



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN CICATRIZANTE DE UN APÓSITO EN BASE A UN
HIDROGEL CON PROPIEDADES DE LIBERACIÓN SOSTENIDA DE
COMPUESTOS BIOACTIVOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA
MÉDICA**

**AUTOR: NICOLÁS ORTEGA POZO
PROFESOR GUIA: DR. ESTEBAN DURÁN LARA**

TALCA-CHILE

2019

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

INDICE

I.	Resumen.....	5
II.	Introducción.....	6
III.	Marco teórico.....	8
	1.- La piel.....	8
	1.1 La epidermis.....	9
	1.2 La dermis	11
	2.- Cicatrización.....	12
	2.1 Factores que afectan la cicatrización.....	13
	3.- Compuestos con actividad cicatrizante.....	14
	3.1 Alantoína.....	15
	3.2 Acido cafeico.....	16
	3.3 Dexpanthenol.....	16
	3.4 Resveratrol.....	18
	4.-Apositos.....	19
	4.2 Tipos de apósitos.....	21
	5.-Hidrogeles como soporte.....	22
	5.1 Hidrogeles de alcohol polivinílico (PVA).....	24
	6.-Liberacion controlada de medicamentos.....	25
IV.	Hipótesis y objetivos.....	29
	1.-Hipotesis	29
	2.-Objetivos general.....	29

3.-Objetivos específicos.....	29
V. Materiales y métodos.....	30
1.-Síntesis y caracterización de los hidrogeles.....	30
2.-Estudio de hinchazón y degradación.....	31
3.-Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM).....	31
4.-Medición de la liberación de compuestos cicatrizantes por HPLC.....	32
5.-Pruebas de cicatrización de heridas en modelos dérmicos de ratas.....	32
5.1 Procedimiento experimental.....	33
5.2 Modelo experimental y sus respectivas combinaciones.....	34
VI. Resultados.....	35
1.- Estudio de hinchazón y degradación del hidrogel.....	35
2.- Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM).....	36
3.- Liberación de los compuestos con actividad cicatrizante.....	37
4.- Análisis macroscópico de la cicatrización inducida por hidrogeles.....	38
VII. Discusión.....	40
VIII. Conclusiones.....	44
IX. Referencias bibliográficas.....	45

INDICE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo del estudio.....	16
Figura 2: Esterificación y formación de enlaces covalentes entre moléculas de PVA....	27
Figura 3: Esquema de la síntesis del hidrogel en base a ácido aspártico.....	30
Figura 4: Esquema del modelo <i>in vivo</i> experimental del estudio.....	34
Tabla 1: Tabla de hidrogeles.....	34
Tabla 2: Tabla de concentraciones.....	34
Figura 5: Índice de hinchazón del hidrogel a distintos pH en relación con el tiempo.....	35
Figura 6: Imágenes de microscopía electrónica de barrido.....	36
Figura 7: Perfil de liberación de compuestos con actividad cicatrizantes.....	37
Figura 8: Resultados preliminares de la rata n°1.....	38
Figura 9: Resultados preliminares de la rata n°2.....	39

I. RESUMEN

Los hidrogeles son una red de moléculas compuestas por polímeros dispuestos de manera lineal, los cuales son reticulados con agentes entrecruzantes formando así una molécula tridimensional que tendrá como característica principal la capacidad de absorber grandes cantidades de agua u otros solventes que pueden servir como matriz y vehículo para la administración de un tratamiento. Su biocompatibilidad le permite ser utilizado en medicina, formando parte de apósitos dado principalmente por su capacidad de liberar de manera controlada y sostenida el compuesto deseado. Con el fin de probar en vivo el uso terapéutico de estos biomateriales, en el presente trabajo se desarrolló un hidrogel basado en poli (vinil alcohol) (PVA) y ácido aspártico como agente entrecruzante, que confiere estabilidad y flexibilidad al material. A este sistema se le añadió un coctel de compuestos con actividades cicatrizantes (alantoína, ácido cafeico, dexpanthenol, resveratrol) ampliamente descritas y utilizadas en cremas y ungüentos en el mercado.

La fórmula realizada en base a PVA y ácido aspártico fue exitosamente sintetizada y se comprobó su capacidad de hinchazón a distintos rangos de pH, dando a conocer las excelentes propiedades mecánicas de este hidrogel. Asimismo, esta formulación fue capaz de contener los compuestos y liberarlos de forma controlada a lo largo del tiempo, por lo que esta fórmula podría ser considerada para su uso como un sistema de liberación controlada de drogas.

Las pruebas in vivo sugieren de manera preliminar que la formulación de hidrogel tuvo un buen desempeño en el papel de la cicatrización con respecto a los resultados basados en el control comercial.

Palabras clave: Hidrogel, cicatrización, liberación, regeneración, apósitos

II. INTRODUCCIÓN

La piel es el principal sistema de defensa exterior que protege los sistemas internos del ataque de microorganismos patógenos, contaminación, infección y efectos del medio externo, está compuesta principalmente por 3 capas que son la dermis, epidermis e hipodermis(1-3) que mantienen y cumplen un rol fundamental en la regeneración de tejido.

Las capas superiores de la epidermis o las capas del estrato córneo se constituyen como la barrera principal contra la penetración percutánea de cualquier invasión externa. La capa de dermis existe exactamente adyacente a la capa de epidermis y consiste en una matriz de tejidos conectivos que proporciona la elasticidad y resistencia a la deformación para la piel. Además, la capa dermis es la que contiene los vasos sanguíneos que proporcionarían el oxígeno y los nutrientes que necesitan todas las capas que la componen (1).

La producción de un daño en una de estas capas ocasionará que la defensa otorgada por la piel disminuya y se favorezca la entrada de microorganismos que podrían conllevar a una infección o consecuencia grave para la salud, es por esto que es de vital importancia mantener esta barrera natural íntegra y funcional en caso de que se produzca una injuria o daño.

Una herida se describe como una rotura o defecto en la piel, que se formó debido a un daño mecánico, químico o biológico, esta herida puede subdividirse en heridas agudas y crónicas dependiendo del tipo de daño y tiempo de recuperación que presente. Las heridas agudas son lesiones de la piel que necesitan curación durante períodos cortos de aproximadamente 8 a 12 semanas, como quemaduras y lesiones químicas que producen un contacto de desgaste entre la piel y la superficie dura. Las heridas crónicas necesitan un largo tiempo de curación que llega a los meses y deja cicatrices graves, esto puede deberse muchas veces a patologías asociadas como la diabetes que tiene un efecto adverso en el proceso de cicatrización de las personas (4).

La cicatrización es un proceso que tiene como finalidad recuperar la integridad de la piel luego de la herida, esto ocurre a través de una serie de complejas reacciones bioquímicas que en conjunto contribuirán a la reparación del tejido afectado, estas reacciones pueden ser agrupadas en 3 fases que constituirán la cicatrización. La primera corresponde a la fase inflamatoria, en donde existirá un reclutamiento de células del sistema inmune que liberarán citoquinas con el fin de neutralizar el organismo que pudo haber penetrado la barrera. Paralelamente se activa la segunda fase que corresponde a la de proliferación en donde aumentará la afluencia de fibroblastos en la zona de la herida y además se promoverá la reparación del tejido y vasos sanguíneos que hayan sido dañados. Posterior a ambas fases se concluye en la fase de remodelación en donde las células que ya no están cumpliendo una función son degradadas y también se comienza a producir un recambio en las fibras de colágeno con el fin de obtener una estructura más sólida y resistente

La inducción de la cicatrización no es un proceso nuevo, sin embargo, es importante ya que hay patologías muy comunes que tienen como una de sus consecuencias la baja tasa de cicatrización, muchas veces produciendo infecciones recurrentes graves por infiltración de microorganismos. Es por esto que facilitar la cicatrización en pacientes que tengan un déficit de esta o simplemente acelerar el proceso contribuirá a una mejora en la salud sustancial para prevenir infecciones típicas de estas heridas. En la literatura se han descrito diversas moléculas que tienen un efecto positivo en alguno de los procesos que componen la cicatrización, una de estas moléculas es la alantoína que se encuentra de forma natural en plantas y animales, siendo un producto de desecho del metabolismo de las proteínas. Esta molécula se ha descrito como un cicatrizante natural promoviendo el crecimiento del tejido sano y el desprendimiento de las células muertas. Otro compuesto con una posible implicancia en la cicatrización es el ácido cafeico, que se ha descrito como un potente antioxidante y antiinflamatorio que además posee cualidades anti carcinogénicas que podrían ser aplicadas en conjunto para favorecer el proceso de regeneración celular.

III. MARCO TEÓRICO

1. La piel

La piel humana es un órgano barrera complejo formado por una relación simbiótica entre comunidades microbianas en diálogo constante con el huésped por la virtud de señales complejas proporcionadas por los sistemas inmunitarios innato y adaptativo (5), además se constituye como el órgano más grande del cuerpo humano (6). Constituye es un órgano activo de excreción, también participa constantemente en el metabolismo, regulación de la temperatura y respuesta inmunológica.

La piel o cutis recubre toda la superficie externa del organismo. En los orificios naturales está unida a las mucosas por estrechas zonas de transición, denominadas zonas mucocutáneas. La piel tiene varias funciones importantes, algunas de ellas son: La conformación de una barrera contra la invasión de microorganismos; Protección contra acciones mecánicas, compuestos químicos, la temperatura y radiaciones (1).

También tiene gran importancia en la regulación del calor y el mantenimiento del equilibrio hídrico, ya que es capaz de absorber y secretar agua. Además, representa un eslabón fundamental en la defensa inmunológica del organismo, contribuyendo a la migración de las distintas células inflamatorias. Por último, la piel es un extenso órgano sensorial, por lo que la accesibilidad inmediata a la piel tiene gran importancia diagnóstica para el diagnóstico de enfermedades cutáneas o relacionadas.

La piel está compuesta por tres regiones con características distintas, estas son: la epidermis, la dermis y la grasa subcutánea(1). La epidermis es la capa más externa de las capas que componen la piel, esta se compone principalmente de queratinocitos produciendo queratina que protegerá a la piel y a tejidos cercanos del calor, productos químicos y microorganismos invasores. En un menor porcentaje se sitúan los melanocitos que

desempeñan un rol fundamental en la absorción de rayos UV y en la producción de melanina que determinara el color de la piel. La dermis corresponde a la capa subyacente a la epidermis, constituyendo la mayor parte de la piel respecto a su total, esta se compone principalmente en fibras de colágeno sintetizadas por fibroblastos dérmicos, que proporcionan resistencia a la tracción y la resistencia mecánica característica de la piel. Finalmente, la hipodermis corresponde a la última capa de la piel y la más profunda, se compone principalmente de tejido adiposo, teniendo una diversidad de funciones que incluyen no solo el aislamiento, la termorregulación y el almacenamiento de energía, sino también las cualidades inmunológicas, inflamatorias y endocrinas (7).

La frecuente exposición a las agresiones del entorno hace que este órgano sea susceptible a sufrir lesiones que comprometan su integridad alterando el normal desarrollo de sus funciones, cuando esto ocurre se induce la cicatrización que se encarga de reparar la funcionalidad del tejido dañado.

1.1 La epidermis

La epidermis es un epitelio plano estratificado cuya función principal es proteger contra acciones lesivas del medio y contra la pérdida de líquidos. Para ello, la epidermis produce una membrana externa protectora, el estrato corneo, compuesto por células aplanadas muertas que contienen el complejo proteico denominado queratina y que esta cementada mediante lípidos intercelulares. En condiciones normales, el estrato corneo se elimina con velocidad constante y se forma al mismo ritmo por proliferación y diferenciación de las células de la porción más profunda del epitelio (8). De este modo se mantiene el espesor característico del estrato corneo sobre la superficie del organismo.

La superficie externa de la epidermis se caracteriza por la presencia de finas arrugas o pliegues, que en la mayor parte de la superficie cutánea se intersecan y forman campos poligonales o romboidales. En cuanto a las palmas de manos y planta de los pies, se observan patrones comunes que corresponden a arrugas profundas y que transcurren paralelas, con

formación de estrechas crestas entre los surcos, que se denominan crestas papilares o crestas de fricción. El nombre se debe a que estas crestas favorecen la presión al aumentar la fricción al contacto con alguna superficie u objeto (8).

La epidermis se compone en su mayor parte, de células que sufren queratinización y simultaneo desplazamiento hacia la superficie de la piel. Esto produce una estructura característica en capas, que se distingue con facilidad en la piel gruesa de las palmas de las manos y la planta de los pies. De acuerdo con lo mencionado se pueden clasificar en dos conceptos histológicos, piel gruesa y piel fina, refiriéndose a estos al espesor de la epidermis, en específico en el grosor del estrato corneo. En la mayor parte de la superficie del organismo, el espesor de la epidermis es de unos 0,1mm y se habla de piel fina. En las zonas lampiñas de las palmas de las manos y plantas de los pies, o piel gruesa, la epidermis puede alcanzar un espesor de más de 1 mm. El estrato corneo se compone de numerosas capas de células planas totalmente queratinizadas anucleadas o células corneas, en consecuencia, esta capa se distingue a las otras como una gruesa masa muy eosinofilia de láminas ondeadas, en la que no se diferencian células. En la superficie tiene lugar a una continua descamación de las células corneas, que se encuentran separadas entre sí.

La epidermis en el resto de la superficie del organismo, también denominada piel fina es mucho más delgada, sobre todo debido a que el estrato corneo es mucho más angosto, pero también como consecuencia al adelgazamiento de las demás capas que conforman la epidermis. Es así como una de las capas de la epidermis llamada estrato espinoso, se compone por menos capas celulares que en la piel gruesa (8).

En cuanto al crecimiento y diferenciación de la epidermis, como bien sabemos la epidermis es una capa dinámica, que se renueva constantemente. Una parte menor de las células basales actúa como células madre, dado que son los únicos queratinocitos capaces de sufrir mitosis, algunas de las células hijas permanecen como células madre, mientras que la gran mayoría, por acción de mecanismos de diferenciación celular, abandonan la capa basal y comienzan la diferenciación. Esta tiene lugar durante la migración a través de la capa

epidérmica y presenta varias modificaciones morfológicas y bioquímicas que conducen a la formación de células muertas queratinizadas del estrato corneo. La producción de células en el estrato basal está en equilibrio con la eliminación de las células corneas de la superficie; el periodo de renovación de la epidermis en humanos es de unas 4 semanas.

1.2 La dermis

La dermis es la gruesa capa de tejido conectivo a la que se fija la epidermis y que se continua en profundidad con el tejido subcutáneo rico en lípidos, en el tejido conectivo dérmico se insertan en los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas y sebáceas. La dermis se compone de dos capas no muy diferenciadas, hacia arriba el estrato papilar, más delgado y por debajo el estrato reticular, más grueso. El estrato papilar se compone de tejido conectivo bastante laxo con gran cantidad de células y un reticulado laxo de delgadas fibras de colágeno, sobre todo colágeno tipo III. En las papilas se suelen ver asas capilares (8).

El estrato reticular es mucho más denso con gruesas fibras de colágeno, en donde predomina el colágeno tipo I, estas se disponen en grandes haces. Además de las fibras de colágeno, la dermis contiene abundantes fibras elásticas que forman un reticulado entre los haces de colágeno. Las células que se encuentran con mayor frecuencia son fibroblastos y macrófagos, pero también se encuentra una gran cantidad de mastocitos

Es esta capa además se observa predominancia de musculatura lisa, en parte como los músculos responsables de la erección del pelo y relacionado con los folículos pilosos, y en parte como un reticulado más coherente en la parte más profunda del estrato reticular de la piel, por debajo de las areolas mamarias, el pene, el escroto y el perineo, sin embargo, hay musculatura estriada en zonas como la piel de la cara, donde los músculos de la mímica se fijan a la dermis (8).

La gran cantidad de colágeno confiere a la dermis una notable fortaleza mecánica, muy importante para la función protectora de la piel. El colágeno también es la base de la certidumbre de la piel a cuero. Por su parte el contenido de elastina contribuye a las propiedades elásticas de la piel que se demuestran, por ejemplo, cuando se levanta un pliegue entre los dedos; al soltarlos, volviendo a su posición extendida.

2. La cicatrización

La cicatrización corresponde a un proceso dinámico mediado por proteínas solubles, factores de crecimiento, citoquinas y células encargadas de la proliferación celular para el restablecimiento del tejido lesionado (9), este complejo fenómeno depende de la interrelación de los elementos celulares que producen las proteínas necesarias para la reacción inflamatoria y la reparación del tejido.

Luego de la lesión al tejido se induce una cascada de eventos que producen la reparación de la lesión, se conduce por factores de crecimiento generados por las células implicadas en el proceso como queratinocitos, fibroblastos y células inflamatorias. Estos factores de crecimiento regulan la proliferación y la diferenciación celular que dará como resultado final la regeneración del tejido lesionado. Generalmente este proceso se subdivide en 3 etapas, sin considerar la etapa de coagulación que se inicia inmediatamente después de presentarse la lesión y puede tener una duración de hasta 15 minutos luego de la lesión. Su objetivo principal es evitar la pérdida de fluido sanguíneo mediante el cese de la hemorragia y la formación del coágulo. El coágulo formado tiene funciones específicas tanto de activación celular como de mediación y andamiaje para las células que promueven la fase de inflamación y regeneración del tejido (10).

La primera etapa de la cicatrización es la inflamación, generalmente tiene una duración de hasta seis días, esta se presenta como respuesta protectora e intenta destruir y aislar aquellos agentes que representen peligro para el tejido, ya que sin dicha remoción de las células afectadas no se dará inicio a la formación de nuevo tejido mediante la activación de

queratinocitos y fibroblasto. La segunda fase de la cicatrización es la etapa de proliferación, su principal objetivo es generar una barrera protectora, con el fin de aumentar los procesos regenerativos y evitar el ingreso de agentes nocivos, se caracteriza por la activación de dos grandes procesos: angiogénesis y migración de fibroblastos, los cuales facilitan la formación de una matriz extracelular provisional, que proporciona un andamiaje para la migración celular y la síntesis de una matriz madura. Durante la fase de proliferación celular y formación del tejido de granulación, se expresan principalmente factores como: El factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento de los queratinocitos (KGF), factor de necrosis tumoral (TNF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento nervioso (NGF) y factor de crecimiento insulínico (IGF) (11). Finalmente, la última etapa de la cicatrización corresponde a la de remodelación o maduración, que se caracteriza por la formación, organización y resistencia que obtiene el tejido al formar la cicatriz, lo cual se obtiene de la contracción de la herida generada por los miofibroblastos y la organización de los paquetes de colágeno, esta inicia simultáneamente con la síntesis de la matriz extracelular en la fase de proliferación y puede durar entre uno y dos años, dependiendo la extensión y características de la lesión (12).

2.1 Factores que afectan el proceso de cicatrización

Existen diversos factores conocidos que pueden alterar el proceso de la cicatrización, muchos de ellos se asocian a enfermedades crónicas que por consecuencia tendrán una menor tasa de cicatrización, algunas de estas enfermedades son el síndrome metabólico, diabetes, desnutrición o patologías asociadas al déficit de componentes hemostáticos. También se ha reportado que los pacientes que esten cursando con tratamiento de glucocorticoides padecerán una menor efectividad en la cicatrización respecto a pacientes normales, sin embargo, la enfermedad más conocida y documentada en la literatura asociada a cicatrizaciones deficientes es la neuropatía diabética.

Unas de las principales consecuencias de la diabetes es la ulceración en las extremidades debidas a su baja capacidad cicatrizante luego de una lesión, esto se debe principalmente a la

acumulación de radicales libres (ROS) que se unirán a las moléculas y células encargadas del proceso de cicatrización e iniciará un estallido oxidativo induciendo su apoptosis e impidiendo una correcta cicatrización (13). Además estudios nutricionales indican que un estado de desnutrición altera la estructura de la piel y puede manifestarse físicamente con despigmentación, reducción del número y atrofia de los folículos pilosos, adelgazamiento y, lo que es más importante, demora y complica la cicatrización de heridas(14), por lo que sería un factor muy importante en la reparación del tejido.

3. Compuestos con actividad cicatrizante

Existen diversas patologías de alta incidencia que intervienen en la cicatrización normal, por esto se ha buscado tanto en la naturaleza como de manera sintética nuevos compuestos que tengan la propiedad de facilitar y favorecer este proceso. En la literatura se describe una amplia variedad de compuestos que tienen como función promover la actividad cicatrizante, la mayoría proveniente de la naturaleza.

Las terapias tradicionales de curación de heridas se han investigado de forma experimental y clínica, y en varios estudios se encuentra una gran cantidad de información sobre el papel de las terapias tradicionales en el alivio de las causas subyacentes de las heridas que no curan. Las plantas medicinales se pueden tomar en cuenta como las potentes y prometedoras terapias para mejorar los procesos de curación de heridas en función de la variedad de componentes activos y efectivos, como los flavonoides, aceites esenciales, alcaloides, compuestos fenólicos, terpenoides y ácidos grasos (3) Estas medicinas tradicionales pueden ser preferibles a la terapia moderna debido al bajo costo, los efectos adversos limitados, la biodisponibilidad y la eficacia

El uso de compuestos naturales para el tratamiento de heridas se ha demostrado que es muy eficaz, sin embargo, existen formas de optimizarlo. Una de las formas prometedoras para promover su eficacia es someterlas a un proceso de nanoescalamiento o incorporarlas en nanoestructuras. Los nanomateriales poseen características únicas debido a su tamaño a

nanoescala y la alta proporción de área de superficie a volumen, y la nanodosificación de las plantas medicinales puede ocurrir en asociación con la modificación de sus características físicas y químicas (15), tal como se muestra en la figura numero 1 que representa el modelo experimental de este estudio.

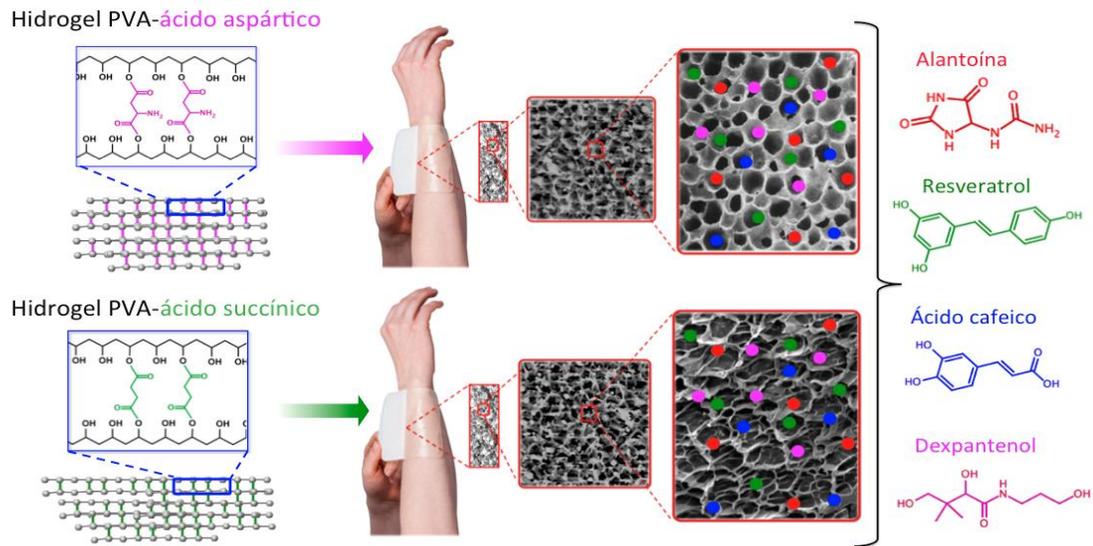


Figura 1: Esquema representativo del estudio: dispositivo basado en hidrogel de polímero como una liberación controlada de compuestos activos que estimulan la cicatrización de heridas, en donde se aprecia la diferencia en la morfología del poro formado dependiente del reticulador empleado

3.1 Alantoína

Uno de los compuestos descritos y mayormente utilizados en la industria es la alantoína, este es un compuesto heterocíclico rico en nitrógeno, se presenta de manera ubicua en las plantas como un metabolito intermediario del catabolismo de purina. La alantoína y su metabolito acíclico, el alantoato, se denominan colectivamente ureides y, en las leguminosas tropicales, sirven como vehículo para el almacenamiento y el transporte de xilema de nitrógeno fijado simbióticamente (16). Este compuesto se encuentra en una gamma de plantas y cortezas de árboles, sin embargo, se ha descrito que se encuentra en mayores concentraciones en la raíz de *Symphytum officinale* (17), siendo esta una planta nativa de

Europa y ampliamente utilizada para detener la inflamación y fomentar la cicatrización desde la época greco-romana. Esta molécula ha sido ampliamente citada en la literatura como portadora de numerosas actividades farmacológicas, entre ellas: cicatrización de heridas (17), antiirritante, hidratante y removedor de tejido necrótico (18), su mecanismo de acción no es muy claro, sin embargo, estudios sugieren que la alantoína modula la respuesta inflamatoria, posiblemente al inhibir la quimiotaxis de las células inflamatorias en el sitio de la herida, evitando así la liberación de especies reactivas responsables del estrés oxidativo y el daño tisular, además de gran efectividad en la proliferación fibroblástica y la síntesis de matriz extracelular durante la cicatrización de la herida.

3.2 Acido cafeico

El ácido cafeico es otro compuesto descrito hace mucho tiempo como un componente antiinflamatorio, que forma parte en la producción de miel, jalea real y propóleo por parte de las abejas. El propóleo contiene fenetil éster de ácido cafeico y artepilina C, compuestos que son específicos para este subproducto de las abejas, entre sus atributos se pueden resaltar los efectos antivirales, inmunomoduladores, antiinflamatorios y anticancerígenos (19). El ácido cafeico se cataloga como un antioxidante natural y afectan la eliminación de radicales libres, la quelación de iones metálicos. Además, tienen acciones inhibitorias sobre enzimas específicas que inducen la formación de radicales libres y de hidroperóxido de lípidos, también promueve el aumento de la expresión de HO-1 y, en consecuencia, la actividad de la hemo-oxigenasa parece estar estrictamente asociada con un cambio rápido en el estado redox intracelular, disminuyendo el estrés oxidativo (20) y favoreciendo en este caso la cicatrización de heridas.

3.3 Dexpantenol

El dexpantenol es un derivado alcohólico del ácido pantoténico, un componente de las vitaminas del complejo B y un componente esencial de un epitelio que funciona normalmente. El dexpantenol se escinde enzimáticamente para formar ácido pantoténico,

que es un componente esencial de la coenzima A , que actúa como un cofactor en muchas reacciones enzimáticas que son importantes para el metabolismo de las proteínas en el principalmente del epitelio. Debido a su buena penetración y altas concentraciones locales, el dexpanantenol se usa en muchos productos tópicos, como pomadas y lociones para el tratamiento de afecciones dermatológicas para aliviar la picazón o promover la curación. Efectos dermatológicos del uso tópico del dexpanantenol incluyen, el aumento de la proliferación de fibroblastos y la reepitelización acelerada en la cicatrización de heridas. Además, actúa como un protector tópico, crema hidratante y ha demostrado propiedades antiinflamatorias (21). El dexpanantenol también está disponible como una mezcla racémica que contiene la forma dextrorrotatoria (dexpanantenol) y la forma levorrotatoria (levopantenol). Mientras que el ácido pantoténico es la forma activa de ambas mezclas , solo la forma dextrorrotatoria es capaz de transformarse en esta forma biológicamente activa.

El ácido pantoténico es un precursor de la coenzima A , que sirve como cofactor para una variedad de reacciones catalizadas por enzimas que involucran la transferencia de grupos acetilo. El último paso en la síntesis de la acetilcolina consiste en la transferencia de acetilcolina de la colina del grupo acetilo de la acetilcoenzima A hacia colina . La acetilcolina es el transmisor neuro-humoral en el sistema parasimpático y, como tal, mantiene las funciones normales del intestino. La disminución del contenido de acetilcolina daría lugar a una disminución de la peristalsis y, en casos extremos, al íleo adinámico. Por lo tanto, no solo desempeña una labor en la cicatrización epitelial, sino que también a nivel intestinal.

En cuanto a su naturaleza química el dexpanantenol es soluble en agua y alcohol, aunque es insoluble en grasas y sustancias a base de aceite. Con el vehículo adecuado, el dexpanantenol penetra fácilmente en la piel. La tasa de penetración y absorción se reduce cuando dexpanantenol se administra como una fórmula de aceite o agua.

3.4 Resveratrol

En cuanto al resveratrol corresponde a un nutracéutico catalogado como una fitoalexina que se encuentra en muchas plantas y alimentos derivados, incluidas las uvas, los cacahuets, las bayas y también los vinos. El resveratrol se aisló por primera vez *en Veratrum grandiflorum*, o planta de hellebore blanco, lo que le confería a esta planta la capacidad intrínseca para proporcionar resistencia a las infecciones microbianas y fúngicas por lo que fue de interés a la comunidad científica su estudio.

El resveratrol es un activador de SIRT1, una de las formas de mamíferos de la familia de proteínas sirtuin (22). La proteína SIRT1 desacetila histonas y proteínas no histónicas, incluidos los factores de transcripción. La vía regulada por SIRT1 afecta el metabolismo, la resistencia al estrés, la supervivencia celular, la senescencia celular, la función inmune a la inflamación, las funciones endoteliales y los ritmos circadianos. Se ha demostrado que el resveratrol activa SIRT1 y, por lo tanto, se predice que beneficiará a las enfermedades afectadas por el control metabólico anormal, la inflamación y los defectos del ciclo celular.

Su uso es especialmente interesante para los pacientes con cáncer debido a los altos riesgos asociados con los tratamientos tradicionales, incluida la cirugía y la quimioterapia. Las complejidades en las redes de señalización de células cancerosas obstruyen el éxito terapéutico de inhibidores específicos que se dirigen a una sola red. Sin embargo, debido a que se ha demostrado que el resveratrol *in vitro* e *in vivo* tiene efectos quimiopreventivos y quimioterapéuticos en los cánceres al atacar múltiples vías (23). El resveratrol afecta las tres etapas de la carcinogénesis: iniciación, promoción y progresión. Además, se ha demostrado que el resveratrol induce directamente la vía apoptótica a través de varios mecanismos.

El resveratrol afecta la vía de señalización del factor nuclear NF-KB que regula la inflamación, la respuesta inmune a la infección y la respuesta celular a los estímulos. Además, se ha demostrado que inhibe significativamente las vías IGF-1R; Akt; Wnt y activa

p53, y por lo tanto puede influir en el desarrollo celular y la tumorigénesis. Además, el resveratrol puede inhibir la ruta del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) para regular la diferenciación celular, el crecimiento, la proliferación y varias otras actividades

4. Apósitos en la cicatrización de heridas

Existen actualmente muchos métodos para combatir una herida expuesta, sin embargo los apósitos siguen siendo los predilectos para fomentar la reparación del tejido, esto dado principalmente a sus características de promover un ambiente húmedo alrededor de la herida, absorber los exudados de su superficie y mantener con funcionalidad biológica el tejido sin dañarlo (24).

Las propiedades intrínsecas de las membranas como apósitos para heridas, sirven como un medio para respaldar la curación de la piel y proteger la zona defectuosa de la piel de la infección, estas propiedades se han investigado y aplicado progresivamente en los sectores clínicos desde principios de los años ochenta (2)

Hasta mediados de 1962, las investigaciones sobre la curación de heridas fueron algo descuidadas y poco desarrolladas. Anteriormente, se suponía que la cicatrización de la herida es más rápida y eficiente si se mantiene seca y descubierta. Esta especulación se asumió antes de establecer los requisitos ideales para los materiales de curación de heridas (25). Desde esta fecha, los estudios e investigaciones sobre el desarrollo de los apósitos para heridas aumentaron aún más; sugiriendo que los apósitos para heridas ideales deben mantener un ambiente húmedo con alta biocompatibilidad y prohibir la infección bacteriana para acelerar la regeneración del tejido. En los años ochenta, los apósitos para heridas se clasificaron según su grado de humectabilidad en apósitos secos y húmedos. Hasta mediados de la década de 1970, la gasa tejida de algodón o las mezclas no tejidas de rayón con otras fibras como el poliéster o el algodón, se conocían como los apósitos más frecuentes en el mercado (26).

Por una parte, los apósitos tradicionales o secos mantienen generalmente el área de la herida seca, reducen el tamaño de la herida a simple vista, permiten absorber todos los exudados y fluidos, causando una fuga y proporcionando más contaminación. Este comportamiento se clasificó como hostil ya que propicia la proliferación bacteriana y disminuye de viabilidad de las células de mamíferos involucradas en la reparación de tejidos, además de la formación de una costra que cubrirá toda la zona de la herida lo que disminuye la tasa de epitelización afectando la herida.

Por lo tanto, los apósitos de gasa y algodón (apósitos secos) que antes se utilizaban con frecuencia como apósitos para heridas ya no son tan útiles debido a: su incapacidad para proteger la herida de la invasión microbiana; los fuertes dolores en los pacientes durante el tiempo de extracción, debido a su gran adherencia en la superficie de la herida; los exudados acumulados en la superficie de la herida debido a su bajo índice de absorción, lo que facilita el ataque microbiano; su baja permeabilidad a los gases, siendo esto no adecuado específicamente para heridas crónicas, y por último la baja cantidad de humedad lo que mantiene la herida seca, lo que desencadena una baja tasa de epitelización y proliferación celular(27).

Se demostró que la cicatrización de heridas con apósitos húmedos es más rápida que con los apósitos secos. Este hecho se atribuye a la curación y la renovación de la piel sin formación de escaras o inflamación solo se puede realizar en un ambiente húmedo(25). Por lo tanto, los apósitos humedecidos se consideraron los apósitos adecuados para la reparación de la piel y curación de heridas. Además, se consideraron que los que poseían alto contenido de agua y mayor permeabilidad inherente tenían una mejor interacción con el medio

Por lo tanto, la permeabilidad al agua de los apósitos usados debe controlar la deshidratación extensa, así como la acumulación de exudados y costras sin afectar los procesos de epitelización o proliferación celular. Esto demuestra que, el apósito usado debe ser una película delgada o una membrana que posea una alta permeabilidad al vapor de agua, alta capacidad de retención de agua, bajo o nulo índice crecimiento bacteriano para que

condicione adecuadamente la reparación del tejido. Curiosamente, los hidrogeles pueden controlar la formación de costra permitiendo la proliferación celular y el proceso de epitelización. Para enfatizar que los hidrogeles son finalmente la mejor opción para los apósitos para heridas, se encontró que las pérdidas de agua y líquidos de la piel herida son casi 20 veces mayores que las de la piel normal (28), lo que se evitaría con la aplicación de un hidrogel como apósito, ya que mantendría un equilibrio osmótico con el medio evitando la deshidratación.

4.2 Tipos de apósitos

Los materiales de apósitos que se utilizan para heridas o quemaduras se conocen vulgarmente como piel artificial y deben poseer las propiedades habituales de la piel para acelerar la recuperación dentro de las áreas de la piel heridas o destruidas. Se utilizan para las heridas, las quemaduras y se pueden clasificar en apósitos: tradicionales, biológicos y artificiales.

Los apósitos tradicionales en su mayoría están compuestos de algodón con tejido de gasa o simplemente gasa, que se desarrollaron desde mediados de la década de 1970 hasta la actualidad. Estos materiales se caracterizaron por su bajo costo, fácil uso y fabricación. El compuesto de gasa y gasa-algodón posee una gran capacidad de absorción de los exudados de las heridas, lo que provoca una deshidratación rápida y promueve el crecimiento y la contaminación bacteriana. Además, al final del tratamiento, la remoción de la cubierta es un tanto difícil que causa sangrado o daño a la flora epitelial renovada afectando a la recuperación del tejido (26).

Los apósitos biológicos, llamados también autoinjertos, se consideran los materiales más adecuados para la curación completa de heridas y quemaduras profundas y crónicas. Este método depende de la donación de piel normal y fresca de cuerpos extraños, como por ejemplo la de humanos, animales o cadáveres. Tales materiales de este método son de estructura de tipo colágeno que incluye elastina y lípidos (29). El inconveniente básico de

estos materiales es a veces inadecuado para donar una parte de la piel para heridas profundas o grandes, debido a que las exigencias en cantidad son mayores y no siempre se dispone de tanto recurso para efectuar los injertos.

Los apósitos artificiales se fabrican a partir de materiales sintéticos, como materiales no biológicos y polímeros que no se encuentran en los componentes de la piel (30). La composición del apósito sintético debe ser inofensiva, mecánicamente estable, biodegradable y presentar un entorno adecuado para la reparación de tejidos. Recientemente, hay una gran demanda de materiales de membrana poliméricos que se apliquen en apósitos destinados a heridas. Los apósitos poliméricos para heridas se han utilizado recientemente en diferentes formas, tales como películas, espumas, hidrogeles, alginatos e hidrocoloides (31).

5. Hidrogeles como soporte

Los hidrogeles poliméricos han tenido el interés y la atención de los científicos durante muchos años. Después de la revolución, el aspecto del hidrogel facilitó la producción de apósitos para heridas. A principios de la década de 1960, los apósitos poliméricos han sido considerados solo como materiales pasivos que tienen el papel mínimo en el proceso de curación (25). En 1978, se utilizaron varios materiales poliméricos basados en quitina como las primeras heridas que cubren, debido a sus atractivas actividades biológicas, lo que demuestra que los polímeros son excelentes candidatos para el desarrollo de materiales de apósito (31).

Los biomateriales a base de hidrogel, a menudo clasificados como sintéticos o naturales, se han buscado durante mucho tiempo para el cultivo de células, la ingeniería de tejidos, la medicina regenerativa y la administración de fármacos, es por esto que se han utilizado ampliamente como andamiajes ideales para la ingeniería de tejidos por su alto contenido de agua y similitud estructural con la matriz extracelular nativa (32). Como anteriormente se mencionó los hidrogeles se pueden obtener a partir de polímeros naturales, por ejemplo, colágeno, quitosán, fibrina y otros, y sintéticos como, óxido de polietileno, ácido poliacrílico,

polivinil pirrolidona y alcohol polivinílico (PVA), a través de procesos físicos y químicos. El tipo de proceso elegido para la síntesis de estos materiales determina sus propiedades.

Los hidrogeles son redes macromoleculares muy hidrófilas, que se producen por reticulación química o física de polímeros solubles. Debido a las propiedades peculiares de los hidrogeles, como su alta sensibilidad a los ambientes fisiológicos, la naturaleza hidrófila, el contenido de agua similar a los tejidos blandos, resistencia mecánica y la flexibilidad adecuada, los convierten en excelentes candidatos para aplicaciones biomédicas (31). Los hidrogeles además tienen la capacidad de captar agua lo que les permite inflarse o deshincharse dependiendo del requerimiento y aplicación que se busque, además presentan una gran respuesta a estímulos del medio ambiente como lo son el pH, la temperatura y la fuerza iónica, por lo que favorece la interacción con la respuesta fisiológica humana para obtener un mayor desempeño en su aplicación. También impiden la unión de proteínas y células de la herida a la estructura del apósito, debido a sus características químicas que lo convierten en un material inerte que no interaccionará con la herida como tal, sino que será un soporte y un facilitador en el transporte y liberación de compuestos.

Adicionalmente la mayoría de los hidrogeles son considerados biomateriales inocuos, lo que significa que no interaccionan directamente con el tejido del usuario si no que conformaran una matriz que contribuirá a mantener un ambiente propicio para la cicatrización, evitando condiciones indeseadas como reacciones tóxicas, alérgicas y de poca biocompatibilidad (31).

Es por esto que los hidrogeles como membranas de apósito cumplen todos los requisitos para la cicatrización de heridas y es el candidato adecuado para pacientes con quemaduras en el menor tiempo posible debido a las siguientes justificaciones: los hidrogeles controlan la pérdida de líquidos del cuerpo, mantienen la humectabilidad y la humedad en la zona de la herida, poseen una estructura y compatibilidad con el ambiente del tipo tejido favoreciendo las condiciones para que el proceso de cicatrización se efectúe de manera correcta además de la proliferación de fibroblastos y la migración de queratinocitos(33).

El tamaño apretado de la malla de la estructura de hidrogeles protege la herida de la infección y evita que el microorganismo y las bacterias alcancen el área de la herida. Sin embargo, la estructura de hidrogeles permite el transporte de moléculas bioactivas como, antibióticos, y productos farmacéuticos para el centro de la herida. Dichas moléculas pueden quedar atrapadas en redes de hidrogel durante el proceso de gelificación, mientras que estas moléculas pueden intercambiarse con la absorción de los exudados de la herida durante el proceso de liberación sostenible después de poner en contacto los hidrogeles con la superficie de la herida. El importante contenido de agua de los hidrogeles en forma de tejido proporciona la flexibilidad y elasticidad necesarias para adaptar las heridas ubicadas en diferentes sitios del cuerpo (31).

5.1 Hidrogeles de alcohol polivinílico (PVA)

Los hidrogeles de alcohol polivinílico (PVA) se han estudiado para aplicaciones biomédicas que incluyen lentes de contacto, implantes de cartílago, matrices de administración de fármacos, recubrimientos temporales para la piel o vendajes para quemaduras y órganos artificiales, debido a su no toxicidad inherente, no carcinogénica, buena biocompatibilidad y propiedades físicas deseables, como la naturaleza gomosa o elástica y un alto grado de hinchamiento en soluciones acuosas (34). En la actualidad, el PVA es uno de los más frecuentes y el polímero sintético más antiguo que se ha empleado como, apósito, sistemas de administración de fármacos y como sostén de órganos artificiales (35).

Cuando se aplican como apósitos para heridas, los hidrogeles de PVA podrían mantener el ambiente húmedo y absorber los exudados de la superficie de la herida. Además, como propiedad no adhesiva de los apósitos de hidrogel de PVA, los apósitos podrían separarse fácilmente de la herida en el proceso de cambiar los apósitos nuevos sin nuevas lesiones. Sin embargo, la falta de actividades biológicas dificultaría la aplicación de hidrogeles de PVA en la curación de heridas(36), pero esto se resolvería al integrar moléculas con actividad cicatrizante al hidrogel con el fin cumplir la función de regenerar heridas.

Sin embargo, el hidrogel de PVA tiene una elasticidad inadecuada, una membrana rígida y unas características hidrófilas muy incompletas que restringen su uso solo como membranas poliméricas de apósito para heridas, es por esto por lo que el agente reticulante jugara un rol fundamental ya que modificara las propiedades físicas y químicas del hidrogel. Entre los diversos hidrogeles descritos en la literatura se encuentran los hidrogeles preparados utilizando PVA mezclado con algunos polisacáridos naturales y algunas otras cadenas carbonadas sintéticas. Los polímeros naturales y sintéticos se han utilizado individualmente o combinados entre sí para preparar los apósitos.

6. Liberación controlada de medicamentos

En la actualidad existe una amplia gama de medicamentos que cumplen diversas funciones con el fin de mejorar las condiciones patológicas que puedan padecer las personas, estos medicamentos generalmente se encuentra en formato oral, intravenoso o de uso tópico, sin embargo, estos tipos de administración podrían conllevar a desarrollar algunos problemas dejando de contribuir al bienestar de las personas o impidiendo que se aprovechen al máximo sus efectos.

Los dispositivos tradicionales de administración de fármacos como son las capsulas, tabletas, parches, inyectables, gotas supositorios y spray, que normalmente tienen un control muy deficiente sobre las concentraciones de estas sustancias en el plasma lo que genera que los tratamientos sean poco eficaces (37). Esto se da principalmente por que la concentración de los compuestos activos no se mantiene sostenida en el tiempo y de manera prolongada, existiendo peaks de concentración altas luego de ser administrados, para que luego de unas horas la concentración disminuya bajo el umbral necesario de acción, lo que condicionara al paciente a tener que administrar el fármaco de manera frecuente en un periodo de tiempo establecido, conllevando en muchas ocasiones a un daño y toxicidad deriva dada al sobreconsumo de medicamentos. Es por esto que integrar un sistema que controle

adecuadamente la liberación de los medicamentos hará que no se requieran dosis repetidas y permitirá que se pueda mantener más cerrado en los niveles efectivos del tratamiento

La utilización de hidrogeles en base a diversos polímeros, como soporte de fármacos para controlar su liberación, es un enfoque de investigación en creciente aumento, debido a la biocompatibilidad y atractiva capacidad de hinchamiento en medio acuoso lo cual facilita la liberación de medicamentos de manera controlada. La capacidad de absorción de agua, determinada por el estado de equilibrio entre las redes del hidrogel y el medio externo, este se debe al balance que ocurre entre las fuerzas osmóticas, contenidas al agua que entra en la red, y las fuerzas que ejercen las cadenas poliméricas en oposición a esa expansión.

El proceso de obtención del hidrogel determina la capacidad de hinchamiento que este tendrá, dado que los espacios que se establezcan entre las redes poliméricas flexibles que se formen en dicho proceso determinará la cantidad de agua que el hidrogel pueda albergar. Existen muchas moléculas reticulantes para formar el poro o espacio entre las cadenas de hidrogel, este espacio es único para cada molécula y le conferirá de propiedades diferentes dada principalmente por el tamaño del poro formado, dándole mayor o menor afinidad a moléculas que se quieran integrar al polímero dependiendo del tamaño y naturaleza química del agente. La flexibilidad a su vez se ha mostrado que es función de: el peso molecular, el grado de pureza del polímero y de su concentración en solución acuosa, además de factores propios del método físico o químico de síntesis a la hora de conformar las cadenas y reticular el hidrogel (32), en la figura numero 2 se aprecia el proceso de esterificación y reticulación del hidrogel, en donde obtendrá la conformación de un tamaño específico para el poro.

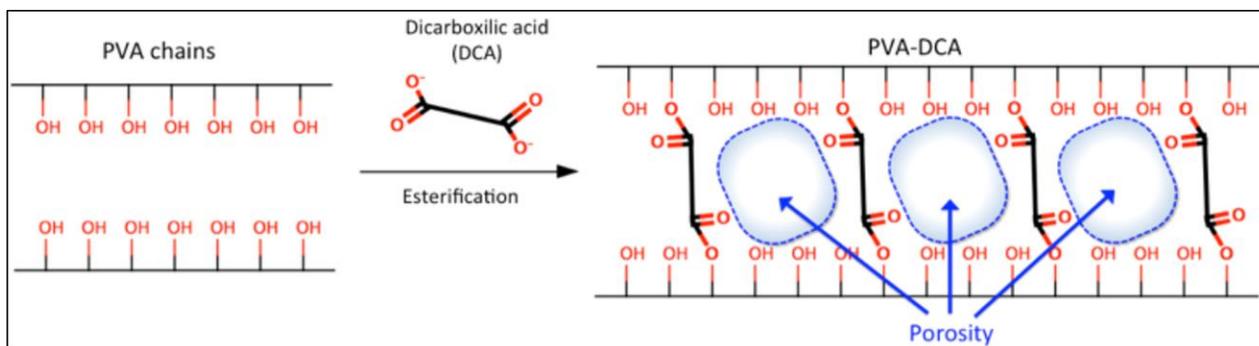


Figura 2: Esterificación y formación de enlaces covalentes entre PVA y moléculas de ácido dicarboxílico

La estructura altamente porosa de los hidrogeles se puede ajustar fácilmente controlando la densidad de los agentes de reticulación (grado de reticulación). Por lo tanto, las propiedades estructurales del hidrogel, y su afinidad por ciertas moléculas bioactivas dependerá directamente de la selección del constituyente polímeros y el tipo de agente de reticulación que formará el polímero tal como se puede apreciar en la imagen(38). La preparación de hidrogeles de PVA puede ser realizados por métodos químicos, que implican la formación de interacciones y enlaces entre las cadenas de PVA y los grupos funcionales de los agentes de reticulación (39).

El uso de ácidos dicarboxílicos como agentes de reticulación genera un PVA flexible y transparente. Hidrogeles, que son capaces de interactuar con compuestos solubles en agua(40). Estos ácidos tienen dos grupos funcionales carboxílicos en ambos extremos de su estructura, que a través de una esterificación proceso de esterificación con las cadenas de PVA generaran enlaces covalentes con los grupos hidroxilo que se encuentran en las cadenas de PVA, generando la reticulación del hidrogel y también la porosidad estructural (39).

Se han dilucidado varios mecanismos para describir la liberación de fármacos a partir de sistemas de hidrogel de polímeros, que incluyen difusión, hinchamiento y liberación controlada químicamente, por erosión a través de la degradación enzimática y respuesta al pH (41). Esta propiedad ofrecida por los hidrogeles para aplicaciones de administración de medicamentos implica la posibilidad de liberación sostenida, lo que resulta en mantener una

concentración local apropiada de compuestos bioactivos durante un largo período y que resulta beneficiosa para el usuario.

El proceso de integración de los medicamentos dentro de esta red polimérica es un proceso fundamental, que debe ser respaldado por la naturaleza química de ambos, ya que deben funcionar en sinergia tanto para mantener el compuesto dentro del hidrogel y también debe existir una facilidad para que este pueda liberar bajo las condiciones adecuadas. El proceso para la obtención de este apósito tiene como finalidad obtener un sistema fármaco-hidrogel por medio de la unión física de ambos, es decir, el fármaco en disolución es atrapado en la matriz polimérica, por su propiedad hidrofílica, la cual actúa como soporte de almacenamiento y dosificación para su posterior liberación, sin embargo no es el único método de integración de fármacos ya que existe otro sistema en el cual el fármaco-hidrogel puede ser obtenido cuando el compuesto farmacológico activo es unido químicamente a la matriz polimérica, sin la necesidad de integrarlo a través de la capacidad hidrofílica de este, si no que directamente de la síntesis de hidrogel, ampliando así el espectro del uso de compuestos con actividad cicatrizante, ya que no solo se limitaría a compuestos hidrófilos sino que también a otro tipo de compuestos que no sean solubles en agua.

Sin importar el método de integración del compuesto activo el hidrogel debe responder a ciertas necesidades, una de ellas es la de liberación de los compuestos de manera continua y a los niveles de concentración necesarios. Para ello, la concentración debe alcanzar y mantener un nivel óptimo de eficacia durante el tiempo que se requiera su acción terapéutica. El nivel óptimo será una cantidad de fármaco en el organismo que está por debajo del nivel tóxico y por encima del mínimo de eficacia. Un método convencional de liberación posee un control pobre sobre estos niveles. Por lo que es más eficaz obtener un control óptimo de la concentración en una sola dosis de mayor volumen, eliminando la necesidad de tomar dosis diarias.

IV. HIPÓTESIS

Si la alantoína, ácido cafeico, resveratrol y dexpanthenol son moléculas activas en el proceso de cicatrización, entonces la liberación sostenida de estos compuestos durante un período prolongado de tiempo a través de una formulación basada en hidrogel permitiría mejorar la cicatrización dérmica.

OBJETIVOS

1. Objetivo general:

-Desarrollar una formulación de hidrogel basadas en PVA reticulado con una molécula dicarboxílica (ácido aspártico) para mejorar el proceso de cicatrización a través de una liberación sostenida de alantoína, ácido cafeico, resveratrol y dexpanthenol en un modelo de piel ratón

2. Objetivos específicos:

- Sintetizar y caracterizar un hidrogel basado en PVA con afinidad selectiva por alantoína, ácido cafeico, resveratrol y dexpanthenol.
- Realizar estudios de liberación sostenida *in vitro* de los compuestos activos por HPLC.
- Evaluar la actividad de cicatrización de heridas (*in vivo*) de los hidrogeles.

V. MATERIALES Y METODOS

1. Síntesis y caracterización de los hidrogeles

El hidrogel se sintetizó por esterificación del PVA con Ácido Aspártico (AA) según lo descrito por Valdes et al(42). Una solución acuosa de PVA se mezcló con AA en presencia de HCl, de forma que la concentración final del AA fue del 20%, quedando la concentración de PVA en la razón 10:2 respecto de éste. La reacción se llevó a cabo en un balón de vidrio durante 3 horas en agitación constante a 90 – 100°C en reflujo. Al cabo de dicho tiempo, el contenido fue vertido en una placa Petri y puesto en la estufa a 70°C durante 6 horas para permitir su deshidratación y su mayor entrecruzamiento. Una vez que el hidrogel se formó se lavó por 3 veces con NaHCO₃, para remover el exceso de ácido como de los entrecruzantes que no se esterificaron.

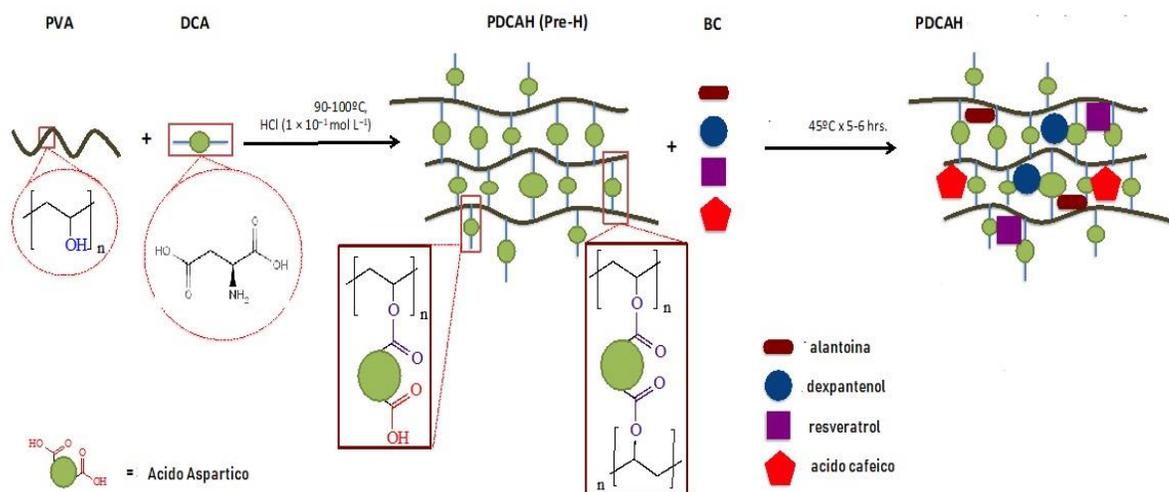


Figura 3: Esquema representativo de la síntesis del hidrogel en base a su reticulante AA y sus componentes con actividad cicatrizantes.

Eficacia de atrapamiento de medicamentos: los hidrogeles se cargaron con concentraciones determinadas del bioactivo compuesto: alantoina, resveratrol, dexpanenol y ácido cafeico

(estándares). El hidrogel sintetizado y simultáneamente fueron incluidos de manera directa los componentes cicatrizantes. La eficiencia de la liberación de los compuestos se calculó por la diferencia en la cantidad del fármaco en el sobrenadante antes y después de agregar hidrogel.

2. Estudios de hinchazón y degradación

Los hidrogeles secos (0,4 – 0,5 mm de grosor, 30 mg aprox. de peso) fueron depositados en frascos con solución tampón acetato (pH 3) y tampón fosfato salino (pH 7,4) a temperatura ambiente. La medición del índice de hinchazón se hizo sacando una alicota de su respectiva solución, secándolo con papel filtro para remover el exceso de líquido y pesándolo en una balanza analítica, a intervalos de tiempo determinados. Tras dicho pesaje, el hidrogel se devuelve al frasco con su respectiva solución, para luego repetir el proceso.

La degradación del hidrogel se estudió de forma enzimática. Para ello, un hidrogel previamente seco (bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente) se depositó en 3 ml de una solución de tripsina 0,25%, mantenida a 37°C en baño termostático. La medición se hizo sacando al hidrogel de dicha solución, y pesándolo a intervalos de tiempo de la misma forma que para la hinchazón. Aquí, también se midió el índice de hinchazón, sin embargo, una disminución sostenida en el peso del hidrogel se interpretó como degradación

3. Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras del hidrogel fueron seccionadas y puestas en soportes de cobre. Se aplicó una tinción de ácido fosfotúngstico 0,7% p/v y se procedió al secado de las muestras. Los hidrogeles se analizaron en un microscopio electrónico LVEM5 (DeLong Instruments, Brno, República Checa), a tensión nominal de 5 kV y en modo de microscopía electrónica de barrido (SEM).

4. Medición de la liberación de compuestos con actividad cicatrizantes por HPLC

El hidrogel fue puesto en soluciones de tampón PBS, de las cuales se extrajo alícuotas cada una hora durante las primeras 2 horas, luego cada 2 horas durante las siguientes 10 horas, y después una alícuota a las 24, para continuar con una alícuota cada 12 horas, según se muestra en la Figura 7.

El contenido de las alícuotas se midió por cromatografía líquida de alta presión (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) con ayuda de un equipo Perkin Elmer 200 Series (Waltham, MA, USA), con bomba cuaternaria y autosampler, acoplado a un detector de UV-luz visible, utilizándose unos estándares para la detección de alantoína, resveratrol, ácido cafeico y dexpanthenol. Se utilizó una columna Kromasil 100-5-C18 de 4,6 x 250 mm y PBS pH 7.4 como fase móvil.

5. Pruebas de cicatrización de heridas en modelos dérmicos de ratas.

Animales y condiciones de mantenimiento: Los experimentos se realizaron en un total de 3 adultos Sprague dawley, ratas de 400-500 gramos obtenidas de la instalación de animales de la Universidad de Talca, de acuerdo con la Protocolo propuesto al Comité Institucional de Ética, Cuidado y Uso de Animales del Laboratorio (CIECUAL) de la Universidad de Talca. Los animales se mantendrán en condiciones ambientales estándar ($22 \pm 2^\circ$ C, humedad relativa 70-80%, ciclo de luz de 12 horas). Los animales fueron pesados al principio y al final del periodo experimental. Además, se registró la ingesta de agua y alimentos. Las ratas fueron alimentadas con dieta estándar fabricada por Champion (6,4% de humedad, 3,6% de lípidos, 6,7% de proteínas, 7,3 cenizas, 3,6 fibras, 72.4% de carbohidratos). Los animales tuvieron libre acceso a agua y comida; la cama se cambiará tres veces a la semana. Cada jaula tenía un registro de los cambios en el comportamiento o la ingesta que se llenaron diariamente por el Personal a cargo (manual de uso y cuidado de animales experimentales, Conicyt).

5.1 Procedimiento experimental

Los animales fueron entregados por la instalación de animales de la Universidad de Talca. Al inicio de la cirugía todos los animales fueron sedados con isofluorano y anestesiados con una mezcla de ketamina (ketostop, DrangPharmainvetec S.A) / xylazine (Xylaret, Agroland) en una proporción de 3: 1 (2,2 µL / g en peso). Una vez que los animales anestesiados estaban en el plano quirúrgico, se realizó la tricotomía del área interescapular, esta se realizó con una cortadora de cabello (Oster Gold) y el área se lavó con jabón de clorhexidina al 0.25%. Entonces se eliminaron los dos segmentos de la piel en el área de la espalda entre las escápulas; se realizará cirugía con un escalpelo o punzón especial, el diámetro de la biopsia será de 0,8 cm. Una vez que la piel se retiró, el segmento fue remplazado por un disco del mismo tamaño compuesto por el hidrogel cargado o no por los compuestos bioactivos. El disco de hidrogel se fijó a través de 4 puntos, ubicados en los 4 puntos cardinales, para las suturas, se utilizaron suturas no reabsorbibles para evitar la inflamación.

La herida fue lavada con solución salina fisiológica, observada y fotografiada a diario. Junto con este registro fotográfico, se mantuvo un registro de la ingesta de alimentos y bebidas, así como el comportamiento y estado general de los animales a diario. La duración total de cada prueba es de 10 días; En el día 7 los discos se retiraron para analizar su adherencia y los discos no se volvieron a aplicar. Desde los días 7-10, se analizó el proceso de curación natural de las heridas. Los resultados se expresaron en área y representarán el cierre de la herida de tal manera que se compare las diferencias macroscópicas en el cierre de la herida entre los controles y los tratamientos. El análisis histológico está orientado a la observación microscópica del cierre de la herida y está destinado a comparar el proceso de cicatrización de heridas en las diferentes fases.

5.2 Modelo experimental y sus respectivas combinaciones de hidrogeles

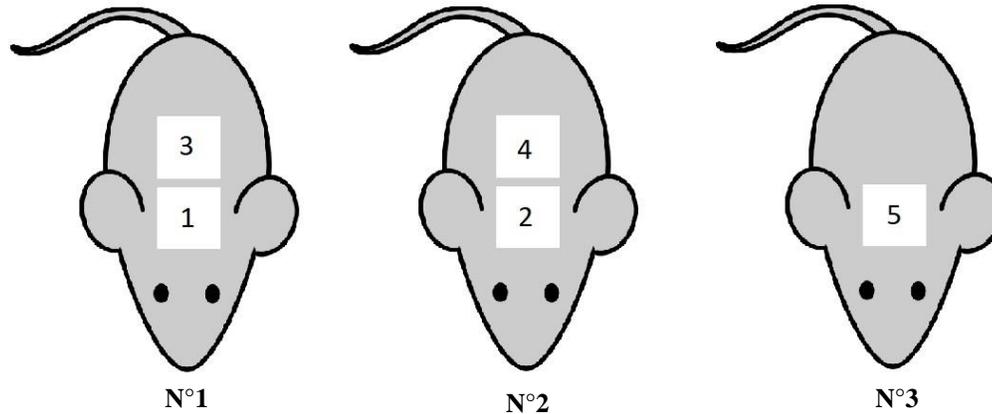


Figura 4: Esquema del modelo *in vivo* experimental del estudio, en donde se distribuye cada hidrogel con las mezclas de compuestos a cada rata

Tabla 1. Tabla de hidrogeles: Distribución de compuestos por cada hidrogel

1-Control negativo: Acido Aspártico (AA)	2- Sin hidrogel, solo compuestos en solución
3-AA, Alant 5%, AC 2%, dexp 2% y resv 2%	4- Control comercial (madecazol)
5- Control de herida sin tratamiento	

Alant=alantoína; AC= ácido cafeico; dexp=dexpantenol; resv=resveratrol

Tabla 2. Tabla de concentraciones: Presentación de los ensayos con sus respectivos componentes y concentraciones

Hidrogel	Reticulante	%Ret/total*	Concentración de compuestos cicatrizantes (%) *			
			Alantoina	Acido cafeico	Resveratrol	Dexpantenol
1	AA	20	-	-	-	-
2	S/H	-	5	2	2	2
3	AA	20	5	2	2	2

(*) %m/m; Acido Aspartico (AA); Sin **hidrogel** (S/H)

VI. RESULTADOS

1. Estudio de hinchazón y degradación del hidrogel

El experimento se llevó a cabo para examinar el grado de hinchamiento del hidrogel a distintos pH (3 y 7.4) a temperatura ambiente, además de evaluar si en algún punto de la hinchazón se producía la degradación del hidrogel.

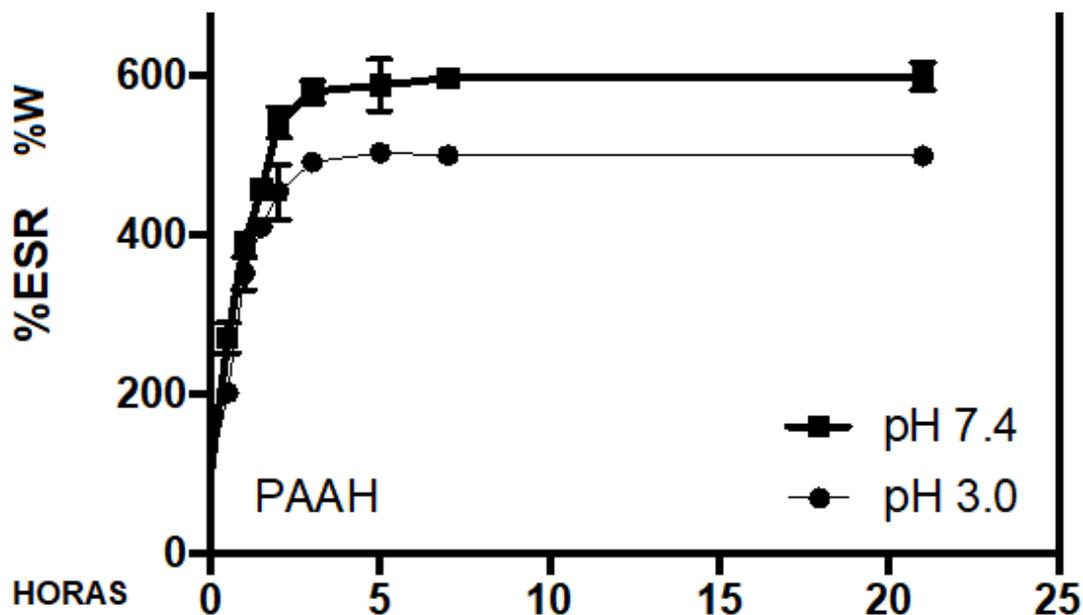


Figura 5: Índice de hinchazón del hidrogel a distintos pH en relación con el tiempo

La Figura 5 muestra el porcentaje de hinchazón de dicho hidrogel, el que se incrementa a lo largo del tiempo. La cinética de medición indica que la hinchazón primero es rápida y después se torna más lenta, alcanzando un estado de equilibrio aproximadamente a las 4 horas de iniciado el experimento.

El proceso de hinchazón, como se mencionó anteriormente, es dependiente de múltiples factores, como la naturaleza del polímero, el tamaño del poro, la concentración del agente enlazante, pH y temperatura. En este sentido, en el pH 7,4 se logró la mayor hinchazón del hidrogel, que a las 8 horas alcanzó 600% de su peso inicial. Este índice de hinchazón fue menor para el hidrogel a pH 3 450%

2. Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes de microscopía electrónica se utilizaron para analizar con mayor exactitud la morfología hidrogel y el tamaño de los poros, que serían las puertas de entrada y salida de las biomoléculas. En la Figura 6 se observan las fotografías de microscopía obtenidas de estudios anteriores del mismo hidrogel correspondientes a una tesis de nombre “Síntesis y caracterización de una formulación basada en hidrogel de PVA-Acido Aspartico para la liberación controlada de adenosina” del año 2018. En esta se observa el tamaño del poro dependiendo de la concentración del entrecruzante, en las imágenes se puede observar un tamaño del poro relativamente uniforme aproximadamente de $10\mu\text{m}$. Se observa también la separación entre las distintas redes, cuya distensión es fundamental para permitir la difusión del fármaco y su posterior liberación

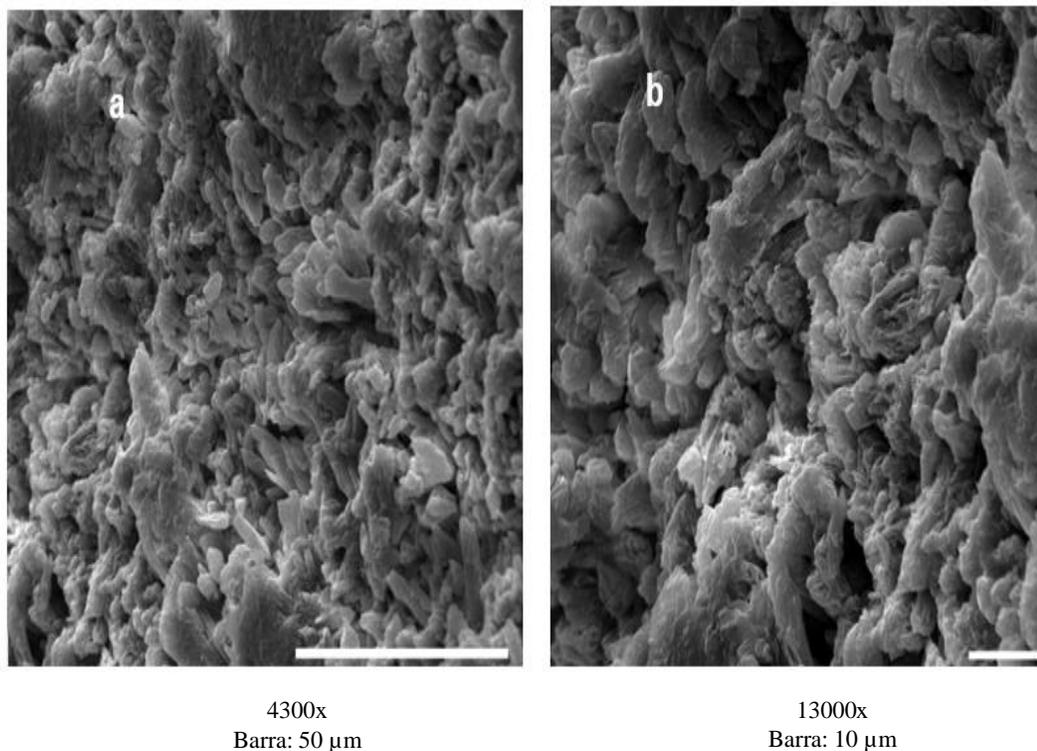


Figura 6: Imágenes de microscopía electrónica de barrido, mostrando el entramado polimérico liofilizado (a) imagen con aumento 4300x. Barra = $50\mu\text{m}$. (b) imagen de la misma región con aumento 13000x. Barra = $10\mu\text{m}$

3. Liberación de compuestos con actividad cicatrizante

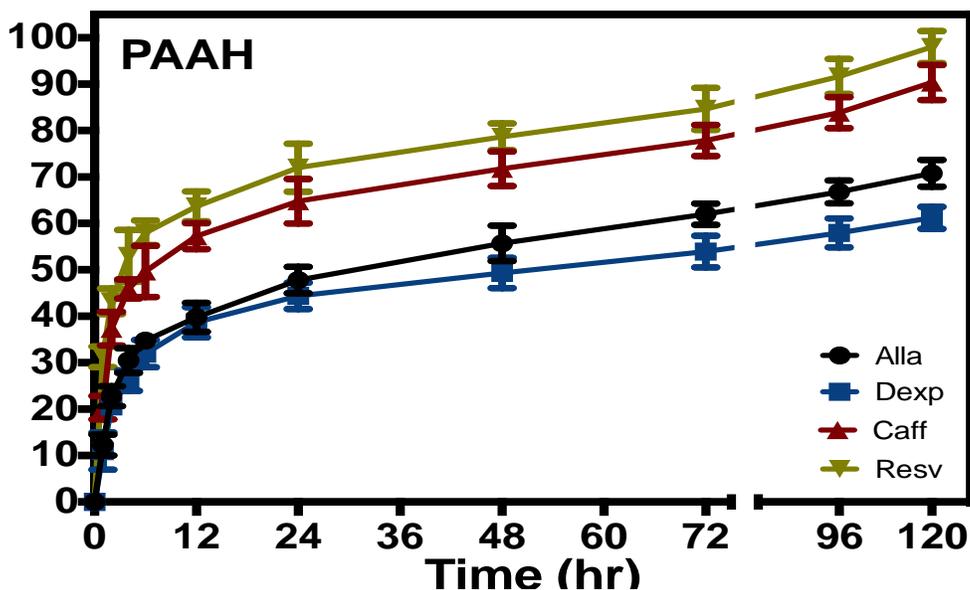


Figura 7: Perfil de liberación de compuestos con actividad cicatrizantes desde los hidrogeles con relación al tiempo. Las barras indican la desviación estándar

La liberación de los compuestos desde el hidrogel se midió de forma acumulativa mediante técnicas cromatográficas de HPLC. La Figura 7 muestra el perfil de liberación de los compuestos cicatrizantes desde el hidrogel, a lo largo de 120 horas. En las primeras 12 horas evidencia un efecto ráfaga, es decir, primero de forma rápida y luego más lenta (liberación sostenida), siendo el resveratrol el compuesto con mayor liberación al medio. Tal efecto puede ser debido a remanentes del fármaco que se encuentran en la superficie del hidrogel.

4. Análisis macroscópico de la cicatrización inducida por moléculas cicatrizantes en soporte de hidrogel.

4.1 Halo de cicatrización Rata N°1

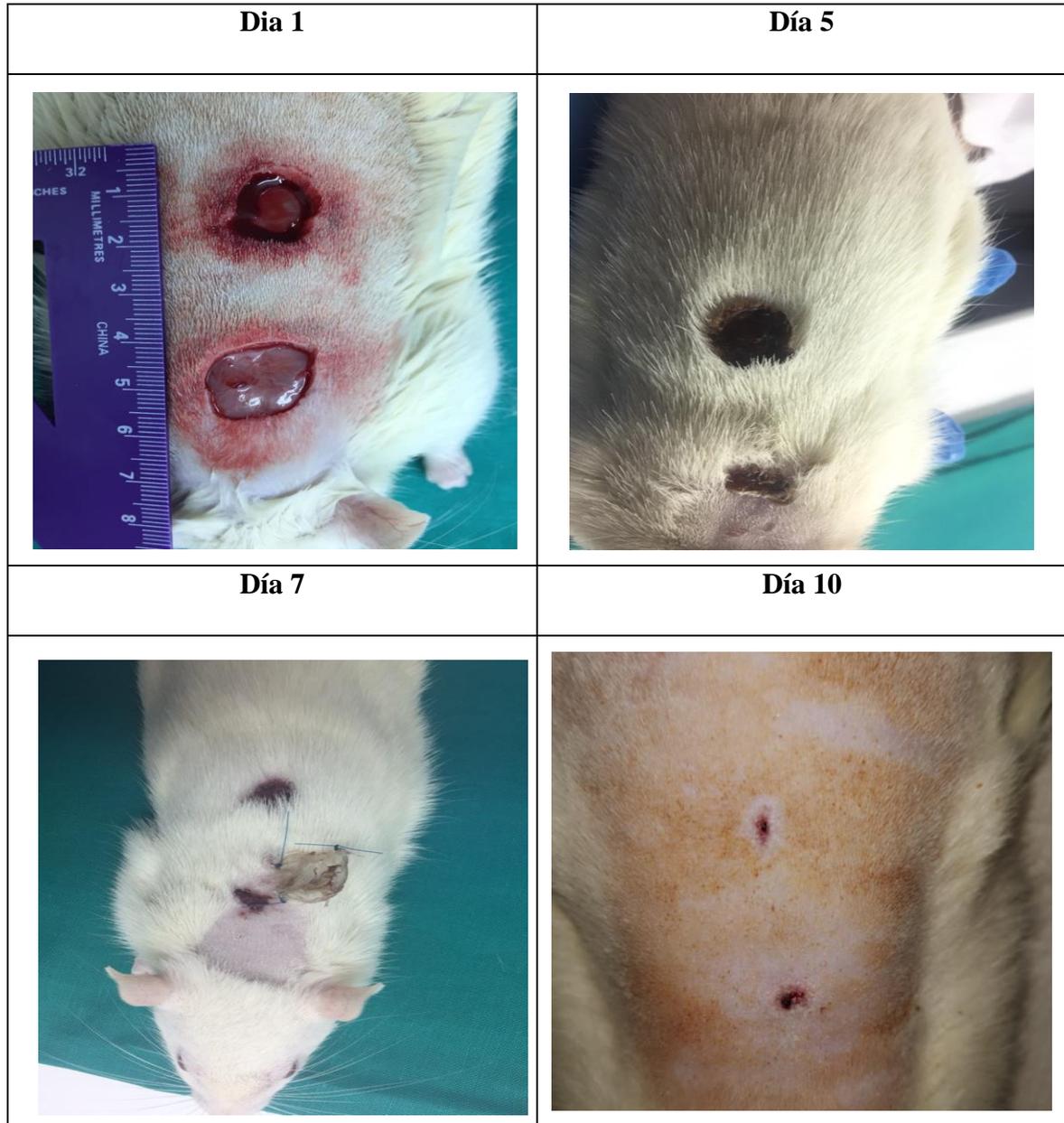


Figura 8: Resultados preliminares de la rata n°1, en donde se probaron los hidrogeles control y con fármacos (ver tabla N°1) y en donde a simple vista se nota una diferencia en la eficacia, siendo el hidrogel numero 3 el más efectivo.

4.2 Halo de cicatrización Rata N°2

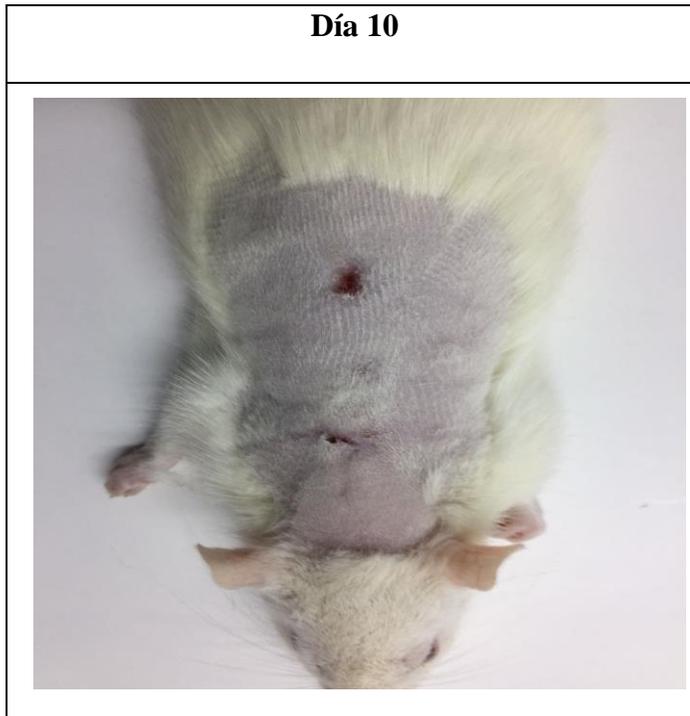


Figura 9: Resultados preliminares de la rata n°2, en donde se probaron los compuestos 2 y 4 (ver tabla N°1). En esta se puede apreciar una diferencia entre en halo de cicatrización, siendo más efectivo en el hidrogel N° 2

La visualización de las heridas luego de terminado el tratamiento nos suministra información sugestiva de cómo podría haberse desempeñado cada uno de los compuestos administrados, bajo esta lógica se compararon los halos de cicatrización de las 3 ratas con sus respectivos compuestos para determinar de manera preliminar cuan efectivo fue el tratamiento.

En la rata N°1 en la posición número 3 se encontró a simple vista el mayor efecto respecto a las otras pruebas, lo que corroboraría la eficacia del hidrogel y su papel en la liberación de biomoléculas cicatrizantes. En tanto la rata N°2 posición número 4 se observó un mayor tamaño en el halo de la herida y una menor cicatrización de la misma, este correspondía al control comercial utilizado en el estudio (ver tabla N°1)

VII. DISCUSION

Los hidrogeles son un tipo de polímeros ampliamente utilizados actualmente en la clínica y en la farmacocinética de liberación de compuestos, esto principalmente a su capacidad de reticularse y generar poros que contendrán a los compuestos (32), paralelamente influye además en la capacidad de liberación el agente que se utiliza para la reticulación, siendo cadenas carbonadas las utilizadas en la formulación de los hidrogeles para los ensayos realizados en este estudio.

Estas cadenas carbonadas poseen diferentes afinidades por los compuestos utilizados, por lo que variara la interacción a nivel molecular que posea el agente reticulante con los compuestos con actividad cicatrizante dependiendo del agente a utilizar, es importante destacar esta interacción ya que este fenómeno podría influir en la capacidad liberadora de compuestos de los hidrogeles y por consecuente en la acción cicatrizante que tendrá cada uno, debido principalmente a la biodisponibilidad y liberación que estos mantengan en la zona de la herida (39).

En el entrecruzamiento químico se han incluido agentes entrecruzantes como ácidos dicarboxílico, los que además de aportar estabilidad al material, son más compatibles con los compuestos que se requiere encapsular como ocurre en este caso. La introducción de aminoácidos en la síntesis de hidrogeles está respaldada por algunas características de los mismos: primero, contribuye a fortalecer las uniones entre las cadenas de PVA, a diferencia de los hidrogeles sintetizados clásicamente mediante el método de congelación y descongelación, que solo da como resultado puentes de hidrógeno (43). Segundo, los grupos carboxílicos aportados por el ácido aspártico permiten la formación de enlaces no covalentes, de forma que los hidrogeles pueden mejorar sus propiedades mecánicas y ser sintetizados de forma reversible (44). Y tercero, los aminoácidos son compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza, mejorando la biocompatibilidad de los hidrogeles (45)

Utilizando ácido aspártico como agente entrecruzante es posible desarrollar un hidrogel capaz de absorber una solución e incrementar su tamaño sin sufrir degradación, y al mismo tiempo liberar una droga de forma sostenida por difusión pasiva dado por el hinchamiento del hidrogel respondiendo a gradientes de concentración, que puede estar influenciado por diferentes variables, como pH, fuerza iónica, etc. En este sentido, el modelo más concordante parece ser el controlado por hinchazón, donde la exposición del hidrogel a un determinado fluido produce la liberación de la droga contenida (46).

La liberación y la hinchazón están determinadas por una variación en el pH, ya que su aumento produce una remoción de cargas positivas en los grupos radicales, lo que facilita la interacción con moléculas de agua. El comportamiento de hinchazón dependiente del pH es debido a las redes iónicas. Estas redes iónicas contienen 2 grupos ácidos y uno amino colgantes, con tres tipos de pKa (2,1, 3,9, y 9,8 respectivamente) contribuidos por el ácido aspártico (47). En medios acuosos de pH apropiado y fuerza iónica, los grupos colgantes se ionizan desarrollando cargas fijas en el hidrogel. Normalmente, las condiciones cambiantes como la temperatura y el pH, entre otras, dan como resultado una expansión o contracción homogénea de los hidrogeles en todas las direcciones

El grado de hinchamiento de la formulación aquí sintetizada es mayor a pH 7,4 y menor a 3,0, como se observa en la Figura 5; por lo tanto, la ionización se produce cuando el pH del entorno está por encima del pKa del grupo ionizable (a pH 7,4). A medida que aumenta el grado de ionización (aumento del pH del sistema), aumenta el número de cargas fijas, lo que provoca un aumento de la repulsión electrostática entre las cadenas en las redes. Debido a lo anterior, la hidrofobicidad de la red aumenta y se incrementa el grado de hinchamiento del sistema (48). Por lo tanto, al aumentar el pH, las repulsiones electrostáticas hacen que la captación de disolvente en la red aumente, el hidrogel se expanda y sea más fácil la liberación de los compuestos pro-cicatrizantes.

La expansión del hidrogel se midió según cómo varía el peso del hidrogel a medida que se va hinchando, es decir, el grado de hinchazón (*swelling degree*), mediante la siguiente fórmula:

$$\%W = \frac{W_S - W_D}{W_D} \times 100$$

Donde $\%W$ es el grado de hinchazón, y W_S y W_D corresponden al peso del hidrogel en estado hinchado y seco, respectivamente (49)

En las imágenes de la Figura 6 muestran la morfología del hidrogel utilizado en el estudio. En esta es posible apreciar la estructura porosa del hidrogel. También se observó la textura rugosa de las paredes del hidrogel. La porosidad del hidrogel es clave, ya que determina la capacidad de absorción, y puede ser ajustada de distintas formas(32, 50). Aquí, es posible modificar el tamaño del poro cambiando la concentración del entrecruzante: si es baja, disminuye la densidad de la matriz, aumenta la flexibilidad permitiendo absorber más biocomponentes; por el contrario, si aumenta la concentración del entrecruzante, aumenta la densidad de la matriz, el tamaño del poro disminuye, el sistema se torna más rígido, desencadenando una reducción en la cantidad de biocomponentes encapsulados.

El proceso de liberación controlada de las moléculas *in vitro* desde el hidrogel se determinó en relación con la concentración acumulada de los compuestos cicatrizantes en función del tiempo y cuantificado a través de HPLC. El perfil de liberación de moléculas se muestra en la Figura 7 en un transcurso total de 120 horas, las primeras 12 horas evidencia un efecto ráfaga, es decir, ocurre una liberación de forma rápida, para luego cambiar a una liberación mas lenta y sostenida. Además, a esto el grafico nos muestra altas tasas de liberación de resveratrol y ácido cafeico con respecto a los otros componentes, sin embargo, se infiere que se debe principalmente a remanentes del fármaco que se encuentran en la superficie del hidrogel, ya que la solubilidad de ambos componentes era más menos favorable con el tipo de hidrogel empleado.

En la figura 8 y 9 se observan los resultados preliminares de la prueba *in vivo*, basados en las fotos obtenidas luego de un periodo de 10 días post intervención quirúrgica. Se puede estimar de manera subjetiva que los resultados fueron favorables para el hidrogel N°3 (ver tabla 1) respecto a los demás hidrogeles probados, ya que en este existía un menor halo de cicatrización y la herida se presentaba regenerada casi en su totalidad. Este hidrogel está compuesto como sus pares en una base de poli (vinil-alcohol) que fue reticulado específicamente con cadenas carbonadas de ácido aspártico (AA), además su composición en cuanto a componentes cicatrizantes correspondía a: Alantoína 5 %, Despanthenol 2%, Acido cafeico 2% y resveratrol 2% respecto a su formulación total.

Los resultados obtenidos fueron evaluados de acuerdo con la medida de la herida post tratamiento, obtenida el día de la eutanasia en las ratas en las que se realizó la prueba, esta medida corresponde a un método bastante inexacto para evaluar con certeza el desempeño de cada uno de los hidrogeles, clasificándose como una característica cualitativa a simple vista. Por lo que es necesario esperar los resultados histopatológicos para evaluar el real desempeño del hidrogel como soporte de liberación de compuestos respecto a productos comerciales como cremas ungüentos y otros. Cabe mencionar que en este estudio se utilizó la crema madecazol como control comercial, esta crema está aprobada como un tratamiento que promueve la cicatrización, sin embargo, poseía algunas limitancias como la periodicidad de administración en la herida de las ratas, ya que debía ser una administración diaria y constante. En cambio, con la utilización del hidrogel se incurrió pocas veces en cambiar el hidrogel en la herida, lo que nos demuestra un mayor beneficio desde el punto de vista de la autonomía del método, manteniendo una liberación constante y controlada a lo largo del periodo de tiempo sin la necesidad de suministrar el compuesto diariamente. Un factor importante que destacar en este estudio fue el método que se utilizó para fijar apósito de hidrogel a las heridas de las ratas, este se realizó mediante técnicas de vendajes especialmente diseñadas para el tamaño de las ratas. Sin embargo, existieron casos en donde los animales de estudio evitaban el contacto con estos apósitos, extrayéndoselo con sus garras y dientes, imposibilitando la mantención del apósito las 24 horas del día. Es por esto por lo que se revisó de manera diaria el estado de los apósitos en cada una de las ratas, para que de esta manera se asegurara la eficacia del tratamiento y el contacto con el tejido dañado.

VIII. CONCLUSION

Con el método de reticulación con ácidos dicarboxílicos fue posible la síntesis de un hidrogel en base PVA, en este estudio se optó por el ácido aspártico como agente reticulante, lo que asegura una buena sinergia en la captación de agua a pH fisiológico y una correcta biocompatibilidad debido a su naturaleza aminoacídica.

El hidrogel sintetizado fue sometido a pruebas de hinchazón en diferentes pH, para determinar un mayor desempeño. A pH 7,4 el hidrogel es capaz de hincharse casi un 600% de su tamaño, es por esto que es capaz de incorporar grandes cantidades de componentes, lo que permitiría una actividad terapéutica prolongada a lo largo del tiempo. La dependencia del pH en el proceso de hinchazón dejó en evidencia la naturaleza fuertemente hidrofílica del ácido aspártico como entrecruzante, lo que puede influir en el proceso de incorporación de moléculas.

La microscopia electrónica de barrido permitió visualizar el hidrogel sintetizado y corroborar el tamaño de los poros que se esperaba obtener del proceso de síntesis, siendo este el factor principal para la capacidad de captación de agua y moléculas dentro de la red polimérica. Además, en la prueba de liberación de componentes se demostró un comportamiento similar de las 4 moléculas que estaban contenidas dentro del hidrogel, por lo que se concluye que la liberación en primera instancia ocurre de forma exponencial, para que luego de horas se mantenga y torne sostenida

En cuanto al ensayo in vivo se demostró la eficacia del hidrogel como matriz para la integración de un tratamiento que pueda favorecer la cicatrización, dado principalmente por la capacidad de emular el ambiente fisiológico, además de la capacidad de intercambiar agua con el medio y brindar protección contra factores lesivos. Respecto a la comparación a tratamientos comerciales la prueba con hidrogel fue más efectiva, en cuanto resultados macroscópicos y autonomía de la aplicación.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Khavkin J, Ellis DA. Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2011;19(2):229-34.
2. Sood A, Granick MS, Tomaselli NL. Wound Dressings and Comparative Effectiveness Data. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2014;3(8):511-29.
3. Bahramsoltani R, Farzaei MH, Rahimi R. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. *Arch Dermatol Res.* 2014;306(7):601-17.
4. Sarandy MM, Novaes RD, Xavier AA, Vital CE, Leite JPV, Melo FCSA, et al. Hydroethanolic Extract of. *Biomed Res Int.* 2017;2017:9538351.
5. Dréno B, Araviiskaia E, Berardesca E, Gontijo G, Sanchez Viera M, Xiang LF, et al. Microbiome in healthy skin, update for dermatologists. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016;30(12):2038-47.
6. Gantwerker EA, Hom DB. Skin: histology and physiology of wound healing. *Clin Plast Surg.* 2012;39(1):85-97.
7. Klein J, Permana PA, Owecki M, Chaldakov GN, Böhm M, Hausman G, et al. What are subcutaneous adipocytes really good for? *Exp Dermatol.* 2007;16(1):45-70.
8. Geneser F. *Histologia.* edición t, editor. Madrid, España: RR Donnaelley; 2008. 19 p.
9. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999;341(10):738-46.
10. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 2009;37(5):1528-42.
11. Basto CV. CICATRIZACIÓN: PROCESO DE REPARACIÓN TISULAR. APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS marzo 2010 ed: investigaciones ANDINA; 2010. p. 88-9.
12. Landén NX, Li D, Ståhle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(20):3861-85.
13. López-Delis A, de S Rodrigues Fleury Rosa S, de Souza PEN, Carneiro MLB, Rosa MFF, Macedo YCL, et al. Characterization of the Cicatrization Process in Diabetic Foot Ulcers Based on the Production of Reactive Oxygen Species. *J Diabetes Res.* 2018;2018:4641364.
14. Hew J, Solon-Biet SM, McMahon AC, Ruohonen K, Raubenheimer D, Ballard JW, et al. The Effects of Dietary Macronutrient Balance on Skin Structure in Aging Male and Female Mice. *PLoS One.* 2016;11(11):e0166175.

15. Alvarez-Román R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J Control Release*. 2004;99(1):53-62.
16. Takagi H, Ishiga Y, Watanabe S, Konishi T, Egusa M, Akiyoshi N, et al. Allantoin, a stress-related purine metabolite, can activate jasmonate signaling in a MYC2-regulated and abscisic acid-dependent manner. *J Exp Bot*. 2016;67(8):2519-32.
17. Staiger C. Comfrey: a clinical overview. *Phytother Res*. 2012;26(10):1441-8.
18. Shestopalov AV, Shkurat TP, Mikashinovich ZI, Kryzhanovskaia IO, Bogacheva MA, Lomteva SV, et al. [Biological functions of allantoin]. *Izv Akad Nauk Ser Biol*. 2006(5):541-5.
19. Cornara L, Biagi M, Xiao J, Burlando B. Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. *Front Pharmacol*. 2017;8:412.
20. Scapagnini G, Foresti R, Calabrese V, Giuffrida Stella AM, Green CJ, Motterlini R. Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1 inducers. *Mol Pharmacol*. 2002;61(3):554-61.
21. Udompataikul M, Limpa-o-vart D. Comparative trial of 5% dexpanthenol in water-in-oil formulation with 1% hydrocortisone ointment in the treatment of childhood atopic dermatitis: a pilot study. *J Drugs Dermatol*. 2012;11(3):366-74.
22. Chung S, Yao H, Caito S, Hwang JW, Arunachalam G, Rahman I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys*. 2010;501(1):79-90.
23. Berman AY, Motechin RA, Wiesenfeld MY, Holz MK. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *NPJ Precis Oncol*. 2017;1.
24. Turner TD. A look at wound dressings. *Health Soc Serv J*. 1979;89(4640):529-31.
25. WINTER GD. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature*. 1962;193:293-4.
26. Edwards JV, Yager DR, Cohen IK, Diegelmann RF, Montante S, Bertoniere N, et al. Modified cotton gauze dressings that selectively absorb neutrophil elastase activity in solution. *Wound Repair Regen*. 2001;9(1):50-8.
27. Waring MJ, Parsons D. Physico-chemical characterisation of carboxymethylated spun cellulose fibres. *Biomaterials*. 2001;22(9):903-12.
28. Fansler RF, Taheri P, Cullinane C, Sabates B, Flint LM. Polypropylene mesh closure of the complicated abdominal wound. *Am J Surg*. 1995;170(1):15-8.
29. Kearney JN. Clinical evaluation of skin substitutes. *Burns*. 2001;27(5):545-51.
30. van der Veen VC, van der Wal MB, van Leeuwen MC, Ulrich MM, Middelkoop E. Biological background of dermal substitutes. *Burns*. 2010;36(3):305-21.
31. Kamoun EA, Kenawy ES, Chen X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *J Adv Res*. 2017;8(3):217-33.

32. Gao T, Jiang M, Liu X, You G, Wang W, Sun Z, et al. Patterned Polyvinyl Alcohol Hydrogel Dressings with Stem Cells Seeded for Wound Healing. *Polymers (Basel)*. 2019;11(1).
33. Bullock AJ, Pickavance P, Haddow DB, Rimmer S, MacNeil S. Development of a calcium-chelating hydrogel for treatment of superficial burns and scalds. *Regen Med*. 2010;5(1):55-64.
34. Song W, Markel DC, Jin X, Shi T, Ren W. Poly(vinyl alcohol)/collagen/hydroxyapatite hydrogel: properties and in vitro cellular response. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100(11):3071-9.
35. Li JK, Wang N, Wu XS. Poly(vinyl alcohol) nanoparticles prepared by freezing-thawing process for protein/peptide drug delivery. *J Control Release*. 1998;56(1-3):117-26.
36. Lim KS, Alves MH, Poole-Warren LA, Martens PJ. Covalent incorporation of non-chemically modified gelatin into degradable PVA-tyramine hydrogels. *Biomaterials*. 2013;34(29):7097-105.
37. Hamidi M, Azadi A, Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60(15):1638-49.
38. Fabian A. In-Silico Design, Synthesis and Evaluation of a Nanostructured Hydrogel as a Dimethoate Removal Agent. 2018.
39. Schanuel FS, Raggio Santos KS, Monte-Alto-Costa A, de Oliveira MG. Combined nitric oxide-releasing poly(vinyl alcohol) film/F127 hydrogel for accelerating wound healing. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015;130:182-91.
40. Buwalda SJ, Vermonden T, Hennink WE. Hydrogels for Therapeutic Delivery: Current Developments and Future Directions. *Biomacromolecules*. 2017;18(2):316-30.
41. Lin CC, Metters AT. Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58(12-13):1379-408.
42. Valdez O, Avila F, Marican A, Fuentealba N, Villaseñor J, Duran E. Methamidophos removal from aqueous solutions using a super adsorbent based on crosslinked poly(vinyl-alcohol) hydrogel. *Applied polymer*. 2017;45964.
43. parhi R. Cross-Linked Hydrogel for Pharmaceutical Applications: A Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2017;7(4):515-30.
44. Mohanapriya S, Raj V. Tuning biological properties of poly (vinyl alcohol) with amino acids and studying its influence on osteoblastic cell adhesion. *Materials Science and Engineering: C*. 2018;86:70-82.
45. Chang CJ, Swift G. POLY(ASPARTIC ACID) HYDROGEL. *Journal of Macromolecular Science, Part A*. 1999;36(7-8):963-70.
46. Chan AW, Neufeld RJ. Modeling the controllable pH-responsive swelling and pore size of networked alginate based biomaterials. *Biomaterials*. 2009;30(30):6119-29.

47. Canal T, Peppas NA. Correlation between mesh size and equilibrium degree of swelling of polymeric networks. *Journal of Biomedical Materials Research* 2004;20:1183-93.
48. Avila-Salas F, Rodriguez Nuñez Y, Marican A, Castro R, Villaseñor J, Santos L, et al. Rational Development of a Novel Hydrogel as a pH-Sensitive Controlled Release System for Nifedipine. *Polymers*. 2018;10(7).
49. Shalviri A, Liu Q, Abdekhodaie MJ, Wu XY. Novel modified starch–xanthan gum hydrogels for controlled drug delivery: Synthesis and characterization. *Carbohydrate Polymers*. 2010;79(4):898-907.
50. Annabi N, Nichol JW, Zhong X, Ji C, Koshy S, Khademhosseini A, et al. Controlling the Porosity and Microarchitecture of Hydrogels for Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B, Reviews*. 2010;16(4):371-83.