herida. | Se evaluó la funcionalidad de la herida, el dolor producido por el daño, tamaño y velocidad de cierre. |
| Brillar et al., 2017 | | 1 U/cm ² de área de la herida, dos veces al día | Vendaje con insulina rociada | 7 días | | Disminución en el área de la herida por parte del tratamiento con insulina, sin afectar la glucosa sistémica. | Evaluación del cierre en la herida y monitoreo de la glucosa sistémica durante el estudio. |
| Chen Hung et al., 2020 | | 1 ml de Insulina (100 UI) | Andamiaje de PLGA | 14 días | | Reducción del colágeno tipo I <i>in vitro</i> , aumento del factor de crecimiento transformante beta <i>in vivo</i> y promovió la curación de heridas diabéticas. | Evaluación del cierre de la herida y evaluación en modelo celular del cierre de la herida. |
| Aurelio et al., 2013 | | 10 unidades /cm ² | Tópica | 14 días | | Incremento de vasos sanguíneos en el sitio tratado con insulina., sin eventos adversos. | Evaluación del cierre de la herida y monitoreo de la glucosa sistémica en durante la prueba. |
| ZHANG et al., 2016 | | 1 ml de insulina humana isófona por aplicación, 2 veces al día. | Inyección subcutánea | 12 días | | Efecto significativo sobre la glucosa sistémica y promover la cicatrización. | Evaluación de glucosa, evaluación de tejido de granulación. |
| Mehreen et al., 2020 | | 30 UI/en el vendaje | Tópica/vendaje | 14 días | | Disminución significativa del diámetro de la herida. | Evaluación del diámetro del cierre de la herida. |

| | | | | | | |
|-----------------------------|--------------------------------|---|-----|------------------------|--|---|
| Dawoud et al., 2019 | | Tópica liposomal | gel | 2 meses | Mejoró la tasa de curación sin causar hipoglucemia y redujo el eritema y el área de la herida. | Cierre de la herida. |
| Estudios preclínicos | | | | | | |
| Zhang et al., 2007 | 0.25 UI | Inyectable | | Hasta el cierre herida | Aceleró la cicatrización de heridas cutáneas sin efectos secundarios. | Cierre de la herida, concentración de glucosa en sangre. |
| Zagon et al., 2007 | 1-5 U | Tópica | | 7 días | La insulina tópica redujo el tamaño de la herida al mejorar la epitelización sin riesgo de hipoglucemia. | La insulina tópica normaliza la reepitelización corneal en ratas diabéticas. |
| Negrini et al., 2017 | 5 UI/ día/1 semana | Tópica | | 28 días | Es útil en heridas de <i>Trachemys scripta</i> . | Recuento celular y proliferación hasta el cierre de la herida |
| Estae et al., 2019 | 1 UI/ ml cargado en partículas | Micropartículas de quitosano con insulina humana recombinante | | 15 días | Normalizó el volumen del líquido lagrimal, el espesor de la córnea y la morfología de las células corneales protegidas | Reestructuración de características del tejido |
| Apikoglu-Rabus et al., 2009 | 20 µL de solución | Tópica | | 15 días | La insulina tópica aceleró la cicatrización de heridas en ratas con y sin diabetes. | Se evaluó la tasa de contracción de la herida, el tiempo de epitelización completa y los resultados histológicos. |
| Xuelian et al., 2012 | 0,03U | Tópica | | 7 días | La insulina tópica mejoró la epitelización y la remodelación del colágeno. | Concentración de células, análisis histológico, estudio de quimiotaxis ELISA. |
| Lima et al., 2012 | 0.5 U/ 100 gramos/ día | Tópica | | 8 días | La insulina tópica redujo el tiempo de curación de las heridas de ratas diabéticas. | Análisis histológico, expresión de factores de crecimiento. |

ELISA: enzimoimmunoanálisis de adsorción; PLGA: poliácido láctico-co-glicólico

Si trasladamos el costo del factor de crecimiento, comparado al uso de la insulina, podríamos obtener un efecto similar a un costo más accesible.

De la información anterior (cuadro 11), se infiere que la membrana obtenida en el presente trabajo cuenta con insulina suficiente para desencadenar las respuestas celulares que aceleren la recuperación de una herida, sin alterar la glucosa sistémica del individuo.

7.5. Espesor y peso promedio

En el presente estudio, los valores del sistema formulado (en promedio 3 gramos de peso y 0.45 mm de espesor) se encuentran por arriba de algunos reportes con valores de entre 0.1-0.2 mm de espesor (79). Dicho valor, no es un punto negativo, ya que el espesor se relaciona con la degradación, y en el caso del sistema obtenido, dichas propiedades se encuentran en parámetros adecuados. De obtener membranas más pesadas y espesas, se podría alterar el funcionamiento natural de la herida, generando un ambiente de oclusión sin permeabilidad al vapor (80).

7.6. Ensayo mecánico

Las membranas poliméricas de alginato y quitosano pueden presentar interacción entre sus grupos (COO-y OH) (79), lo cual genera productos con ciertas características, como una mayor o menor resistencia, y una mayor o menor rigidez.

Con respecto al contacto con la piel, donde se reporta un valor 4-20 Mpa, para Módulo de Young (81), se observa que ambas membranas se encuentran por debajo del reportado. Este resultado quizás se deba al porcentaje de los polímeros, que es bajo, y que, al ser polímeros de origen natural en su mayoría, tengan menor resistencia, elasticidad y rigidez en comparación con algunos de origen sintético, además de la homogeneidad en las cadenas poliméricas de dichos polímeros (79). Por otro lado, el porcentaje de elongación, resultado óptimo según la literatura (76), esto nos permite deducir que la membrana podrá ser manipulada y estirada sin complicaciones. En general, los valores son inferiores a los reportados, sin embargo, se adaptan al objetivo buscado, el cual es un sistema manipulable, biodegradable y biocompatible. La aplicación y funcionalidad del sistema, es posible debido a los datos en las propiedades mecánicas obtenidas.

7.7. pH Superficial

En las heridas, el pH es un punto crucial que dictamina el estado de esta e incluso el comportamiento natural de la piel no dañada. De manera natural, el pH de la piel sana oscila entre 4.5-5.3 dependiendo de la hidratación y la zona donde se registre el muestreo (82). El pH en una herida puede verse modificado si se está en un estado de infección (83).

Si el sistema presenta un pH neutro, no se favorece la proliferación de microorganismos alojados en la zona, además, no causaría un daño o irritación adicional a la zona dañada. Al mantener un pH neutro, se reduce la posibilidad de que la insulina adicionada precipite, la literatura reporta dicho fenómeno en el intervalo de 4.5-6.5 (84). El pH del sistema fabricado en este trabajo es óptimo para su posible aplicación en una herida, ya que no causara un daño mayor en la zona ni propiciara la alteración de la insulina incorporada.

7.8. Ángulo de contacto

El ángulo de contacto entre un material y una superficie, nos ofrece información acerca del comportamiento hidrofóbico o hidrofílico de dicho material, que puede variar dependiendo de la naturaleza de ambos componentes, ya sea como: el líquido que se utilice para la prueba (acuoso, oleoso), el tipo de superficie (porosas, lisas) y la homogeneidad en la conformación de la superficie (homogénea o heterogénea).

Cuando el ángulo de contacto es mayor a 90° , el material es hidrofóbicos, y cuando el ángulo es menor 90° , tenemos materiales hidrofílicos (85). En el caso de ambas formulaciones, se obtuvieron ángulos menores a 90° , por lo que se consideran hidrofílicas. Si bien existe una diferencia mínima en los valores obtenidos respecto a la formulación que tiene insulina y la que no contiene, ambas preservan el carácter buscado, es decir, un tipo de sistemas capaces de incorporar líquido, siendo una preliminar para dicho comportamiento. La capacidad hidrofílica del sistema obtenido tendrá un efecto positivo en el control de exudado de la herida.

7.9. Capacidad de absorción de agua

La literatura clasifica los apósitos de alginato según su capacidad de absorción en baja o alta absorbencia: si absorben menos de 12 g/100 cm², se clasifican como apósitos de baja absorción, y los apósitos que absorben 12 g o más/100 cm², se clasifican como apósitos de alta absorción (86).

Ambas formulaciones de membranas (sin insulina y con insulina) reflejaron valores por arriba de 20 g/100 cm², que concuerda con el resultado obtenido del ángulo de contacto, de tal manera que podemos confirmar la obtención de una membrana hidrofílica y con una alta capacidad de absorción de líquido. La formulación presentada llega a un punto máximo superando el 450 %, comparado con otras reportadas en la literatura (78).

Un comportamiento hidrofílico, complementado con una alta capacidad de absorción, representaría un control de la humedad en la herida, incluso en ambientes de un porcentaje alto de exudado.

7.10. Disolución

Para la membrana fabricada, los resultados muestran una degradación estable a partir de los 360 min, en donde podemos observar una mayor resistencia a la disolución para la membrana con insulina, en comparación a la membrana sin insulina.

Este comportamiento podría deberse al proceso para su elaboración, ya que, a diferencia de la membrana blanca, la elaboración de la membrana cargada de insulina podría retardar la generación de poros, ya que al aplicarse el complejo de insulina con poloxámero, se forma un recubrimiento sobre una de las caras de la membrana, lo que reduce el tiempo de inicio de la degradación y permite absorber ligeramente una mayor cantidad de agua (87).

Otra razón por la cual el sistema se mantiene estable, hasta cierto punto a lo largo de la prueba, es que, al integrarse calcio a la formulación, ocurre un entrecruzamiento con el alginato, obteniéndose alginato de calcio, el cual como estructura presenta mayor resistencia a la degradación con respecto a cuando no hay calcio en el medio, aunado a la interacción que tengan con el quitosano con otra parte del alginato, transfiriéndole resistencia al medio de igual manera (86). Además, el quitosano y el cloruro de calcio incorporados en la membrana, brindan cierta fortaleza estructural, debido a las interacciones que establecerían con el alginato, presentando una mayor resistencia en medios de exudado medio-alto (88).

Si se consideran heridas con gran cantidad de exudado como las heridas generadas por pie diabético, podríamos esperar un comportamiento adecuado y larga duración sobre la herida (76). Obtener una membrana capaz de resistir el estrés generado por el exudado de la herida, significaría una posible mayor duración en el sitio, de tal manera existirá una permeación controlada de los agentes cargados (insulina y aceite de romero) en el sistema fabricado.

7.11. Permeabilidad al vapor

En la actualidad, el tratamiento de las heridas es muy diverso, siempre orientado a buscar las condiciones más favorables para su reparación. El hecho de que la membrana presente permeabilidad al vapor ayudaría a mantener un equilibrio en la humedad y porcentaje de exudado presente en la herida, que es importante para no generar un ambiente propicio a una infección (89) (90). La permeabilidad, permite que el exudado no se acumule entre la herida y el sistema, situación que, si puede ocurrir con los apósitos oclusivos, los cuales alteran el contenido de agua debido a una hiperhidratación, con aumento de citoquinas proinflamatorias (91).

7.12. Ensayos biológicos con microorganismos

Staphylococcus aureus ATCC 25923, es un aislado clínico que se utiliza como cepa de control de pruebas, sensible a una variedad de antibióticos, incluida la metilina, que carece tanto de recombinasas como de mecA (92). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 se ha utilizado ampliamente como cepa modelo para estudiar la susceptibilidad a los antibióticos, el desarrollo de biopelículas y las actividades metabólicas de *Pseudomonas spp* (93). Ambas cepas fueron seleccionadas, dadas a las características antes descritas y a la relevancia clínica.

Se logra inferir que, si bien no existe un sinergismo del conjunto de los componentes. la formulación completa mantiene estable el comportamiento durante las 24 y 48 horas. Para *Staphylococcus aureus*, el efecto fue consistente, disminuyendo la población en las primeras 24 horas y continuando hasta las 48 horas. Tal comportamiento puede deberse a algunos de los mecanismos atribuidos para el aceite de romero, que inhibe la formación de la biocapa, además, de la acción de flavonoides, terpenoides, polifenoles, cuyo mecanismo de acción degrada la membrana citoplasmática de las bacterias propiciando la

pérdida de iones y la autólisis; afecta la comunicación entre las bacterias, aumenta la permeabilidad de la membrana, haciéndolas susceptibles al ataque inmunológico y de antibióticos (51).

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, la formulación completa, presentó la mayor reducción del crecimiento bacteriano hasta las 48 horas, que puede ser debido a las membranas (fabricada y la plasmática microbiana). Además, las bacterias Gram negativas presentan alteraciones estructurales en porinas, por las cuales es posible el ingreso de moléculas pequeñas presentes en el aceite de romero (94).

Se identificó, además, que el efecto del complejo de insulina-poloxámero, presentó un carácter bacteriostático alto, reduciendo el crecimiento a las 24 horas por debajo del 70 % a muy baja concentración, conforme esta se aumentaba se obtuvo una disminución hasta del 30% de densidad bacteriana. Sin embargo, recientemente la literatura reporta que el efecto del poloxámero por sí solo a diferentes concentraciones, no tiene un control efectivo sobre algunos microorganismos, situación que cambia al cargar componentes activos en las redes poliméricas del poloxámero (como la insulina en la formulación obtenida), se infiere que el complejo entre el poloxámero y la insulina es el responsable de la disminución del crecimiento bacteriano observado en la figura 23 (57,65).

La determinación de IC_{50} (concentración inhibitoria 50) no fue calculable efectivamente para la mayoría de las concentraciones, pero el efecto sobre el control de la densidad bacteriana en ambas cepas, es notorio y apreciable. Al comparar contra los controles (clindamicina y ciprofloxacino) se visualiza el efecto de ambos antibióticos sobre los microorganismos, que, si bien es superior al de la membrana obtenida, nos da una idea del potencial del sistema obtenido, ya que, a pesar de no tener antibióticos incorporados, logran controlar en cierta medida el crecimiento bacteriano. El control ejercido por la membrana fabricada sobre el crecimiento bacteriano de cepas de interés clínico representa el potencial en la prevención y control de infecciones en heridas.

Cada una de estas propiedades que presenta la membrana, se resumen la imagen 25.

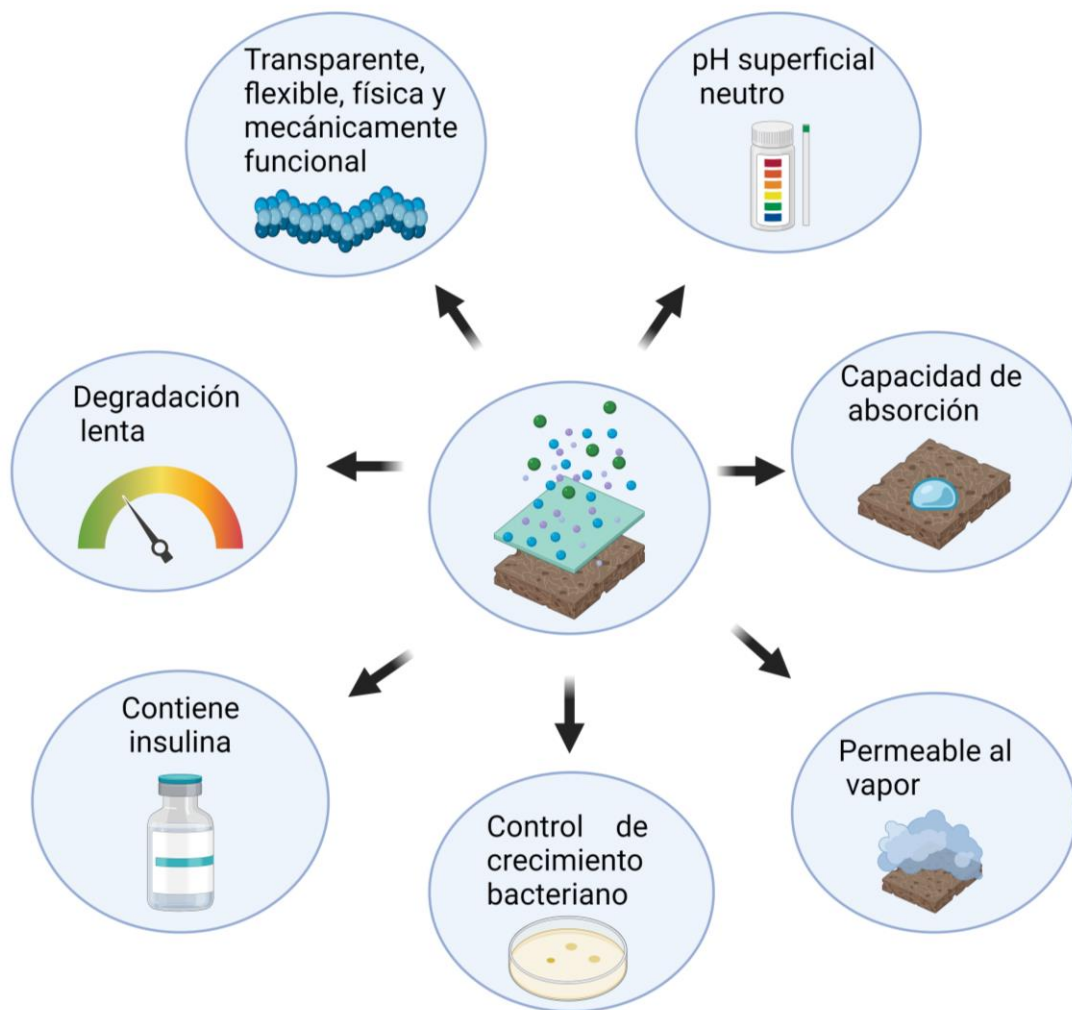


Imagen 25. Resumen de las propiedades en la membrana obtenida. Elaboración propia con BioRender.

8. Conclusiones

Se elaboró y estandarizó el proceso de fabricación, de una membrana polimérica ,con alginato de sodio, quitosano, polivinilpirrolidona K-30, poloxámero 407, aceite esencial de romero e insulina, mediante la técnica de solvent-casting.

La membrana obtenida mostró propiedades físicas y mecánicas adecuadas para su posible aplicación en heridas, tales como: transparencia, adhesividad, flexibilidad, ausencia de burbujas y grumos, pH neutro, alta grado absorción e hidrofiliidad, portando 43.964 ± 2.578 UI de insulina que, de acuerdo con la literatura, muestra efecto si se administra tópicamente sobre el cierre de una herida, sin alterar la glucosa sistémica del individuo.

La membrana presentó inhibición bacteriana de entre 30-50% sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, cepas de interés clínico.

9. Perspectivas

Evaluar la citotoxicidad de la formulación, determinar el posible comportamiento al ser aplicada en una herida.

Evaluar el potencial de la membrana fabricada sobre el cierre de heridas, en *pruebas in vitro* mediante un ensayo de rayadura.

10. Bibliografía

1. Coleman S, Gorecki C, Nelson EA, Closs SJ, Defloor T, Halfens R, et al. Patient risk factors for pressure ulcer development: Systematic review. *Int J Nurs Stud*. 2013 Jul;50(7):974–1003.
2. López-Becerril DrJO. La Evolución en el Manejo de Heridas y su Importancia sobre la Historia de la Humanidad - Asociación Mexicana de Cirugía General [Internet]. [cited 2023 Oct 12]. Available from: <https://amcg.org.mx/la-evolucion-en-el-manejo-de-heridas-y-su-importancia-sobre-la-historia-de-la-humanidad/>
3. Cuidado de heridas Tamaño del mercado, participación e informe de crecimiento, 2030 [Internet]. [cited 2023 Aug 30]. Available from: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/wound-care-market>
4. Romero Mireles L. Más de 75 % de la población presenta sobrepeso u obesidad - Gaceta UNAM [Internet]. [cited 2023 Aug 8]. Available from: <https://www.gaceta.unam.mx/mas-de-75-de-la-poblacion-presenta-sobrepeso-u-obesidad/>
5. Vela-Anaya G, Stegensek-Mejía EM, Leija-Hernández C. Características epidemiológicas y costos de la atención de las heridas en unidades médicas de la Secretaría de Salud. *Revista de Enfermería del Instituto Mexicano del Seguro Social* [Internet]. 2018;26(2):105–14. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/enfermeriaimss/eim-2018/eim182g.pdf>
6. Castañón Ramírez NF. Gaceta del Senado [Internet]. 2019 [cited 2022 Dec 26]. Available from: https://www.senado.gob.mx/64/gaceta_del_senado/documento/94316
7. Secretaria De Salud. 170. Cuenta México con centro de alta especialidad para atender quemaduras graves | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx. El Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados del Instituto Nacional de Rehabilitación cuenta con el único banco de piel certificado en Latinoamérica [Internet]. 2021;1–5. Available from: <https://www.gob.mx/salud/prensa/170-cuenta-mexico-con-centro-de-alta-especialidad-para-atender-quemaduras-graves>
8. Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [cited 2023 Aug 8]. Available from: <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>
9. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. [cited 2023 Mar 16]. Available from: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
10. Castellanos-Ramírez DK, Gonzalez-Villordo D, Gracia-Bravo LJ, Castellanos-Ramírez DK, Gonzalez-Villordo D, Gracia-Bravo LJ. Manejo de heridas. *Cirujano general* [Internet]. 2014 [cited 2023 Oct 1];36(2):112–20. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-00992014000200112&lng=es&nrm=iso&tlng=es
11. Fernando Valero-Valdivieso M, Ortégón Y, Uscategui Y. BIOPOLÍMEROS: AVANCES Y PERSPECTIVAS BIOPOLYMERS: PROGRESS AND PROSPECTS. 2013;80:171–80.
12. Becerra-Bracamontes F, Sánchez-Díaz JC, Arellano-Ceja J, González-Álvarez A, Martínez-Ruvalcaba A. EFECTO DEL pH Y LA CONCENTRACION DEL FOSFATO DIBASICO DE SODIO EN LAS PROPIEDADES DE HINCHAMIENTO DE HIDROGELES DE QUITOSANA EFFECT OF pH AND SODIUM PHOSPHATE DIBASIC CONCENTRATION ON THE SWELLING PROPERTIES OF CHITOSAN HYDROGELS [Internet]. Vol. 8, *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2009. Available from: www.amidiq.org

13. Bustamante-Montes P, Lizama-Soberanis B, Olaíz-Fernández G, Vázquez-Moreno F. FTALATOS Y EFECTOS EN LA SALUD. Vol. 17, Rev. Int. Contam. Ambient. 2001.
14. Ambadas Payghan S, Intru Disouza J. Polymer Based Wafer Technology: A Review [Internet]. 2010. Available from: www.ijpba.info
15. Paredes Salido Fernando RFJJ. Actividad antiinfecciosa. 2004 Mar.
16. TORRES NY. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA PIEL [Internet]. [cited 2023 Sep 22]. Available from: https://www.academia.edu/38963331/ANATOM%C3%8DA_Y_FISIOLOG%C3%8DA_DE_LA_PIEL
17. Bosch A. Las heridas y su tratamiento [Internet]. 2001 [cited 2023 Jan 1]. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13018317>
18. Esteva E. El tratamiento de las Heridas. 2006.
19. Cortaduras y heridas penetrantes: MedlinePlus enciclopedia médica [Internet]. [cited 2023 Nov 24]. Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000043.htm>
20. Raspadura: MedlinePlus enciclopedia médica [Internet]. [cited 2023 Nov 24]. Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/007212.htm>
21. Lesión por aplastamiento: MedlinePlus enciclopedia médica [Internet]. [cited 2023 Nov 24]. Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000024.htm>
22. Quemaduras - Síntomas y causas - Mayo Clinic [Internet]. [cited 2023 Nov 24]. Available from: <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/burns/symptoms-causes/syc-20370539>
23. ESTEVA E. El tratamiento de las heridas. Offarm [Internet]. 2006 Sep 1 [cited 2023 May 10];25(8):54–60. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-el-tratamiento-heridas-13094127>
24. Bosch Á. Úlceras por presión. Prevención, tratamiento y consejos desde la farmacia. Offarm [Internet]. 2004 Mar 1 [cited 2023 Nov 24];23(3):130–4. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-ulceras-por-presion-prevencion-tratamiento-13059416>
25. Gómez Ayala AE. Úlceras vasculares. Factores de riesgo, clínica y prevención. Farmacia Profesional [Internet]. 2008 Jun 1 [cited 2023 Nov 24];22(6):33–8. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-ulceras-vasculares-factores-riesgo-clinica-13124067>
26. Úlceras neuropáticas o del pie diabético | Fundación Piel Sana AEDV [Internet]. [cited 2023 Nov 24]. Available from: <https://aedv.fundacionpielsana.es/wikiderma/ulceras-neuropaticas-y-endocrino-metabolicas/>
27. ▷ Cuidados de Enfermería de las úlceras neoplásicas - Ocronos - Editorial Científico-Técnica [Internet]. [cited 2023 Nov 24]. Available from: <https://revistamedica.com/cuidados-enfermeria-ulceras-neoplasicas/>
28. Veterinario M, Docente Z, Básicas C, Semillero FDL, Basto CV, Resumen R. CICATRIZACIÓN: PROCESO DE REPARACIÓN TISULAR. APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS Artículo de Revisión. Vol. 20, Investigaciones ANDINA INVESTIGACIONES ANDINA. No.
29. Lucha Fernández V, Muñoz Mañez V, Fornes Pujalte B, García Garcerá M. La cicatrización de las heridas. Enfermería Dermatológica [Internet]. 2008;2(3):8–15. Available from: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4606613&info=resumen&idioma=SPA>
30. Veterinario M, Docente Z, Básicas C, Semillero FDL, Basto CV, Resumen R. Cicatrización: proceso de reparación tisular. aproximaciones terapéuticas. Revista Investigaciones Andina [Internet]. 2010 [cited 2023 Oct 7];12(20):85–98. Available from: <https://revia.areandina.edu.co/index.php/IA/article/view/242>

31. Obesidad y sobrepeso. Menos kilos, más vida | Procuraduría Federal del Consumidor | Gobierno | gov.mx [Internet]. [cited 2023 Aug 13]. Available from: <https://www.gob.mx/profec/documentos/obesidad-y-sobrepeso-menos-kilos-mas-vida>
32. Arboleya-Casanova H, Morales-Andrade E. Artículo Original Epidemiología del pie diabético: base de datos de la CONAMED Epidemiology of diabetic foot: experience of CONAMED Resumen. Vol. 13, Revista CONAMED. 2008.
33. Torres-Machorro A, Ruben-Castillo C, Torres-Roldán JF, Miranda-Gómez ÓF, Catrip-Torres J, Hinojosa CA. The economic and social costs of the diabetic foot and its amputations. Current situation in the Mexican population. Revista Mexicana de Angiología. 2020;48(2):53–64.
34. Guadalupe A, Tapia P, Sánchez Vázquez M, Carina D, Mata B, Charcas RM, et al. Artículo original. Rev Esp Méd Quir [Internet]. 2012 [cited 2022 Dec 26];17. Available from: www.nietoeditores.com.mx
35. J. Birmingham D. ENFERMEDADES DE LA PIEL. ENCICLOPEDIADESALUDY SEGURIDADEN ELTRABAJO. 2001;
36. Mena C. Servicio De Dermatología Guías Diagnósticas Y Terapéuticas De Las 10 Patologías Más Frecuentes. Hospital infantil de México “Federico Gómez.” 2003;8.
37. Enfermedades de la piel & prevención Archivos - Fundación Mexicana para la Dermatología A.C. [Internet]. [cited 2022 Dec 26]. Available from: <https://fmd.org.mx/categoria/articulos-interes/enfermedades-piel-prevencion/>
38. Herrera-Sánchez DA, Hernández-Ojeda M, Vivas-Rosales IJ. Estudio epidemiológico sobre dermatitis atópica en México. Rev Alerg Mex [Internet]. 2019 Jun 14 [cited 2022 Dec 26];66(2):192–204. Available from: <https://revistaalergia.mx/ojs/index.php/ram/article/view/591>
39. Peniche J. Acné. REVISTA DE LA FACULTAD DE MEDICINA. 1980;XXIII:28–35.
40. Redacción EF. Acné afecta al 80% de los mexicanos; uso de cubrebocas aumentó el padecimiento – El Financiero [Internet]. 2022 [cited 2022 Dec 26]. Available from: <https://www.elfinanciero.com.mx/salud/2022/09/05/acne-afecta-al-80-de-los-mexicanos-uso-de-cubrebocas-aumento-el-padecimiento/>
41. WOUND INFECTION IN CLINICAL PRACTICE Principles of best practice [Internet]. Available from: www.woundsinternational.com
42. Martín Saco G, Galán Sánchez F, Mormeneo Bayo S, Candel Francisco J, García Juan M. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de heridas crónicas [Internet]. 2022. 57 p. Available from: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento75.pdf>
43. Martínez-Correa E, Osorio-Delgado MA, Henao-Tamayo LJ, Castro-Herazo CI, Martínez-Correa E, Osorio-Delgado MA, et al. Clasificación Sistemática de Apósitos: Una Revisión Bibliográfica. Revista mexicana de ingeniería biomédica [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2023 Sep 6];41(1):5–28. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-95322020000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
44. Secretaria de Salud. Manual Clínico para la estandarización del cuidado y tratamiento a pacientes con heridas agudas y crónicas [Internet]. 2016 [cited 2023 Jan 18]. Available from: http://www.calidad.salud.gob.mx/site/editorial/docs/Manual_Clinico_Heridas.pdf
45. COCYTEN. Descubrimiento de la Aspirina [Internet]. 2019 [cited 2023 Nov 24]. Available from: <https://www.cocytten.gob.mx/post/descubrimiento-de-la-aspirina>
46. Espinosa AJV. Codiphagia in the Libellus de medicinalibus indorum herbis (1552). Hipogrifo. 2020;8(2):841–54.

47. Plantas medicinales de México | Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales | Gobierno | gob.mx [Internet]. [cited 2022 Dec 29]. Available from: <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/plantas-medicinales-de-mexico?idiom=es>
48. Flores-Villa E, Sáenz-Galindo A, Oliva Castañeda-Facio A, Narro-Céspedes RI. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): su origen, importancia y generalidades de sus metabolitos secundarios. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas [Internet]. 2020 Jan 17 [cited 2023 Jan 1];23(2020):1–17. Available from: <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.266>
49. Lemjallad L, Chabir R, Rodi YK, Ghadraoui L el, Chahdi FO, Errachidi F. Improvement of Heliculture by Three Medicinal Plants Belonging to the Lamiaceae Family. 2019 [cited 2023 Jan 1]; Available from: <https://doi.org/10.1155/2019/2630537>
50. Azimova SS, Glushenkova AI. *Rosmarinus officinalis*. Lipids, Lipophilic Components and Essential Oils from Plant Sources. 2012;472–472.
51. Carlos Andrés Coy Barrera C, Eunice Acosta G. Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. Revista Cubana de Plantas Medicinales [Internet]. 2013 [cited 2023 Nov 24];18(2):237–46. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
52. LÓPEZ LUENGO MT. El romero. Planta aromática con efectos antioxidantes. Offarm [Internet]. 2008 Jul 1 [cited 2023 Nov 24];27(7):60–3. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-el-romero-planta-aromatica-con-13124840>
53. Roth GmbH C. Ficha de datos de seguridad conforme al Reglamento (CE) no 1907/2006 (REACH) Aceite de romero Español. CARL ROTH [Internet]. 2021 Jul 29 [cited 2022 Dec 29];6514. Available from: www.carlroth.de
54. Rondón R. Evaluación antimicrobiana in vitro del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” frente a bacterias patógenas Grampositivas y Gramnegativas. 2013;113.
55. Lopez-Serrano F, Mendizabal E. Introducción a la ciencia de los polímeros Selective Drug Delivery Systems View project Understanding/modeling the Pickering emulsion polymerization SiO₂-supported View project [Internet]. 2015. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/286457627>
56. Página Preliminar de Conceptos [Internet]. [cited 2023 Nov 24]. Available from: <https://www.pslc.ws/spanish/intro.htm>
57. Coreño-Alonso J, Méndez-Bautista MT. Relación estructura-propiedades de polímeros. Educación Química [Internet]. 2010 Oct 1 [cited 2023 Nov 24];21(4):291–9. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-educacion-quimica-78-articulo-relacion-estructura-propiedades-polimeros-S0187893X18300983>
58. Juan Escobar-Chávez J, López-Cervantes M, Kalia Y, Quintanar D, Escobar-Chávez JJ, López-Cervantes M, et al. Applications of thermo-reversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations Use of chemical and physical enhancers for transdermal drug delivery View project Development of nanoparticles for food systems to increase the shelf life and nutraceutical quality of fresh-cut and juice fruits View project APPLICATIONS OF THERMO-REVERSIBLE PLURONIC F-127 GELS IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS [Internet]. Vol. 9, J Pharm Pharmaceut Sci (www.cspsCanada.org). 2006. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/6594604>
59. Guzálin M, Aberturas MR, Garcia F, Molpeceres J. Gelatine Gels and Polyoxyethylene-Polyoxypropylene Gels: Comparative Study of Their Properties. <http://dx.doi.org/103109/03639049409049337> [Internet]. 2008 [cited 2023 Jan

- 14];20(12):2041–8. Available from:
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/03639049409049337>
60. Gioffredi E, Boffito M, Calzone S, Giannitelli SM, Rainer A, Trombetta M, et al. Pluronic F127 Hydrogel Characterization and Biofabrication in Cellularized Constructs for Tissue Engineering Applications. In: *Procedia CIRP*. Elsevier B.V.; 2016. p. 125–32.
 61. Alejandra I, Medina C, Fernández V, González A, Salas-osorio E. membranes on bacteria of dental interest. 2022;23(1):27–39.
 62. Pérez Cordero A, Rojas Sierra J, Rodríguez Ruiz J, Arrieta Álvarez I, Arrieta Álvarez Y, Rodríguez Carrascal A. Actividad antibacteriana de soluciones acidas de quitosano obtenido de exoesqueleto de camarón. *Rev Colomb Biotecnol* [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2023 Apr 8];16(1):104–10. Available from:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752014000100013&lng=en&nrm=iso&tlng=es
 63. Sun J, Tan H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. *Materials*. 2013;6(4):1285–309.
 64. Hurtado A, Selgas R, Serrano Aroca Á. El alginato y sus inmensas aplicaciones industriales. *Nereis Interdisciplinary Ibero-American Journal of Methods, Modelling and Simulation*. 2020;(12):137–49.
 65. Avendaño -Romero GC, López -Malo A, Palou E. Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos.
 66. Ore Y, Renzo Pichilingue E, Ana L, Valderrama C. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ALGINATO DE SODIO DE LA MACROALGA *Macrocystis pyrifera* EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF SODIUM ALGINATE FROM THE MACROALGAE *Macrocystis pyrifera*. *Negrón* 276 *Rev Soc Quím Perú*. 86(3):2020.
 67. Méndez Reyes DA, Quintero Cerón JP, Váquiro Herrera HA, Solanilla Duque José Fernando. revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2015. p. 89–113
 Alginato de sodio en el desarrollo de películas comestibles. Available from:
https://www.researchgate.net/publication/294892030_Alginato_de_sodio_en_el_desarrollo_de_películas_comestibles_Sodium_alginate_in_the_development_of_edible_films
 68. Alberto J, Reyes O, Plancarte AA. BASES MOLECULARES DE LAS ACCIONES DE LA INSULINA. *Revista de Educación Bioquímica*. 2008 Mar;27(1):9–18.
 69. Chen X, Liu Y, Zhang X. Topical insulin application improves healing by regulating the wound inflammatory response. *Wound Repair Regen* [Internet]. 2012 May [cited 2023 Feb 18];20(3):425–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22564234/>
 70. Wang J, Xu J. Effects of Topical Insulin on Wound Healing: A Review of Animal and Human Evidences. 2020 [cited 2023 Feb 12]; Available from: <http://doi.org/10.2147/DMSO.S237294>
 71. Jiao Wang, Jixiong Xu. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy. 2020 [cited 2023 Jan 16]. p. 720–7 Effects of Topical Insulin on Wound Healing: A Review of Animal and Human Evidences. Available from:
<https://www.dovepress.com/getfile.php?fileID=56796>
 72. Beam JW. Topical Silver for Infected Wounds. [cited 2023 Jan 13]; Available from:
www.nata.org/jat
 73. Abdelkader DH, Tambuwala MM, Mitchell CA, Osman MA, El-Gizawy SA, Faheem AM, et al. Enhanced cutaneous wound healing in rats following topical delivery of insulin-loaded nanoparticles embedded in poly(vinyl alcohol)-borate hydrogels. [cited 2023 Jan 14]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s13346-018-0554-0>
 74. Attia EAS, Belal DMI, el Samahy MH, el Hamamsy MH. A pilot trial using topical regular crystalline insulin vs. aqueous zinc solution for uncomplicated cutaneous wound healing: Impact on quality of life. *Wound Repair and Regeneration* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2023 Jan 13];22(1):52–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/wrr.12122>

75. Emanuelli T, Burgeiro A, Carvalho E. Effects of insulin on the skin: possible healing benefits for diabetic foot ulcers. *Archives of Dermatological Research* 2016 308:10 [Internet]. 2016 Sep 21 [cited 2023 Jan 28];308(10):677–94. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00403-016-1686-z>
76. Shi C, Wang C, Liu H, Li Q, Li R, Zhang Y, et al. Selection of Appropriate Wound Dressing for Various Wounds. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020 Mar 19;8:511530.
77. Técnicas - Espectroscopia Infrarroja - Caracterización de Materiales Cristalinos [Internet]. [cited 2023 Oct 2]. Available from: <https://www.ehu.eus/imacris/PIE06/web/IR.htm>
78. Elgegren Lituma M. Membranas de alginato - aloe vera (*Aloe barbadensis*) con potencial aplicación para apósitos para tratamiento de heridas. 2021 Dec 17 [cited 2023 May 10]; Available from: <https://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/20.500.12404/21186>
79. Fernanda L, Chabala G, Londoño López ME, Elena C, Cuartas E. Caracterización de matrices de Polivinil alcohol-Alginato-Quitosano-Aloe vera. *Rev Ing Biomed* [Internet]. 2018 Dec 10 [cited 2023 Jul 3];12(23). Available from: <https://revistas.eia.edu.co/index.php/BME/article/view/806>
80. Bombaldi de Souza RF, Bombaldi de Souza FC, Bierhalz ACK, Pires ALR, Moraes ÂM. Biopolymer-based films and membranes as wound dressings. In: *Biopolymer Membranes and Films: Health, Food, Environment, and Energy Applications*. Elsevier; 2020. p. 165–94.
81. Vega-Medina L, Perez-Gutiérrez B, Helena Camargo L. *Revista Politécnica*. 2016 [cited 2023 Nov 13]. p. 41–50 MODELO DE PIEL, MÚSCULO Y VENA PARA ENTRENAMIENTO DE PUNCIÓN SUBCLAVIA EN ACCESO VENOSO CENTRAL EN PEDIATRÍA. Available from: <https://www.redalyc.org/journal/6078/607863422005/html/>
82. Rieger MM. The pH of the Stratum Corneum: An Update. Vol. 115. 2000.
83. Orlandi MC. *DERMATOLOGÍA COSMÉTICA*. Vol. 15, *Folia dermatol.* Perú. 2004.
84. S.S.A. Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables para farmacias y público en general. Insulina humana regular [Internet]. 2007 [cited 2023 Nov 27]. Available from: http://www.facmed.unam.mx/bmd/gi_2k8/prods/PRODS/Insulina%20humana%20regular.htm
85. Marmur A, Volpe C Della, Siboni S, Amirfazli A, Drelich JW. Contact angles and wettability: Towards common and accurate terminology. *Surf Innov* [Internet]. 2017 Jan 6 [cited 2023 Jul 3];5(1):3–8. Available from: https://www.researchgate.net/publication/312480474_Contact_Angles_and_Wettability_Towards_Common_and_Accurate_Terminology
86. Parikh D V., Fink T, Delucca AJ, Parikh AD. Absorption and swelling characteristics of silver (I) antimicrobial wound dressings. *Textile Research Journal* [Internet]. 2011 [cited 2023 Jul 3];81(5):494–503. Available from: https://www.researchgate.net/publication/258196472_Absorption_and_swelling_characteristics_of_silver_I_antimicrobial_wound_dressings
87. López Á, Rivas J, Loaiza M, Sabino M. Degradación de películas plastificadas de quitosano obtenidas a partir de conchas de Camarón (*L.vannamei*). *Revista de la Facultad de Ingeniería*. 2010;25(2):133–43.
88. Macea RB, De Hoyos CF, Montes YG, Fuentes EM, Ruiz JIR. Síntesis y propiedades de filmes basados en quitosano/lactosuero Síntesis y propiedades de filmes basados en quitosano/lactosuero. *Polímeros*. 2015;25(1):58–69.
89. Ramírez A. R, Dagnino U. B. Curación de heridas: Antiguos conceptos para aplicar y entender su manejo avanzado. *Cuadernos de Cirugía*. 2006;20(1):92–9.
90. Valencia-Gómez LE, Martel-Estrada SA, Vargas-Requena CL, Rodríguez-González CA, Olivas-Armendáriz I, Valencia-Gómez LE, et al. Apósitos de polímeros naturales para regeneración de piel. *Revista mexicana de ingeniería biomédica* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2023 Oct 9];37(3):235–49. Available from:

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-95322016000300235&lng=es&nrm=iso&tlng=es

91. Martínez-Correa E, Osorio-Delgado MA, Henao-Tamayo LJ, Castro-Herazo CI, Martínez-Correa E, Osorio-Delgado MA, et al. Clasificación Sistemática de Apósitos: Una Revisión Bibliográfica. *Revista mexicana de ingeniería biomédica* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2023 Nov 28];41(1):5–28. Available from:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-95322020000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
92. Treangen TJ, Maybank RA, Enke S, Friss MB, Diviak LF, David DK, et al. Complete Genome Sequence of the Quality Control Strain *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923. *Genome Announc* [Internet]. 2014 [cited 2023 Nov 27];2(6). Available from:
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/genomea.01110-14>
93. Cao H, Lai Y, Bougouffa S, Xu Z, Yan A. Comparative genome and transcriptome analysis reveals distinctive surface characteristics and unique physiological potentials of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *BMC Genomics* [Internet]. 2017 Jun 12 [cited 2023 Nov 27];18(1):1–17. Available from:
<https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-3842-z>
94. Troncoso C, Pavez M, Santos A, Salazar R, Barrientos L, Troncoso C, et al. Implicancias Estructurales y Fisiológicas de la Célula Bacteriana en los Mecanismos de Resistencia Antibiótica. *International Journal of Morphology* [Internet]. 2017 [cited 2023 Nov 27];35(4):1214–23. Available from:
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022017000401214&lng=es&nrm=iso&tlng=es