

Universidad Católica de Santa María

Facultad De Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas Y Biotecnológicas

Escuela Profesional De Ingeniería Biotecnológica



“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN BIOPOLÍMERO A BASE DE: *Isurus oxyrinchus*, *Mustelus whitneyi*; *Aloe maculata* Y *Urtica urens*, SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE FIBROBLASTOS”

Tesis Presentada Por Los Bachilleres:
Candia Gauna Daphne Regina
Llanos Zevallos Agena Helena

Para optar el título profesional de:
Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:
Ing. Roque Rodríguez Francisco Javier

AREQUIPA –PERÚ

2018

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 14027124
N° Trámite en Fac. 213-2014
Fecha Recep. Fac. 01-07-2014

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: CANDIA GAUNA, Daphne Regina
LLANOS ZEVALLOS, Agena Helena

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"ESTUDIO DE LA CAPACIDAD REGENERATIVA DE UN BIOPOLIMERO FORMADO A PARTIR DE COLAGENO EXTRAIDO DE LA PIEL DE *Mustelus whitneyi* CON *Aloe vera* Y *Urtica dioica* L. EN EL TRATAMIENTO DE LESIONES CUTANEAS"

DICTAMINADORES: 1) Ing. Fredy Molina Rodríguez 2) Ing. Jaime Barreda del Carpio

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, habiendo revisado el presente Borrador de Tesis intitulado: "EVALUACION DE LA CAPACIDAD REGENERATIVA DE UN BIOPOLIMERO FORMADO A PARTIR DE COLAGENO DE PIEL DE TIBURON, *Aloe vera* Y *Urtica dioica* L. PARA EL TRATAMIENTO DE LESIONES CUTANEAS" y habiendo realizado las correcciones indicadas se considera APTO para que prosiga con el trámite en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente

FIRMAS:



(Devolver antes de 8 días hábiles)

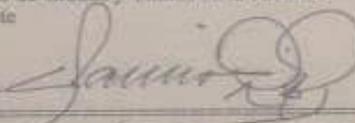
FECHA 13/06/2014

ASESOR: Mgter. Francisco Roque Rodríguez

DICTAMEN ASESORÍA: Sr. Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por las recurrentes, tengo a bien informar que se ha verificado el cumplimiento de los objetivos y redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes por lo cual considero que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA



FECHA 08/05/2015

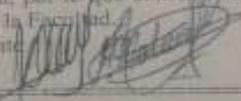
DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Dr. José Villanueva Salas 3) Mgter. Jaime Barreda del Carpio
2) Dr. Fredy Molina Rodríguez

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis sugiriendo se cambie el título a: "EVALUACION DEL EFECTO DE UN BIOPOLIMERO A BASE DE: *Ixurus oxyrinchus*, *Mustelus whitneyi*, *Aloe maculata* Y *Urtica urens*, SOBRE LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS" y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, por lo que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA

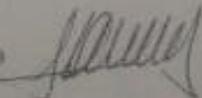


(Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA

JURADOS: PRESIDENTE Dr. José Villanueva Salas
VOCAL Dr. Fredy Molina Rodríguez
SECRETARIO Mgter. Jaime Barreda del Carpio

FECHA 20/06/18 HORA 19.00 LOCAL SUN C-402

FIRMA DEL DECANO



FECHA 12/06/18



RESUMEN

El trabajo “Evaluación del efecto de un biopolímero a base de: *Isurus oxyrinchus*, *Mustelus whitneyi*; *Aloe maculata* y *Urtica urens* sobre la proliferación de fibroblastos”, tuvo como objetivo el diseño de un biopolímero compuesto a partir de una mezcla de colágeno extraído de las pieles de *Isurus oxyrinchus* y *Mustelus whitneyi*, y extractos de *Aloe maculata* y *Urtica urens* donde se evaluó el efecto sobre la proliferación de fibroblastos *in vitro*.

El procedimiento consistió en extraer colágeno de las pieles de las especies *Isurus oxyrinchus* y *Mustelus whitneyi*, empleando una variante del método descrito por Nagai y Susuki (1), asimismo se evaluó el rendimiento de colágeno en peso seco el cual fue de 32.1 y 24.6 % respectivamente; se caracterizó el colágeno obtenido mediante análisis fisicoquímicos y microbiológicos según la norma técnica colombiana (NTC 3750) (2) y técnicas moleculares, los cuales permitieron verificar que el producto obtenido fue colágeno de tipo I y que cumplió los requisitos

establecidos por la NTC 3750; se preparó extractos de *Aloe maculata* y *Urtica urens* para analizar el contenido de polisacáridos, resultando 0.2877 ± 0.0684 y 0.2422 ± 0.0799 mg/mL respectivamente, no se encontró diferencia significativa entre ambos. Se diseñó el biopolímero a concentraciones de 10 y 20 mg/mL de colágeno y 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg/mL de polisacáridos de *Aloe maculata* y *Urtica urens*; se comprobó el efecto sobre la proliferación de fibroblastos *in vitro* del biopolímero mediante ensayos de proliferación celular en fibroblastos dermales humanos donde se encontró que el aumento de la concentración de 10 a 20 mg/mL de colágeno produce un efecto negativo significativo en la proliferación de fibroblastos, sin embargo se presenta un efecto opuesto para el *Aloe maculata* el que muestra un aumento en la proliferación de fibroblastos a concentraciones de polisacáridos entre 0.5 y 1.97 mg/mL, *Urtica urens* mostró un aumento en la proliferación celular en concentraciones mayores a 0.5 mg/mL hasta concentraciones de 3.33 mg/mL de polisacáridos, donde se empieza a mostrar una disminución en la actividad proliferativa. El biopolímero diseñado con los tres componentes mostró un ligero incremento en la actividad proliferativa de los fibroblastos, sin embargo es necesario trabajar a concentraciones menores de colágeno para determinar todo el potencial del biopolímero diseñado.

Palabras clave: Colágeno, tiburón, *Isurus oxyrinchus*, *Mustelus whitneyi*, *Aloe maculata*, *Urtica urens*, biopolímero.

ABSTRACT

The paper "Evaluation of the effect of a biopolymer base collagen from marine species, *Aloe maculata* and *Urtica urens* on the proliferation of fibroblasts in vitro" has target the design of a biopolymer compound by the extracted from collagen of two marine species like *Isurus oxyrinchus* (Diamante) , *Mustelus whitneyi* (Tollo), juices of *Aloe maculata* and *Urtica urens* (Nettle) where was evaluated the effect on the proliferation of fibroblasts *in vitro*.

The procedure consisted of drawing collagen from covers species *Isurus oxyrinchus* (Diamante) and *Mustelus whitneyi* (Tollo), the method used was a variant of the method described by Nagai and Susuki also collagen performance was evaluated in the dry weight which it was 32.1 and 24.6 % respectively; collagen obtained by organoleptic, chemical and microbiological analysis was characterized by the Colombian technical standard (NTC 3750) and molecular techniques , which allowed us to verify that the collagen obtained was type I and fulfilled the requirements set by the NTC 3750; also we selected and prepared juices from *Aloe maculata* and *Urtica urens* the polysaccharide content was de 0.2877 ± 0.0684 y 0.2422 ± 0.0799 mg/mL, respectively, no significant difference was found between them; the design of the biopolymer has the concentrations of 10 and 20 mg /mL of collagen and 0.5, 1.0 , 2.0 and 4.0 mg /mL of polysaccharides of *Aloe maculata* and *Urtica urens*; the results show that increased of the concentration from 10 to 20 mg /mL of collagen produced a significant negative effect on fibroblast proliferation; the polysaccharide concentrations between 0.5 and 1.97 mg/mL of *Aloe maculata* show an increase in cell proliferation, however from 1.97mg/mL the cell activity decreases, unlike the behavior of *Urtica urens*, it showed an increase in cell proliferation at concentrations greater than 0.5 but below 3.33 mg/mL of polysaccharides, above that point proliferative activity decreased but not significantly. The biopolymer designed demonstrated a slight positive effect on increase the fibroblast proliferation which was indicative that the joining of the three components can caused the proliferative action of fibroblasts.

Keywords: Collagen, shark, *Isurus oxyrinchus* , *Mutelus whitneyi* , *Aloe maculata* All, *Urtica urens* L. , biopolymer.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
OBJETIVO GENERAL	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
HIPÓTESIS	4
CAPÍTULO I	5
MARCO TEÓRICO	5
1.1 Biopolímeros	5
1.1.1 Aplicaciones.....	5
1.2 Colágeno	6
1.2.1 Tipos.....	6
1.2.2 Fuentes de obtención.....	7
1.3 <i>Mustelus whitneyi</i>	8
1.3.1. Clasificación taxonómica	8
1.3.2. Ubicación taxonómica y descripción	8
1.4 <i>Isurus oxyrinchus</i>	9
1.4.1. Clasificación taxonómica	9
1.4.2. Ubicación taxonómica y descripción	9
1.5 Género <i>Aloe L.</i>	10
1.5.1. Clasificación taxonómica	10
1.5.2. Ubicación taxonómica y descripción	10
1.6 <i>Aloe maculata</i>	13
1.7 <i>Urtica urens L.</i>	14
CAPÍTULO II	18
MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1. Lugar de investigación	18
2.2. Materiales	18
2.3. Metodología	22
2.3.1. Extracción de colágeno a partir de la piel de las especies marinas <i>Mustelus whitneyi</i> e <i>Isurus oxyrinchus</i>	22
2.3.1.1. Acondicionamiento de las muestras.....	22
2.3.1.2. Eliminación de proteína no colagenosas	23
2.3.1.3. Solubilización de colágeno	23
2.3.1.4. Precipitación de colágeno	23
2.3.1.5. Diálisis	24
2.3.2. Caracterización del colágeno según sus propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y moleculares.....	24

2.3.2.1. Caracterización fisicoquímica.....	24
2.3.2.2. Caracterización microbiológica	25
2.3.2.3. Caracterización molecular.....	25
2.3.3. Determinación del rendimiento de colágeno.....	26
2.3.4. Preparación de extractos de <i>Aloe maculata</i> y <i>Urtica urens</i> y determinación del contenido de polisacáridos totales.....	26
2.3.5. Determinación del efecto del biopolímero diseñado a base de: colágeno y extractos de <i>Aloe maculata</i> , <i>Urtica urens</i> sobre la proliferación de fibroblastos <i>invitro</i>	27
2.3.5.1 Diseño del biopolímero	27
2.3.5.2.Cultivo y viabilidad de fibroblastos en presencia de los biopolímeros.	29
CAPÍTULO III.....	31
RESULTADOS Y DISCUSION	31
3.1. Extracción de colágeno a partir de la piel de las especies marinas <i>Mustelus whitneyi</i> e <i>Isurus oxyrinchus</i>	31
3.1.1. Acondicionamiento de las muestras.....	31
3.1.2. Eliminación de proteína no colagenosa.....	32
3.1.3. Solubilización de colágeno	33
3.1.4. Precipitación de proteínas	34
3.1.5. Diálisis	36
3.2. Caracterización de colágeno según sus propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y moleculares.....	37
3.2.1. Caracterización fisicoquímica.....	37
3.2.2. Caracterización microbiológica	38
3.2.3. Caracterización molecular.....	39
3.3. Determinación del rendimiento de colágeno.....	40
3.4. Preparación de extractos de <i>Aloe maculata</i> y <i>Urtica urens</i> y determinación del contenido de polisacáridos totales.....	41
3.5. Determinación del efecto del biopolímero diseñado a base de: colágeno y extractos de las especies vegetales <i>Aloe maculata</i> , <i>Urtica urens</i> sobre la proliferación de fibroblastos <i>in vitro</i>	44
3.5.1. Cultivo y viabilidad de fibroblastos en presencia de los biopolímeros.	44
CONCLUSIONES.....	52
SUGERENCIAS	53
REFERENCIAS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía del tiburón <i>Mustelus whitneyi</i>	9
Figura 2. Fotografía del tiburón <i>Isurus oxyrinchus</i>	10
Figura 3. Planta de <i>Aloe maculata</i> . A) Flores, B) Hojas.....	13
Figura 4: Flores y hojas de la planta <i>Urtica urens</i> L.....	15
Figura 5. Acondicionamiento de las pieles.....	31
Figura 6. Hidrolisis alcalina de las pieles.....	33
Figura 7. Disolución del colágeno presente en las pieles de: A) <i>I. Oxyrinchus</i> , B) <i>M. whitneyi</i> . en solución de ácido acético.....	34
Figura 8. Proceso de precipitación del colágeno soluble mediante saturación con NaCl (Salting out).	35
Figura 9. Solución de colágeno re disuelto.....	36
Figura 10. Diálisis de colágeno.....	36
Figura 11. Gel de electroforesis en SDS-poliacrilamida.....	39
Figura 12. Curva de calibración para la determinación de polisacáridos. (Ensayo fenol-ácido sulfúrico).....	42
Figura 13. Placas de cultivo de fibroblasto- biopolímeros con el reactivo MTT.....	45
Figura 14. Diagrama de Pareto para el biopolímero conformado por colágeno, <i>Aloe maculata</i> y <i>Urtica urens</i>	47
Figura 15. Gráfica de efectos principales de la matriz: colágeno, <i>Aloe maculata</i> y <i>Urtica urens</i>	48
Figura 16. Gráfico de superficie de respuesta para la interacción de colágeno, <i>Aloe maculata</i> y <i>Urtica urens</i>	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Componentes químicos de la planta <i>Aloe vera</i> (Barbadensis Miller).....	12
Tabla 2 Composición química de la planta <i>Urtica dioica</i> L.....	16
Tabla 3 Método de determinación de Hidroxiprolina- Woessner.....	23
Tabla 4 Requisitos fisicoquímicos para el colágeno soluble según el ICONTEC...	25
Tabla 5 Requisitos Microbiológicos para el colágeno soluble según el ICONTEC..	25
Tabla 6 Diseño del biopolímero formado por colágeno, <i>Aloe maculata</i> y <i>Urtica urens</i>	28
Tabla 7 Análisis fisicoquímico de colágeno extraído de <i>I. oxyrinchus</i> y <i>M. Whitneyi</i>	37
Tabla 8 Análisis microbiológico de colágeno extraído de <i>M. whitneyi</i> e <i>I. oxyrinchus</i>	39
Tabla 9 Contenido de polisacáridos (mg/ml.) de extractos de <i>Aloe maculata</i> y <i>Urtica urens</i>	42
Tabla 10 Porcentaje de viabilidad de las matrices conformadas por colágeno, <i>Aloe maculata</i> y <i>Urtica urens</i>	46
Tabla 11 Análisis de varianza para el porcentaje de viabilidad de los biopolímeros conformados por colágeno, <i>Aloe maculata</i> y <i>Urtica urens</i>	49

INTRODUCCIÓN

Son numerosos los estudios que se han desarrollado en la búsqueda de agentes que aceleren o mejoren el proceso de cicatrización y regeneración celular.

Hoy en día es común el uso de membranas, apósitos o cubiertas transitorias en el tratamiento de lesiones o traumas químico-mecánicos generados en la piel y mucosas (3), siendo empleados generalmente al inicio del tratamiento de heridas con el fin de evitar su exposición al medio ambiente y el sangrado de las mismas (4). A pesar de la efectividad de los materiales empleados, es necesario el cambio periódico de estos procedimientos durante el tratamiento de heridas lo que genera nuevas lesiones en el tejido regenerado (5) limitando su efectividad.

Actualmente existen productos más efectivos para el tratamiento de lesiones, donde el daño residual es menor ya que pueden utilizarse por periodos de tiempo más largos debido a la naturaleza de sus componentes, sin embargo el elevado costo hace que sean poco accesibles al público en general.

Numerosas investigaciones han demostrado que el colágeno es uno de los materiales más importantes en el tratamiento de heridas, debido su alta biocompatibilidad y su rol principal en la regeneración celular (6), es por ello que se han desarrollado muchos productos en base a colágeno orientados para el tratamiento de lesiones cutáneas.

Según el Ministerio de la Producción en el Perú el desembarque de recursos hidrobiológicos genera un volumen de desechos con alto impacto ambiental el cual no es tratado debidamente. Alrededor de 327 TM de residuos de recursos marinos son desechados anualmente generando un daño ecológico grave; los residuos secundarios de las especies marinas (*Isurus oxyrinchus* y *Mustelus whitneyi*) constituyen una fuente de colágeno fácilmente accesible, económica y con alta expectativa productiva frente a las fuentes empleadas en la actualidad, las mismas que son de origen porcino y bovino que presentan ciertos riesgos y limitaciones como, la transmisión de las enfermedades bovinas zoonóticas; además resultan ser

inapropiados para muchos grupos religiosos y étnicos debido a limitaciones socio-culturales; también existen otro tipo de limitaciones como el costo de obtención de colágeno de bovinos (7), ya que se ve afectado por el alto valor que tiene el proceso de obtención de este tipo de animales, además del uso de métodos drásticos y perjudiciales para su extracción que dañan el medio ambiente.

El conocimiento acerca de las propiedades del *Aloe* para favorecer la regeneración celular data desde hace más de 2000 años, muchas civilizaciones y culturas la han usado especialmente en quemaduras, cicatrización de heridas y alivio de dolores (8)

Durante los últimos años se están llevando a cabo diversas investigaciones sobre los efectos del *Aloe* y sus componentes, los cuales son considerados por su acción en la curación de heridas y propiedades inmunoestimulantes (9) (10).

Desde tiempos antiguos la ortiga ha sido utilizada en la medicina tradicional por sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas y hemostáticas (11). Estudios recientes han justificado los numerosos usos medicinales de la ortiga y han atribuido su actividad biológica a distintos constituyentes (12)

En este sentido la presente investigación tuvo como objetivo principal evaluar el efecto sobre la proliferación de fibroblastos *in vitro* de un biopolímero a base de: colágeno de especies marinas (*Isurus oxyrinchus*, *Mustelus whitneyi*); y extractos de las especies vegetales (*Aloe maculata* y *Urtica urens*).

OBJETIVOS

Objetivo general

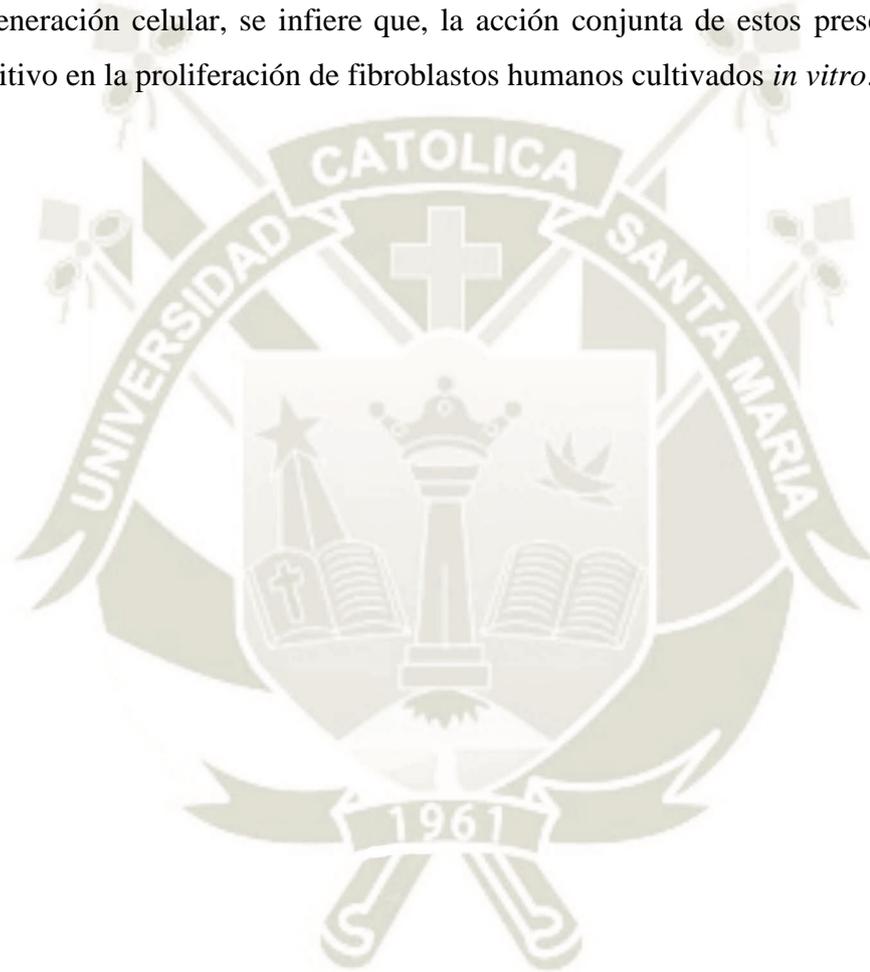
Evaluar el efecto de biopolímeros a base de: colágeno de *Isurus oxyrinchus* y *Mustelus whitneyi* y extractos de *Aloe maculata* y *Urtica urens*, sobre la proliferación de fibroblastos.

Objetivos específicos

- Extraer colágeno a partir de la piel de las especies marinas *Mustelus whitneyi* e *Isurus oxyrinchus*.
- Caracterizar el colágeno según propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y moleculares.
- Determinar el rendimiento de colágeno obtenido.
- Preparar extractos de las especies vegetales *Aloe maculata* y *Urtica urens*, determinar el contenido de polisacáridos.
- Evaluar el efecto de los biopolímeros sobre la proliferación de fibroblastos *in vitro*

HIPÓTESIS

Dado que el biopolímero formulado a base de: colágeno obtenido de la piel de las especies marinas: *Isurus oxyrinchus* y *Mustelus whitneyi*; y extractos de las especies vegetales: *Aloe maculata* y *Urtica urens*; poseen componentes que favorecen la regeneración celular, se infiere que, la acción conjunta de estos presente un efecto positivo en la proliferación de fibroblastos humanos cultivados *in vitro*.



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Biopolímeros

Los biopolímeros se generan por sistemas biológicos, o pueden ser sintetizados químicamente empleando materiales de origen renovable; una característica fundamental de los biopolímeros es que su degradación se presenta en periodos de tiempo cortos (13).

La mayoría de los materiales formados en la naturaleza durante los ciclos de vida de las plantas verdes, animales, bacterias y hongos son polímeros o compuestos de matriz polimérica. Por ejemplo, todas las proteínas son copolímeros específicos con disposiciones regulares de diferentes tipos de α -aminoácidos (14).

Se consideran biomateriales poliméricos o biopolímeros a los polímeros biocompatibles que pueden ser obtenidos a partir de fuentes naturales o sintéticas y al ser introducidos en el sistema biológico (15).

Los cuales no deberán de generar reacciones tóxicas al organismo, incluidas aquellas sustancias que puedan migrar y ocasionar irritación sobre la piel o las mucosa (16), la cicatrización deberá de ser normal sin complicaciones (14) (17), los biomateriales deben estar libres de microorganismos patógeno para la salud del hospedero, este material no deberá de producir citotoxicidad, irritación y sensibilidad, tampoco debe atacarlo, a menos que sea biodegradable (18) (19) (20) y que la descomposición orgánica no cause daños, contaminación, ni infección alguna (21).

1.1.1. Aplicaciones

Las aplicaciones médicas y farmacéuticas de los biopolímeros constituyen actualmente uno de los campos de mayor interés en el desarrollo de macromoléculas, por su utilización como dispositivos terapéuticos cardiovasculares, ortopédicos, oftalmológicos, dentales, sustitutos de la piel, sistemas de liberación de fármacos y sensores para propósitos de diagnóstico (14).

Asimismo los biopolímeros son muy utilizados en el diseño de dispositivos biomédicos destinados a reemplazar tejidos y órganos blandos, empleando elementos como el poliuretano para corazones artificiales, polihidroxietilmetacrilatos (PHEMA) y etilenglicol dimetilacrilato (EGDMA) para lentes de contacto suaves (14) (23), entre otras aplicaciones sirven para proteger la estabilidad de los fármacos, mediante diferentes vías de administración sin que se afecte la biodisponibilidad que presenta la vía intravenosa (14) (24).

A pesar de los diferentes biomateriales que se emplean para la regeneración de tejidos, y otros usos biomédicos; el colágeno ha mostrado ser muy superior en comparación con sistemas fabricados a partir de polímeros sintéticos ya que presenta una baja antigenicidad, biodegradabilidad y biocompatibilidad (propiedades hemostáticas y ligando de células) que son requisitos necesarios para membranas bioabsorbibles, andamiajes celulares, técnicas de regeneración tisular y ósea, entre otros (25) (26) (3) (27).

1.2 Colágeno

El colágeno es una proteína trimérica fibrosa presente en todos los mamíferos, constituye alrededor del 25% de las proteínas totales en el cuerpo de los mamíferos, siendo así la más abundante, su principal función es proporcionar integridad estructural, sobre todo en la matriz extracelular, la proteína forma hélices triples constituidas por cadenas α unidas por puentes de hidrógeno intermoleculares, estas cadenas contienen principalmente glicina-X-Y, en donde X y Y pueden ser cualquier aminoácido, pero normalmente son prolina e hidroxiprolina respectivamente. Una de las características más importantes del colágeno, es que tiene una gran flexibilidad, pero a la vez ofrece gran resistencia a la tracción, ya sea por esto, o por su presencia en el cuerpo humano, el colágeno es una proteína altamente utilizada en el área de la medicina y cosmética (28).

1.2.1 Tipos

A los menos cuatro tipos de colágeno (I, II, III y IV) se han identificado en músculos de mamíferos y aves (29).

- Tipo I, es el más común o abundante en cuerpo humano, constituida por dos cadenas $\alpha 1$ de tipo I y una cadena $\alpha 2$, localizada en la dermis, cartílago fibroso, hueso, cápsula de órganos, tendón y fascias, con funciones de resistencia a la tracción, soporte y protección y sintetizadas por los fibroblastos y osteoblastos, el colágeno tipo I normalmente sirve para ofrecer soporte a la dermis y por esto es ampliamente usado en productos cosméticos (28) (3) (30).
- Tipo II, constituido por tres cadenas $\alpha 1$ de tipo II, localizada en los cartílagos hialino y elástico, con funciones de resistencia a la presión y deslizamiento y sintetizada por los condroblastos. Es actualmente utilizado en dietas para tratar enfermedades relacionadas con las articulaciones (como la osteoartritis) (28) (3).
- Tipo III, constituido por tres cadenas $\alpha 1$ de tipo III, localizada en la capa media de órganos tubulares y cavitarios como arterias y útero, en los órganos macizos como riñón, hígado, bazo y ganglios linfáticos, así como, en el endoneuro y el músculo liso, con funciones de mantenimiento de la estructura de estos órganos y sustentación de las células y sintetizada por fibroblastos, miocitos, célula de Schwann, hepatocitos y célula reticular. (28)
- Tipo IV, constituida por tres cadenas $\alpha 1$ de tipo IV, localizada en láminas y membranas basales, sin formar fibras ni fibrillas y con funciones de filtrado y soporte y sintetizada por células epiteliales (28).

1.2.2 Fuentes de obtención

Las industrias obtienen el colágeno a partir de partes específicas de animales, la fuente de extracción de colágeno dependerá del tipo de colágeno que se desee, por lo que la forma de extracción varía; el colágeno tipo I se encuentra principalmente en la dermis, y es extraído de la piel del ganado bovino y porcino; también se extrae de la piel y de las espinas de los pescados, pero es menos utilizado; el tipo II, al ser uno de los principales componentes del cartílago, se extrae de cartílagos de pollo y tiburón, los otros tipos de colágeno se obtienen de diferentes partes de los animales, pero esencialmente de los animales ya antes mencionados (28).

El contenido de colágeno en los organismos marinos es menor que en los mamíferos, variando del 1 al 12% de la proteína y del 0.2 al 2.2% del peso del músculo (29) (31); la búsqueda de nuevas fuentes de colágeno hizo que los países asiáticos sean los pioneros en realizar métodos de extracción de colágeno; en Corea, se realizó una investigación sobre la posible obtención de colágeno de peces aguja (*Syngnathus*), donde se descubrió que tienen un alto contenido de colágeno, y la especie en si no se ve afectada por enfermedades peligrosas, también se despertó el interés en buscar nuevas alternativas para su obtención, debido al incremento de precio que ha sufrido el ganado bovino y porcino (28).

1.3. *Mustelus whitneyi*

1.3.1. Clasificación taxonómica

Reino: Animalia

Orden: Carchariniformes

Familia: Triakidae

Género: *Mustelus* (32)

Especie: *Mustelus whitneyi* Chirichigno, 1973

1.3.2. Ubicación taxonómica y descripción

Se encuentra ubicado sobre plataformas continentales a profundidades de 16-211m, frecuentemente entre los 70-100m; distribuido desde Panamá hasta Chile (33). *Mustelus whitneyi* es un tiburón costero, también conocido en el litoral peruano como Tollo prieto, piruche en Ecuador, musola prieta según la FAO.

Es un animal vivíparo, teniendo de 5 a 10 crías por camada, la talla de estos tiburones al nacer es de 25cm, adultos hembras entre 74-87cm, adultos machos de 68cm, se puede encontrar un tamaño máximo hasta 95cm longitud total (32).

Se caracterizan morfológicamente por su moderado tamaño (Fig.1), con ojos grandes horizontales ovalados, hocico moderadamente largo que forma una punta roma en vista lateral, pliegue labial superior largo, dientes pequeños y pavimentados con bordes no cortantes con cúspides; su dorso es de color gris sin manchas y lomo jorobado, posee dos aletas dorsales con bordes posteriores desnudos; la base de la primera dorsal muy delante de la base de las pélvicas, la segunda dorsal notoriamente

mayor que la aleta anal, aleta caudal sin lóbulo ventral bien desarrollada. (34) (32) (35).



Figura 1. Fotografía del tiburón *Mustelus whitneyi*. Fuente: Romero (35).

1.4. *Isurus oxyrinchus*

1.4.1. Clasificación taxonómica

Reino: Animalia

Orden: Lamniformes

Familia: Lamnidae

Género: *Isurus* (32)

Especie: *Isurus oxyrinchus* Rafinesque, 1809

1.4.2. Ubicación taxonómica y descripción

Este tiburón oceánico, pelágico; habita en aguas costeras en las plataformas continentales, como también en aguas poco profundas cercanas a la costa y en zonas epipelágicas en alta mar, con profundidades de 500m, distribuyéndose geográficamente en el pacífico oriental, como el Sur de California (EE.UU), Costa Rica, Panamá, Colombia, Ecuador, Perú y Chile (36).

Conocido también como tiburón Diamante, tiburón Bonito, Shortfin mako, Marrajo dientuso según la FAO, tiburón Marrajo en México, Tinto en Ecuador, Atlantic mako en Europa, Mackerel shark en Estados Unidos y Mako shark en Australia (37).

Este tiburón vivíparo aplacentado, puede tener de 2-4 crías por camada, su periodo de gestación es de 12 meses, su talla de nacimiento es de 70 a 80cm, la talla que alcanza a su madurez sexual en machos es de 195cm y hembras 280cm, pueden llegar a una longitud máxima de 400cm. (32).

Se caracteriza por ser una especie de tiburón grande (Fig. 2), hocico puntiagudo, la superficie ventral del hocico y alrededor de la boca es de color blanco, con cuerpo en forma de huso, bocas grandes con dientes angostos y largos, poseen bordes lisos con una sola cúspide, aletas pectorales más cortas que la longitud de la cabeza, primera dorsal alta, aleta anal pequeña que se origina por debajo del punto medio de la base de la segunda aleta dorsal, aleta caudal en forma de media luna, sin quillas secundarias en la base de la caudal (34).



Figura 2. Fotografía del tiburón *Isurus oxyrinchus*. Fuente: Romero (35).

1.5 Género *Aloe* L.

1.5.1. Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Liliales

Familia: *Liliaceae*

Género: *Aloe* L.

1.5.2. Ubicación taxonómica y descripción

Originaria de África, específicamente de la península de Arabia (8), esta planta también se encuentra distribuida en Estados Unidos, México, Bolivia, Ecuador, Perú, Jamaica y Puerto Rico según la base de datos Tropicos del Missouri Botanical Garden (38) (39). Su cultivo se da en zonas áridas y semiáridas (39).

La planta de *Aloe* se compone de raíz, tallo, hojas y flores en época de floración, el tallo crece desde el centro hacia arriba, las hojas crecen alrededor del tallo a nivel del suelo en forma de roseta, tienen formas lanceoladas y dentadas con pinchos, la estructura de las hojas está formada por el exocarpio o corteza, que está cubierta de una delgada cutícula; la corteza, de color verde o verde azulado representa aproximadamente 20 al 30% del peso de la planta; el parénquima, también conocido como pulpa o gel se localiza en la parte central de la hoja y representa del 65 al 80 % del peso total, entre la corteza y la pulpa están los conductos de aloína, una serie de canales longitudinales por donde circula la savia de la planta, conocida como acíbar (40), esta sustancia presenta un alto contenido de aloína (>28% en base húmeda) (41) (42), al florecer forma densos racimos de flores tubulares amarillas o rojas según la especie (41) (43).

El *Aloe* L. es una planta con alrededor de 360 especies diferentes, algunas de las especies más conocidas son: el *Aloe arborescens*, el *Aloe chinensis*, el *Aloe socotrinum* y el *Aloe ferox* (41) por su contenido de acíbar; aunque la especie más nombrada es *Aloe barbadensis* Miller, también llamada *Aloe vera* (L.)Burm. f. (44) o *Aloe curacao*, coloquialmente llamada sábila.

Entre estas especies también se encuentra el *Aloe maculata* la cual es utilizada en la industria cosmética por su gran cantidad de gel y propiedades medicinales (45).

El Instituto Internacional de *Aloe* que funciona en Texas (EEUU), es el único lugar donde se elabora un análisis con respecto a la composición de las diferentes especies de *Aloe*, además de ser uno de los mayores centros de cultivo del mundo que detecta la utilidad de las plantas de *Aloe*; para su estudio se utiliza H-NMR (Resonancia Magnética Nuclear) que determina los componentes presentes en el gel de *Aloe*, Tabla 1, que contiene más de 75 nutrientes y 200 componentes activos incluyendo 20 minerales, 18 aminoácidos y 12 vitaminas (46) (41) (43).

Químicamente el *Aloe* se caracteriza por la presencia de constituyentes fenólicos que son generalmente clasificados en dos principales grupos: las cromonas (aloensina) y las antraquinonas: libres y glicosiladas (barbaloina, isobarbaloina y aloemodina); que se encuentran en la capa interna de las células epidermales (47). Las antraquinonas

son los principales compuestos químicos que actúan directamente sobre los virus, impidiendo la adsorción del virus y su consecuente replicación (47) (41) (48) (49).

Tabla 1

Componentes químicos de la planta Aloe vera (Barbadosis Miller)

Composición	Compuestos
Antraquinonas	Ácido aloético, antranol, ácido cinámico, barbaloina, ácido crisofánico, emodina, aloemodina, éster de ácido cinámico, aloína, isobarbaloina, antraceno, resistamol.
Vitaminas	Ácido fólico, vitamina B1, colina, vitamina B2, vitamina C, vitamina B3, vitamina E, vitamina B6, betacaroteno.
Minerales	Calcio, magnesio, potasio, zinc, sodio, cobre, hierro, manganeso, fósforo, cromo.
Carbohidratos	Celulosa, galactosa, glucosa, xilosa, manosa, arabinosa, aldopentosa, glucomanosa, fructuosa, acemanano, sustancias péptida, L-ramnosa.
Enzimas	Amilasa, ciclooxidasas, carboxipeptidasas, lipasa, bradikinasas, catalasa, oxidasa, fosfatasa alcalina, ciclooxigenasa, superóxido dismutasa.
Lípidos y compuestos orgánicos	Esteroides (campesterol, colesterol, β -sitosterol), ácido salicílico, sorbato de potasio, triglicéridos, lignina, ácido úrico, saponinas, giberilinas, triterpenos.
Aminoácidos	Alanina, ácido aspártico, arginina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, tirosina, treonina, valina.

Nota. Adaptado de: Dagne y col., 2000; Choi y Chung; 2003; Ni y col., 2004; Hamman, 2008

1.6 *Aloe maculata*

1.6.1 Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Lilanae

Orden: Asparagales

Familia: Xanthorrhoeaceae

Género: *Aloe* L.

Especie: *Aloe maculata* All. (38)

1.6.2 Ubicación taxonómica y descripción

Esta planta es endémica de Sudáfrica, aunque como planta ornamental se cultiva en muchos países. Crece en lugares de clima cálido y árido además de ser fácil de mantener y cuidar (45). *Aloe maculata* crece de manera casi silvestre en nuestro país. También conocido como Pita real o *Aloe saponaria* (Fig. 3) posee hojas en roseta, anchas, muy carnosas, de 15 a 20 cm de largo, de color pardo rojizo o verde azulado con manchas blanco crema y bordes con espinas marrones, flores tubulares rojas, que se disponen en inflorescencias ramificadas y colgantes (50).

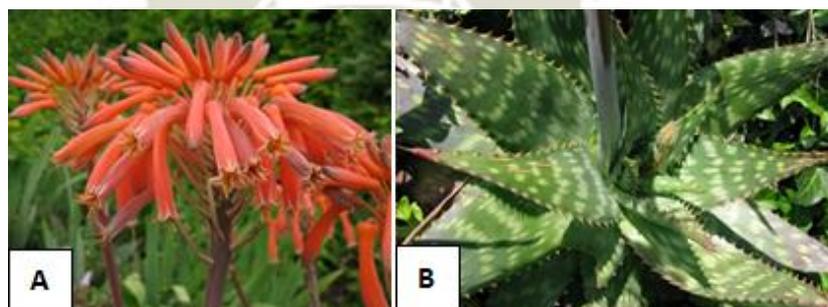


Figura 3. Planta de *Aloe maculata*. A) Flores, B) Hojas. Fuente: Propia

En la industria farmacéutica el uso comercial del gel de sábila es muy importante en cuanto a la fabricación de ungüentos tópicos, tabletas y capsulas; en la industria cosmética, el gel de sábila ha sido empleado como material de base para la

preparación de cremas, lociones, jabones, champús, cremas faciales y una amplia variedad de productos de tocador (51).

El gel de *Aloe maculata* se utiliza mucho en cosméticos por su gran cantidad de gel aunque a veces se la confunde con *Aloe zebrina*, pero esta posee las hojas más delgadas en la punta (50) .

Se ha demostrado que el extracto alcohólico de *Aloe maculata* puede ser usado como un alimento funcional y como medicamento para enfermedades con especies reactivas de oxígeno (ROS), además de su actividad antioxidante, antiinflamatoria y antinociceptiva (52).

Se aislaron polisacáridos neutros de la pulpa no dializada de *Aloe maculata* para evaluar su efecto en edemas inducidos por carragenina en ratas, donde se demostró que dichos polisacáridos inhiben el edema, además de la presencia de acemanano tipo 1 y 2 en el gel. (53).

1.7 *Urtica urens* L.

1.7.1 Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Rosanae

Orden: Rosales

Familia: Urticaceae

Género: *Urtica* L.

Especie: *Urtica urens* L.

1.7.2. Ubicación taxonómica y descripción

Esta planta es originaria de Europa y Asia, se encuentra ampliamente distribuida en el resto del mundo. *Urtica* L. (ortiga) pertenece a la familia de las Urticáceas, esta planta se presenta en zonas templadas y tropicales, formada por unas 2.000 especies,

la especie más difundida es la *Urtica dioica* L., aunque existen otras ortigas como la *Urtica pilulifera*, *Urtica membranacea* o *Urtica urens* (ortiga negra), otros nombres comunes que tiene esta planta son: Chordiga, ortiga, ortiga mayor, pringamoza (54).

Es una planta de tipo ruderal, por lo que su localización es bastante fácil, pues prefiere suelos ricos en nitrógeno y húmedos como corrales y huertos, creciendo habitual a lo largo de caminos, carriles, en el campo o en la montaña, desde los 200 a los 2400 m de altitud a nivel del mar (55).

Esta planta siempre verde, (Fig. 4); puede alcanzar 1 – 1,5 m de altura, las hojas son de figura ovalada, rugosas, aserradas, puntiagudas, y de hasta 15 cm, son color verde oscuro; en la hoja mayormente se encuentran minerales como nitrógeno, potasio, hierro, calcio, azufre, magnesio, aluminio, como también Clorofila a y b (2,5-3%) y carotenoides (beta-caroteno).

Los tallos y las hojas suelen estar armados de pelos urticantes o tricomas llenos de un líquido urticante que contiene ácidos orgánicos, histamina y acetilcolina, etc; estos pelos, terminados en glándulas, son muy frágiles en la punta, por lo que es suficiente el roce para provocar su ruptura y cuando se rompen, inyectan en la piel el líquido que contienen, induciendo una sensación de ardor (54).

Sus flores son muy pequeñas, verde amarillentas, recogidas en espigas dioicas, a veces monoicas: las masculinas de 2 - 3 mm de largo y las femeninas de 1,5 - 2 mm de largo; florece desde agosto hasta noviembre (56) (54) , también están provistas de los pelos urticantes.



Figura 4: Flores y hojas de la planta *Urtica urens* L. Fuente: Propia

La raíz es muy rica en taninos, que le confieren una acción astringente; el fruto es un aquenio aovado, marrón-amarillento, de 1-1,8 mm de longitud, con una sola semilla en su interior (55), usadas popularmente como galactagogo, astringente y el aceite, como emoliente; para aumentar la secreción de leche en lactantes (54).

Tabla 2

Composición química de la planta Urtica dioica L.

Composición	Compuestos
Flavonoides (0,7-1,8%) (Hojas)	Quercetol, kenferol, ramnetol, rutósido, isoquercitrina (0,02%), quercetrina, isoramnetina, kaenferol.
Sales minerales (20%) (Hojas)	Hierro, calcio, sílice, azufre, potasio, manganeso.
Ácidos orgánicos (Hojas)	Ácido caféico, ácido cafeil-málico, ácido clorogénico, ácido gálico, ácido fórmico, ácido acético.
Aminas (Pelos urticantes)	Acetilcolina, histamina, serotonina (5-hidroxitriptamina), ácido acético, ácido gálico, ácido fórmico, colina, leucotrienos (LTB ₄ , LTC ₄ y LTD ₄).
Taninos(Raíces)	Fitosteroles: beta-sitosterol (0,03-0,20%), ceramidas, fenilpropanos, lignanos, polifenoles, monoterpendioles
Polisacáridos	Glucanas, glucogalacturonanas, arabinogalactana, escopoletósido
Vitaminas	Especialmente ácido ascórbico, vitaminas del grupo B, vitamina K ₁ y provitaminas A,B,C y K.
Mucílagos(Semillas)	Escopoletósido, sitosterol.
Compuestos inorgánicos	Ácido silícico, potasio, silicio, nitrato
Otros	Provitamina A, proteínas, aceite (30%), ácido linoléico, tocoferoles, alcaloides (nicotina), esteroides (β -sitosterol).

Nota.Adaptado de: B, Frank; I, Bohn; B, Uehleke,; 2008; Schomakers, Bollbach, & Hagels, 1995; Tankred, 2011..

Se conoce que la planta de *Urtica urens* posee diversas propiedades debido a su composición química como se muestra en la Tabla 2.

Algunos autores como Font Quer (57) y Schauemberg (58) describen las sustancias que se encuentran en la ortiga: en primer lugar están la histamina y la acetilcolina que se concentran especialmente en los pelos de la planta (12).

Schauemberg (58) (59) señala el gran número de sustancias minerales como silicio, fierro, potasio, manganeso y cloro; otros autores también mencionan su efecto diurético, hemostático y anti anémico se debe en parte a la presencia de estas sustancias(59) (56). Estudios *in vitro* han dado a conocer sus propiedades antiinflamatorias (11), inmunomoduladoras y antioxidantes (60).

Esta planta según “naturistas” presenta muchísimas aplicaciones medicinales, como drenador hepático (61), diurético y eliminador de ácido úrico (55), además de astringente, hemostático, estimulante del sistema circulatorio; también empleada en afecciones de las vías urinarias, trastornos respiratorios (tos) y digestivos (colitis), reumatismo, gota, sangrado interno o externo; usada en aplicaciones locales o baños se emplea en dolores reumáticos, artritis, gota, neuralgias, hemorroides (pomada de ortiga), en uso externo, está indicada en afecciones cutáneas como acné, eczemas, es cicatrizante, útil en heridas, úlceras, etc. (12).

Por su acción hipoglucemiante es un antianémico coadyuvante en el tratamiento de la diabetes, estimulante de la actividad de las glándulas endócrinas y la producción de glóbulos rojos, así como un favorecedor de los intercambios metabólicos (54).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Lugar de investigación

El presente trabajo fue realizado entre los meses de Junio del 2014 hasta Setiembre del 2015 en la Universidad Católica de Santa María-Arequipa en el laboratorio de investigación docente de Medicina Humana (I-302), laboratorio de procesos (H-101), laboratorio de microbiología (H-403), laboratorio de investigación (H-405) y el laboratorio de la Facultad de Ciencias Alimentarias de la Universidad Nacional de San Agustín en la ciudad de Arequipa.

2.2 Materiales

2.2.1 Materia prima

Se utilizaron las pieles frescas obtenidas a partir del fileteo de las especies marinas: *Isurus oxyrinchus* (Diamante) y *Mustelus whitneyi* (Tollo) procedentes del terminal pesquero de Río Seco de la ciudad de Arequipa, departamento de Arequipa; las pieles se recolectaron manualmente alrededor de las 9:00 a.m. y se almacenaron a 4°C para su traslado al laboratorio de investigación, luego se procedió a la limpieza, lavado, trozado y almacenamiento a 4°C por un máximo de 48 horas.

Las especies vegetales fueron recolectadas en horas de la mañana en la provincia y departamento de Arequipa a 2500 m.s.n.m., *Aloe maculata* (latitud 16°24'37.88"S, longitud 71°32'6.44"O); *Urtica urens* (latitud 16°24'1.28"S, longitud 71°32'26.82"O), y fueron caracterizadas por el Instituto Científico Michael Owen Dillon (IMOD), sede Arequipa.

2.2.2 Material de vidrio

Baguetas

Cubreobjetos

Embudo Buchner

Equipo Soxhlet
Erlenmeyer 250 mL
Fiolas de 25 mL, 50 mL, 100 mL y 1000 mL.
Frascos de vidrio ámbar: 10 mL, 100 mL, 250 mL, 1000 mL.
Matraz de 100 mL, 250 mL y 500 mL.
Matraz Kitasato
Pipetas de 1mL, 5mL y 10 mL
Pipetas Pasteur
Placas Petri
Portaobjetos
Probetas de 50 mL, 100 mL y 500 mL
Sistema de Reflujo
Tubos con tapa rosca 160 x100
Tubos de ensayo 5x 10
Tubos de vidrio 110x100
Vasos de precipitados de 100 mL, 250 mL, 500mL, 1000 mL.

2.2.3 Equipos de laboratorio

Autoclave TUTTNAUER 1730M
Balanza analítica OHAUS PIONNER
Baño maría LAUDA AQUALine ALIZ
Bomba de vacío VACCUBRAND ME-2
Centrífuga EBAZO
Espectrofotómetro SCHIMADZU UV-VIS Model UV-1700
Estufa – incubadora JP.SELECTA 2000210
Incubadora de CO2 H.W.Kessel S.A
Incubadora esterilizadora de CO2 COMFORT
Liofilizador LABCONCO
Microcentrífuga refrigerada HETTICH
Microscopio binocular ZEISS
Microscopio de fluorescencia CARL ZEISS
Potenciómetro HELSAM
Refrigeradora COLDEX R-162

Ultrasonido JP. SELECTA

Vortex

2.2.4 Otros materiales

Adaptador

Asa de Kohle

Asa de platino

Bolsas de diálisis de 35 mm (1.4inch), 12 KDa

Cámara de electroforesis vertical y accesorios

Cocinilla eléctrica

Cronómetro

Cuchillo

Equipo de disección

Espátulas

Flask para cultivo celular 25 cm² CELLBIND Corning

Flask para cultivo celular 75 cm² CELLBIND Corning

Fósforo

Fuente de poder

Gradilla de tubos de ensayo

Hojas de bisturí

Mangueras

Mechero Bunsen

Micropipetas 0.5-10 ul, 5-50 ul, 100-200 ul

Pabilo

Papel filtro

Papel indicador

Papel Kraft

Pinzas metálicas

Placas de cultivo celular 12 pocillos para cultivo adherente

Placas de cultivo celular 6 pocillos para cultivo adherente

Placas Petri de 100 mm para cultivo adherente

Plumón marcador

Propipeta

Puntas de pipeta
Regla
Soporte universal
Tabla de picar
Tapers de 250 ml
Taponés de algodón y gasa
Tijeras
Tips
Tubos eppendorf
Tubos falcon

2.2.5 Medios de cultivo y suplementos

Agar nutritivo
Agar Sabouraud
Agar soya tripticasa
Buffer fosfato salino PBS
Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)
Sigma Aldrich Co.
Penicilina- Estreptomina 10000 UI de Sigma Aldrich Co.
Solución de Tripsina-EDTA 0.25% de Sigma Aldrich Co.
Suero Bovino Fetal (FBS) de Gibco Co.
Suero fisiológico

2.2.6 Reactivos

Acetato de Sodio JT BAKER
Ácido acético p.a JT BAKER
Ácido clorhídrico p.aMERCK
Ácido fosfórico p.a. MERCK
Acrilamida mix (Acrilamida 30%/ Bis- acrilamida 0.8%)
Alanina p. a. MERCK
Azul de bromofenol 0.5%
Azul de comassi
Buffer de Electroforesis (Tris/Glicina 10X, SDS 20%)

Butanol p.a JT BAKER
Cloroformo p.a. MERCK
Cloruro de sodio JT BAKER
Etanol 99% PERUQUIM
Fenolftaleína
Glicerol
Hidróxido de potasio p.a JT BAKER
Hidróxido de sodio p.a JT BAKER
Hidroxiprolina MERK
Marcador estándar de peso molecular
Metanol 100%
Persulfato de amonio 10% (APS)
SDS 10 y 20%
Sulfato de Sodio Anhidro JT BAKER
TEMED
Tiosulfato de Sodio p.a JT BAKER
Tolueno JT BAKER
Tris 1.0M pH 6.8
Tris 1.5M pH 8.8
 β -mercaptoetanol
p-dimetilaminobenzaldehido MERK
2-metoxietanol MERCK

2.3 Metodología

2.3.1 Extracción de colágeno a partir de la piel de las especies marinas

Mustelus whitneyi e *Isurus oxyrinchus*

2.3.1.1 Acondicionamiento de las muestras

Se lavaron las pieles y retiraron los residuos de pulpa adheridas estas, finalmente fueron cortadas en trozos de 1cm^2 y almacenadas a 4°C hasta su uso, por un periodo máximo de una semana.

2.3.1.2 Eliminación de proteína no colagenosas

Se eliminaron las proteínas no colagenosas sometiendo las muestras a un tratamiento de hidrolisis con NaOH 0.3M por un periodo de 3 horas a 4°C. Se determinó el contenido de proteínas totales de la solución mediante el método de Bradford, se utilizó un patrón de albumina de suero bovino (0.5 mg/mL). Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 595 nm.

2.3.1.3 Solubilización de colágeno

Las pieles trozadas fueron colocadas en una solución de ácido acético 0.5 M por un periodo de 3-5 días a 4°C. Finalizado este tiempo se filtró la solución y cuantificó el contenido de colágeno empleando el método descrito por Woessner ANEXO 1. Para determinar el contenido de colágeno se tomó como indicador al contenido de hidroxiprolina; se elaboró una curva de calibración empleando hidroxiprolina como reactivo patrón, Tabla 3, la lectura se realizó a 560nm.

Tabla 3

Método de determinación de Hidroxiprolina- Woessner

Tubos	Concentración (ug/mL) ¹	Alícuotas (mL)	H ₂ O (mL)
1	36	1	10
2	18	0.5	10
3	9	0.25	10
4	4,5	0.125	10
5*	H ₂ O		

Nota. Valores usados para la curva de calibración

¹ Patrón de Hidroxiprolina: 36 mg. de Hidroxiprolina/100mL H₂O

*Solución blanco

2.3.1.4 Precipitación de colágeno

El colágeno se precipitó con cloruro de sodio hasta una concentración de 1.56 M en agitación constante en un sistema de jarras a 100 rpm, la solución precipitada se filtró y re disolvió en ácido acético a 0.5M. Finalmente se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos y se conservó el sobrenadante, se volvió a re disolver en hidróxido de sodio al 0.5M.

2.3.1.5 Diálisis

El sobrenadante obtenido en la etapa anterior se colocó en bolsas de diálisis con tamaño de poro (12KDa, 35µm), estas fueron colocadas en un medio de agua destilada por un promedio de 7 días; una vez finalizada esta etapa, se liofilizó el colágeno en condiciones de 0.280 mBar a 45°C en un liofilizador Batch en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Alimentarias de la Universidad Nacional de San Agustín.

2.3.2 Caracterización del colágeno según sus propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y moleculares

Se caracterizó el colágeno de acuerdo a lo establecido en la Norma Técnica Colombiana NTC 3750 (ICONTEC) (2), la caracterización molecular del colágeno se realizó empleando el método de electroforesis.

2.3.2.1 Caracterización fisicoquímica

Se evaluaron el pH, contenido de sólidos totales (Método de la AOAC Internacional, 950.46.1998), contenido de grasas totales (Método gravimétrico NTP 209.263.2001) y el contenido de hidroxiprolina, de acuerdo a los requisitos comprendidos en la Norma Técnica Colombiana 3750, los mismos que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Requisitos fisicoquímicos para el colágeno soluble según el ICONTEC.

Requisitos	Valor+
pH	3-4
Contenido de sólidos (%)	5*
Hidroxiprolina (%)	0,134

Nota. Adaptado de la Norma Técnica Colombiana NTC 3750

+ Valores mínimos

* Valores máximos

2.3.2.2 Caracterización microbiológica

Se determinó la presencia de microorganismos como bacterias mesófilas, hongos y bacterias patógenas empleando los medios de cultivo: nutritivo, agar soya tripticasa y agar sabouraud. Todos los análisis se realizaron por triplicado de acuerdo a los requisitos comprendidos en la NTC3750, los mismos que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Requisitos Microbiológicos para el colágeno soluble según el ICONTEC

Requisitos	Valor
Recuento total de mesófilos	< 100 UFC/g
Microorganismos patógenos	Ausentes
Hongos y levaduras	< 10 UFC/g

Nota. Adaptado de la Norma Técnica Colombiana NTC 3750

2.3.2.3 Caracterización molecular

Se evaluó la organización molecular del colágeno por medio de una electroforesis SDS–PAGE siguiendo el método de Laemmli ,1970; empleando un sistema discontinuo de gel de poliacrilamida con una concentración de 7.5% para el gel separador y 4% para el gel concentrador, la corrida utilizó un voltaje de 20mV durante 2 horas y se reveló el gel con una

solución de azul de Comassie R-250, ácido acético e isopropanol durante toda la noche, se destiñó con una solución de metanol 40%(v/v), ácido acético 10% (v/v) y agua desionizada 50 % (v/v); se empleó el marcador de peso molecular See Blue Plus Prestained Standard (Invitrogen) y se evaluaron las características de las bandas formadas para determinar el tipo de colágeno presente en las muestras.

2.3.3 Determinación del rendimiento de colágeno

Los resultados de la cuantificación de hidroxiprolina son empleados como indicador de la presencia de colágeno. Se determinó el contenido total de proteínas de las pieles empleando el método de Kjeldahl, se calculó el rendimiento de colágeno en peso seco en relación al contenido de proteínas totales de las cubiertas, el contenido de proteínas no colagenosas eliminadas y la cantidad de colágeno obtenido al finalizar la extracción.

Para determinar el contenido de colágeno se emplearon las formulas 1 y 2.

$$\% \text{ Colágeno} = 5,5 \times \% \text{ Nitrógeno} \dots\dots\dots \text{Formula 1}$$

$$\% \text{ Colágeno} = 7,46 \times \% \text{ de hidroxiprolina} \dots\dots\dots \text{Formula 2}$$

2.3.4 Preparación de extractos de *Aloe maculata* y *Urtica urens* y determinación del contenido de polisacáridos totales

Para la preparación del extracto de *Aloe maculata* se seleccionaron las hojas de la parte inferior de la planta, cortando los bordes y colocándolas en un pocillo con abundante agua por 24 horas para la eliminación de yodo existente, posteriormente se retiró la epidermis y licuó el parénquima, se filtró y tomó una alícuota para el análisis de polisacáridos, se almacenó por no más de 48 horas a 4° C hasta su uso.

En la preparación del extracto de *Urtica urens* se seleccionaron las partes aéreas de la planta, lavándolas vigorosamente para la

eliminación de los pelos urticantes y polvo residual; las hojas fueron licuadas con 5ml de agua, se filtró y tomó una alícuota para el análisis de polisacáridos, se almacenó a 4°C por un máximo de 48 horas hasta su uso.

Se empleó el método de fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois (62) para analizar el contenido total de polisacáridos de ambos extractos, se utilizó glucosa como reactivo patrón.

2.3.5 Determinación del efecto del biopolímero diseñado a base de: colágeno y extractos de *Aloe maculata*, *Urtica urens* sobre la proliferación de fibroblastos *in vitro*.

2.3.5.1 Diseño del biopolímero

Se trabajó en base a un diseño factorial multinivel, teniendo como factores: a los componentes del biopolímero (colágeno, *Aloe maculata* y *Urtica urens*) y concentraciones de estos como se muestra en la Tabla 6.

Para la formación de los biopolímeros se mezclaron los componentes (colágeno, extractos de *Aloe maculata* y *Urtica urens*) en placas de polipropileno, posteriormente estas placas fueron colocadas en una incubadora a 30 °C hasta la formación de membranas.

El análisis estadístico se realizará un diagrama de Pareto, Anova factorial, un análisis de efectos principales y de interacciones y interacciones de superficie de respuesta.

Tabla 6

Diseño del biopolímero formado por colágeno, Aloe maculata y Urtica urens

Colágeno(mg)	<i>Aloe maculata</i> (ml)	<i>Urtica urens</i> (ml)
10	0.5	0.5
10	0.5	1
10	0.5	2
10	0.5	4
10	1	0.5
10	1	1
10	1	2
10	1	4
10	2	0.5
10	2	1
10	2	2
10	2	4
10	4	0.5
10	4	1
10	4	2
10	4	4
20	0.5	0.5
20	0.5	1
20	0.5	2
20	0.5	4
20	1	0.5
20	1	1
20	1	2
20	1	4
20	2	0.5
20	2	1
20	2	2
20	2	4
20	4	0.5
20	4	1
20	4	2
20	4	4

2.3.5.2 Cultivo y viabilidad de fibroblastos e presencia de los biopolímeros

Se trabajó con una línea celular de fibroblastos dermales humanos, las células fueron cultivadas en matraces de cultivo tisular de 25cm² con un medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (FCS) al 10%, L-glutamina 4mM, estreptomina (100 µg/ml), penicilina (100 U/ml), gentamicina (30 µg/ml), fungizona (2 µg/ml), el cultivo se llevó a cabo en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y 95% de aire, el análisis se realizó en el tercer pase de células, considerando 20,000 células en cada pase.

Se realizó un recuento celular de los fibroblastos cultivados procedentes de un matraz de cultivo tisular de 25cm² con azul de tripán empleando la cámara de Neubauer.

Se centrifugaron las células a 1000 rpm durante 4 minutos, luego se re suspendió en medio fresco con FCS al 10%. Posteriormente se hicieron pases de 20 000células por pocillo, y se incubó a 37 °C en una atmósfera de 5% CO₂ y 95% de aire, se mantuvo como control la placa de cultivo sin el biopolímero.

Se evaluó el efecto del biopolímero sobre la proliferación de fibroblastos mediante el método de bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2il)-2,5- difeniltetrazolio) (MTT) para evaluar viabilidad celular por colorimetria. El análisis se realizó a las 24 horas de realizado el cultivo, para lo cual se agregó 100 µl de medio de cultivo y 100 µl de disolución acuosa de MTT (5 mg/ml) a cada uno de los pocillos, luego se procedió a incubar las muestras a 37°C durante 4 horas, pasado este tiempo se

retiró el sobrenadante y se agregó 200 ul. dimetil sulfóxido (DMSO) enrazando con suero fisiológico hasta 2.5ml.

Se midió la absorbancia de las muestras a 570 nm y se evaluaron los resultados según el porcentaje de viabilidad.



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se analizó y discutió los resultados obtenidos con el propósito de comprobar la hipótesis de la investigación que apunta a la evaluación del efecto de biopolímeros, en base colágeno obtenido de especies marinas y extractos de *Aloe maculata* y *Urtica urens* sobre la proliferación de fibroblastos cultivados *in vitro*, lo que indicaría su potencial para la regeneración celular.

3.1. Extracción de colágeno a partir de la piel de las especies marinas *Mustelus whitneyi* e *Isurus oxyrinchus*

3.1.1. Acondicionamiento de las muestras

La limpieza y el tamaño de corte de las pieles es un factor muy importante que determina la efectividad del proceso de extracción de colágeno; en la (Fig. 5) se muestra los pasos que siguieron las pieles antes del proceso de extracción, se eliminó todo resto de carne presente en las pieles para disminuir la contaminación por otras proteínas; luego fueron cortadas a un tamaño de 1cm^2 , debido a que trozos mayores de piel pueden limitar la acción de las soluciones durante el proceso de extracción y trozos menores son susceptibles a destruirse con mayor facilidad lo que dificulta el proceso de extracción (1).

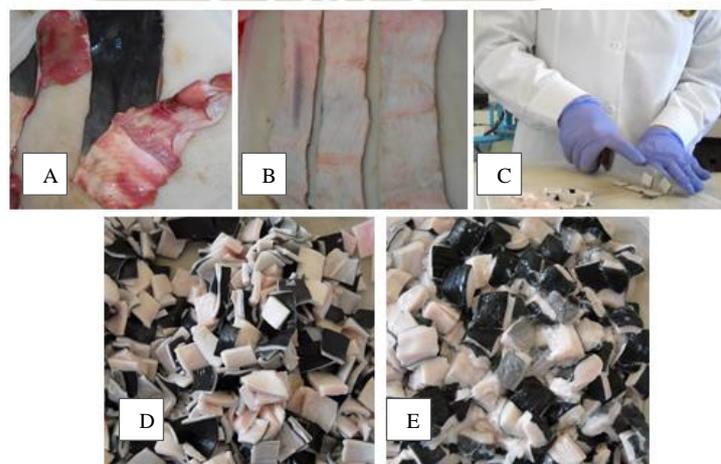


Figura 5. Acondicionamiento de las pieles. A) Recepción de las pieles B) Eliminación de carne y otros restos C) Corte de las pieles de 1cm^2 D) *I. Oxyrinchus* E) *M. whitneyi*. Fuente: Propia

El método empleado en la presente investigación es una variante del método descrito por Nagai y Suzuki (1), los que describen un método de extracción en 8 etapas: eliminación de la grasa con alcohol, solubilización en medio ácido y procesos de centrifugación, precipitación salina, centrifugación, redisolución de la proteína, diálisis en medio ácido y por último liofilización; en comparación al método propuesto por estos investigadores nuestro método consistió de 5 etapas: eliminación de proteína no colagenosa, solubilización de colágeno, precipitación salina, diálisis y liofilización, las mismas que se detallan en capítulo III.

En nuestra adaptación al método propuesto por Nagai y Suzuki (1), incluimos la etapa de eliminación de proteínas no colágenas y eliminamos las etapas de centrifugación y eliminación de grasas, porque el contenido de grasas en las pieles de *I. oxyrinchus* y *M. whitneyi* es menor al 0.1 ± 0.05 %, comparándolas con los estudios de Serrano (63) y Zhang (5) que reportan un alto contenido en grasas de las pieles de Tilapia (43.83 ± 8.96 %), Cachama (82.60 ± 10.31 %) y Carpa plateada (4.41 ± 0.12 %).

Zhang (5) y Serrano (63) utilizan el blanqueamiento o decoloración de las pieles como etapa necesaria para la extracción de colágeno, este tratamiento facilita la obtención de colágeno incoloro, en pruebas previas que realizamos determinamos que esta etapa no era necesaria debido a que las especies de *I. oxyrinchus* y *M. whitneyi* no se despigmentan durante la extracción y no resulta ser un interferente en la extracción.

3.1.2. Eliminación de proteínas no colagenosas

El término “no colagenosas” hace referencia a todas las proteínas diferentes del colágeno que se hallan en las pieles de *I. oxyrinchus* y *M. whitneyi*, se eliminaron estas proteínas mediante hidrólisis básica con NaOH 0.3M, la (Fig. 6) se muestra las pieles en un medio de hidróxido de sodio, la apariencia de estas soluciones es opaca debido al tiempo de exposición de la pieles con la solución lo que genera la desnaturalización de las proteínas no colagenosas.



Figura 6. Hidrolisis alcalina de las pieles A) *I. Oxyrinchus* y B) *Mustelus whitneyi* .
Fuente: Propia

Serrano (63) hace referencia a la naturaleza irritante del hidróxido de sodio y su acción al entrar en contacto con las proteínas de los tejidos vivos, la cual produce la ruptura de las estructuras de las proteínas por efectos de hidrólisis. Luego de la hidrólisis los aminoácidos y péptidos más pequeños se liberan al medio acuoso, pero al ser una base fuerte podría así mismo hidrolizar la molécula de colágeno a pesar de ser una molécula fibrosa y resistente, por esta razón no se emplearon temperaturas altas ni concentraciones mayores de reactivo.

En general las proteínas aumentan su solubilidad a concentraciones salinas bajas (64), se tuvo como referente esta propiedad para poder solubilizar las proteínas no deseadas que se liberan al medio, el cual se eliminó para continuar con las siguientes fases de extracción.

3.1.3. Solubilización de colágeno

Para la extracción de colágeno, se utilizó la metodología descrita por Nagai y Susuki (1) con algunas modificaciones, para solubilizar el colágeno de las pieles se empleó una solución de ácido acético a 0.5M por un periodo de 3-5 días a 4°C.

Se empleó una concentración de ácido acético 0.5M, debido a que numerosos autores indican que este es el mejor agente para solubilizar el colágeno (1) (65) (66).

La solubilización en medio ácido constituye la etapa más importante de la extracción debido a que se determina el rendimiento del proceso de extracción, es posible emplear una mezcla de pepsina (67) y ácido

acético, sin embargo el ácido acético es más utilizado ya que en lugar de hidrolizar este solubiliza al colágeno permitiendo que se mantenga más estable. Este paso depende del objetivo de la investigación.



Figura 7. Disolución del colágeno presente en las pieles de: A) *I. Oxyrinchus*, B) *M. whitneyi*. en solución de ácido acético Fuente: Propia

En la (Fig. 7) se puede observar que las pieles durante la extracción experimentan un incremento en volumen, esto se debe a la pérdida de la estructura secundaria de las fibras de colágeno que se hinchan por la intromisión de las moléculas de ácido acético (30).

Luego de este periodo fue necesaria una filtración y centrifugación para eliminar los trozos y restos de pieles presentes en el medio.

3.1.4. Precipitación de proteínas

La precipitación salina o salting out permitió purificar la proteína de colágeno soluble en la solución de ácido acético (Fig. 8A).

La precipitación se debe a que las cargas iónicas del cloruro de sodio forman agregados causantes de la precipitación.

Se empleó cloruro de sodio a una concentración 1.56M para ambas especies; Shanmuganathan (67) quien extrae colágeno de tiburón lechoso emplea 0.9M de cloruro de sodio, mientras que Torres (68) precipita el colágeno de calamar gigante hasta llegar a una concentración final de 2M, según lo reportado en otras investigaciones, se necesitan concentraciones mucho más altas hasta de 2.6 M de cloruro de sodio (66). Esta diferencia de concentraciones

se debe en primer caso al tipo de especie con la que se trabaja y la metodología empleada.

Para que la precipitación sea homogénea se usó el sistema de jarras (Fig. 8B), en la (Fig. 8C) se observa colágeno precipitado enredado en la hélice; finalmente se filtró la solución formando una masa (Fig. 8D).

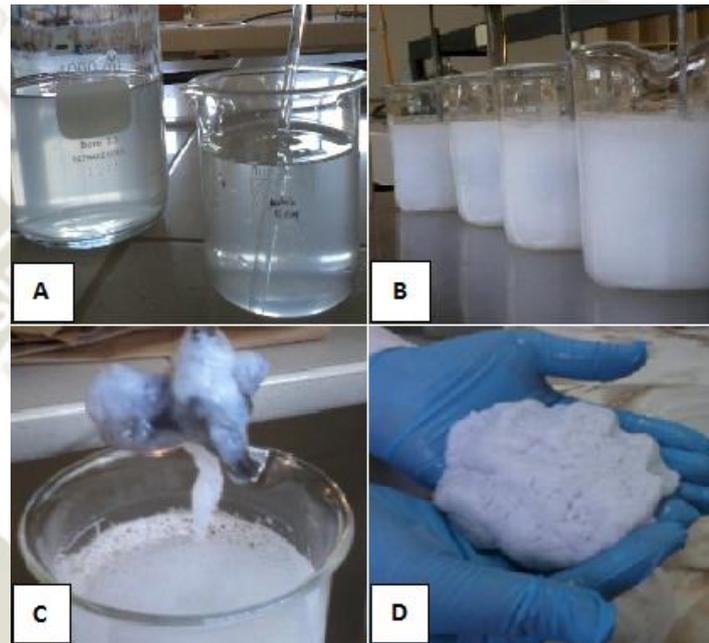


Figura 8. Proceso de precipitación del colágeno soluble mediante saturación con NaCl (Salting out). A) Colágeno soluble en ácido acético. B) Mezcla de NaCl con colágeno empleando un sistema de jarras. C) Colágeno precipitado, D) Colágeno filtrado. Fuente: Propia

La masa de colágeno se re disolvió y centrifugó a 10 000rpm para eliminar partículas restantes. Se obtuvo una solución transparente de colágeno disuelto en hidróxido de sodio al 0.5M. (Fig. 9).

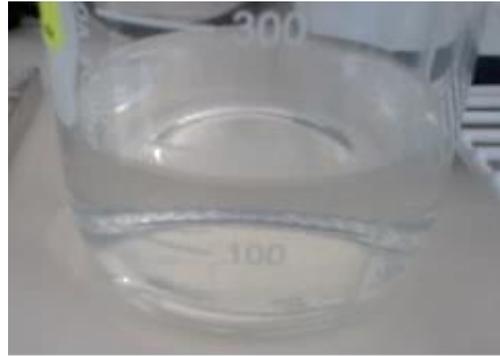


Figura 9. Solución de colágeno re disuelto. Fuente: Propia

3.1.5. Diálisis

Como última etapa se colocó el colágeno en membranas de diálisis (12-14000Da) de 15cm de longitud (Fig. 10 A), durante 7 días en un medio de agua destilada; esta etapa nos permite eliminar los iones de cloruro y sodio que se encuentran en la muestra (63). Luego de 7 días se liofilizó el colágeno a 0.280 mBar, -45°C y se almacenó hasta su uso.



Figura 10. Diálisis de colágeno. A) Solución de colágeno en membranas de diálisis. B) Liofilizador. C) Colágeno solido liofilizado. Fuente: Propia

3.2. Caracterización de colágeno según sus propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y moleculares

La caracterización de colágeno se realizó siguiendo los estándares establecidos en la NTC 3750 (2), la cual indica los requisitos que debe cumplir el colágeno para fines cosméticos, aunque el fin de esta investigación no es la producción de colágeno para la industria cosmética, se vio por conveniente el uso de NTC 3750 (2), por no existir ninguna normativa nacional al respecto.

3.2.1. Caracterización fisicoquímica

La NTC 3750 sugiere valores de pH entre 3-4 para el colágeno; el reglamento de alimentos de EEUU menciona que el colágeno obtenido por procesamiento alcalino presenta un punto isoeléctrico de entre 4.6 y 5.2 pH mientras que un procesamiento ácido presenta un punto isoeléctrico de entre 7 y 9 pH.

Los valores de pH Tabla 7, que presenta el colágeno extraído son similares a otros productos del mercado, como el colágeno hidrolizado de pescado (HFC) producido por la empresa Norland Products Hydrolysed, su producto contiene un alto porcentaje de proteínas y valores de pH de 4.0-6.5; así mismo la marca Henan Boom Gelatin Co., Ltd. produce colágeno a partir de escamas y piel de pescado el valor de pH es de 6.28. Aunque estos productos están destinados a la industria alimentaria y/o cosmética, no cumplen los requisitos necesarios para su certificación en el uso médico.

Tabla 7

Análisis fisicoquímico de colágeno extraído de I. oxyrinchus y M. whitneyi.

	<i>Mustelus whitneyi</i>	<i>Isurus oxyrinchus</i>	Valor requerido NTC 3750
pH	4.0	3.7	3-4
Contenido de hidroxiprolina (µg/ml)	0.561	0.361	0.134*
Colágeno soluble	26.4	32.1	1*

Fuente: NTC 3750. *Valores mínimos

Se observa que existe diferencia entre el contenido de hidroxiprolina de *M. whitneyi* 0.561 $\mu\text{g} / \text{ml}$. y *I. oxyrinchus* 0.361 $\mu\text{g}/\text{ml}$; esto debido a que el contenido de hidroxiprolina varía con las especies, el medio ambiente y la temperatura corporal de los peces (69). Esta variación tiene una gran influencia en la estabilidad térmica del colágeno (62).

Las moléculas de colágeno ricas en prolina e hidroxiprolina tienden a participar en la formación de zonas de unión que se estabilizan por enlaces de hidrógeno (Johnston-Banks, 1990). Los anillos de pirrolidina, prolina e hidroxiprolina imponen restricciones a la conformación de la cadena de polipéptido y ayudan a fortalecer la triple hélice (Wong, 1989) dando mayor estabilidad a la molécula. Según los resultados se puede determinar que el colágeno obtenido de la piel de *M. whitneyi* es térmicamente más estable que la cubierta de *I. oxyrinchus*.

3.2.2. Caracterización microbiológica

Se determinó la presencia de mesófilos empleando un medio soya tripticasa; el crecimiento de hongos y levaduras utilizando un medio Sabourau y el crecimiento de enterobacterias se usó el medio nutritivo, se evaluó el crecimiento a las 24 y 48 horas, el mismo que fue negativo para todos los casos; en nuestra investigación el recuento total de mesófilos obtuvo un valor mínimo Tabla 8, al que se señala en la NTC 3750 que es de $<100 \text{ UFC}/\text{g}$.

En el caso de hongos y levaduras el requerimiento es de $< 10 \text{ UFC}/\text{g}$, los resultados de esta investigación se encuentran entre los límites de los requisitos de NTC 3750.

Tabla 8

Análisis microbiológico de colágeno extraído de M. whitneyi e I. oxyrinchus.

Requisitos	<i>Mustelus whitneyi</i>	<i>Isurus oxyrinchus</i>
Recuento total de mesófilos	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g
Microorganismo patógenos	Ausente	Ausente
Hongos y levaduras	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g

3.2.3. Caracterización molecular

Esta etapa fue necesaria porque nos permitió verificar el tipo de colágeno extraído y comprobar su peso molecular.

Mediante el método de electroforesis de SDS nos ayuda a confirmar que el material extraído es colágeno debido a la presencia de las cadenas α que se encuentran presentes en el colágeno de tipo I, se ha encontrado que existe muchas variantes de la cadena α en colágeno extraído de cubiertas de especies marinas, las cuales son designadas como $\alpha 1$ y $\alpha 2$. En la (Fig. 11) se muestra el gel con la corrida de las muestras, observamos en la primera fila el patrón molecular (P), seguido de las de *M. whitneyi* (A) e *I. oxyrinchus* (B).

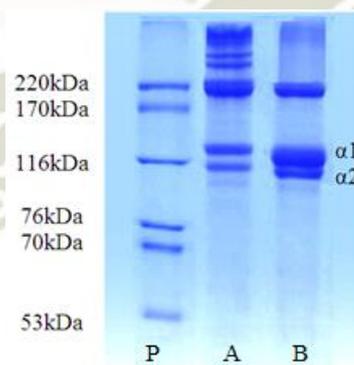


Figura 11. Gel de electroforesis en SDS-poliacrilamida de colágeno. P: patrón, A: *M. whitneyi*, B: *I. oxyrinchus*.

Si bien es cierto que el colágeno está constituido por tres cadenas polipeptídicas (α) con pesos moleculares cercanos a los 100 kDa (70), en la (Fig.11) se observa bandas ubicadas a 220 kDa, Badii y Howell

(71) reportaron que dos cadenas α pueden estar unidas entre sí por medio de entrecruzamiento intramolecular formando así lo que se conoce como una cadena β (72) (73) (74) (75), Mocan, et al. (74) atribuye que el colágeno tipo I es trimérico $[(\alpha 1)2\beta 2]$ y que presenta 3 cadenas, 2 de ellas son conocidas como cadenas alfa y otra de mayor peso molecular la cual correspondería a la cadena β .

Parenteau-Bareil, et. al., (75) indica que la fórmula molecular de colágeno tipo I es $[\alpha 1(I)]2\alpha 2(I)$ y que su forma polimerizada son fibras; esto nos permitiría concluir que la presencia de las dos bandas cercanas a los 116 kDa corresponden a las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$.

No se observa mayor diferencia con respecto al peso molecular de las bandas obtenidas en la corrida electroforética, en base a esto, los resultados sustentan que el colágeno presente en las pieles de *M. whitneyi* e *I. oxyrinchus* corresponden a colágeno de tipo I, sin embargo en la muestra *M. whitneyi* se observa bandas superiores a 220 kDa es un indicativo de que hubo presencia de otras proteínas lo cual es un indicativo que se debería mejorar la fase de purificación para *M. whitneyi*.

La presencia de colágeno de tipo I en especies marinas también fue reportada por otros autores que trabajaron con: Merluza, Trucha (76), Perca del Nilo (77) Pargo patudo (78), tentáculos de calamar gigante (68), túnica de Calamar y escamas de Dorada (79) como en otras especies investigadas por Zhang, et al., (80) y Zeng, et. al (81).

3.3. Determinación del rendimiento de colágeno

Para determinar el rendimiento de colágeno se empleó el método de hidroxiprolina, la hidroxiprolina es el aminoácido más importante presente en el colágeno, está envuelta en enlaces hidrógeno que estabiliza la estructura de la triple hélice de colágeno, el contenido de hidroxiprolina varía de acuerdo a la naturaleza de la fuente y del tipo de hábitat en el que se desarrolló (77).

Los resultados de la cuantificación del contenido de hidroxiprolina indican que se obtuvo $0.561 \mu\text{g} /\text{mL}$ para *M. Whitneyi* y $0.361 \mu\text{g} /\text{mL}$ para *I. oxyrinchus*, debido a que no existen investigaciones relacionadas a estas especies se vio necesario comparar los resultados con otras fuentes de colágeno; Gómez (30) obtuvo $0.4383 \mu\text{g}/\text{mL}$ de hidroxiprolina a partir de tendón bovino, con lo que se comprueba que las pieles de estas especies son otra fuente alternativa para la extracción de colágeno de las ya mencionadas; asimismo se obtienen valores similares a los reportados por Gómez (30), sin embargo Mosquera (79) y Ribgy (69) mencionan que los contenidos de hidroxiprolina varían según la especie, temperatura del cuerpo del animal y el ambiente.

Una vez obtenidos los valores de hidroxiprolina se procedió a cuantificar el rendimiento de colágeno en base seca como se muestra en la Tabla 7, la piel de *I. oxyrinchus* presentó un mayor rendimiento con $32.1 \pm 1\%$ en comparación a la piel de *M. whitneyi* cuyo rendimiento es $24.6 \pm 1.3\%$.

En la actualidad aún no se han realizado investigaciones con las especies de *I. oxyrinchus* y *M. whitneyi* sin embargo existen trabajos que reportaron rendimientos de colágeno extraído de las cubiertas de especies marinas como: Tilapia del Nilo 39,4 % (81), Carpa común 41,3 % (65), Carpa herbívora 19,3% (82).

Los resultados mostrados por Nagai y Suzuki (1) indican que el rendimiento de la piel de pescado es superior al rendimiento encontrado en huesos y aletas, estas diferencias se pueden dar según la metodología de extracción, el tiempo de extracción, las distintas especies, edad, tipo entre otros, etc. (79).

3.4. Preparación de extractos de *Aloe maculata* y *Urtica urens* y determinación del contenido de polisacáridos totales

La selección de las plantas es importante para determinar la cantidad de polisacáridos presentes, para el *A. maculata* se escogieron hojas medianas y carnosas; para el caso de *U. urens* los naturistas aconsejan recolectar las sumidades floridas (rama con flores o botones florales de las plantas) o

simplemente hojas de los tallos jóvenes, menciona que no se deberán de utilizar hojas viejas porque son más irritantes por el contenido de histamina y acetilcolina presente en los pelos urticantes, Ciriza ,2007 (83).

Para determinar el contenido de polisacáridos en los jugos de *A. maculata* y *U. urens*. se elaboró una curva de calibración (Fig.12), empleando como patrón una solución de glucosa obteniéndose una ecuación lineal ($y = 1.0314x + 0.151$) con valor de $R^2 = 0.9985$.

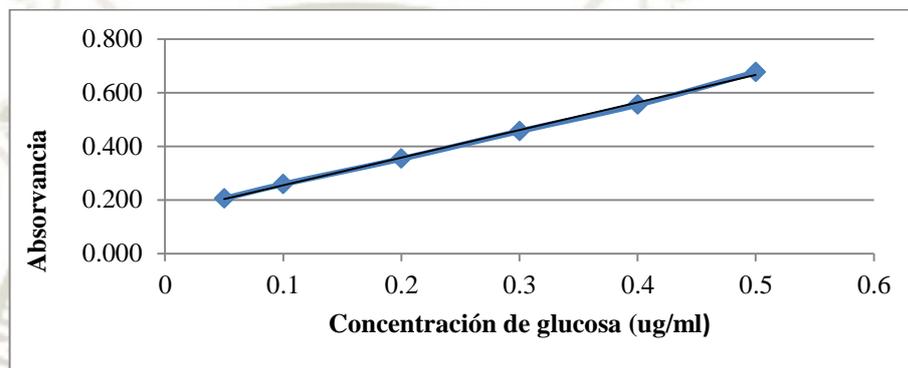


Figura 12. Curva de calibración para la determinación de polisacáridos. (Ensayo fenol-ácido sulfúrico)

Los valores de polisacáridos obtenidos para ambas plantas se muestran en la Tabla 9; siendo el contenido de polisacáridos presente en el extracto de *A. maculata* de 0.287 ± 0.068 mg/ml y del extracto de *U. urens* 0.242 ± 0.079 mg/ml.

Tabla 9
Contenido de polisacáridos (mg/ml.) de extractos de Aloe maculata y Urtica urens

	<i>Aloe maculata</i>	<i>Urtica urens</i>
R1	0.263	0.209
R2	0.351	0.206
R3	0.277	0.238
R4	0.259	0.314
Promedio	0.287 ± 0.068	0.242 ± 0.079
Desviación Estándar	0.043	0.050

De acuerdo a los resultados mostrados no se observa alguna diferencia entre el promedio del contenido de polisacáridos, sin embargo se realizó una prueba t-student para verificar si existe diferencia significativa en el contenido de polisacáridos de ambos extractos, la prueba reportó un valor-P de 0.217688 ($p > 0.05$) indicando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre el promedio de las concentraciones de polisacáridos encontrados en *A. maculata* y *U. urens*, con un nivel de confianza del 95.0%.

A pesar de no haber diferencia significativa entre el contenido de polisacáridos, si existe una diferencia en cuanto al tipo de polisacáridos que presenta cada planta.

La porción activa del gel de aloe está concentrada en: glucomanos, polímeros de hexosas como glucosa, manosa, y en otros tipos de polisacáridos conteniendo galactosa, ácido glucurónico y derivados acetilados de los mismos (84) (85).

La composición del gel de Aloe vera ha demostrado poseer actividades biológicas como: la actividad antiviral, antibacteriana, laxante, de protección frente a la radiación, antiinflamatoria e inmunoestimuladora. Todas estas propiedades han sido relacionadas a los principales polisacáridos que presenta como el acemanán (mananos acetilados) y manosa-6-fosfato (Davis y col. 1994).

Aunque la planta *U. urens* no es muy conocida y empleada, existen investigaciones etnobotánicas y científicas que ponen interés en su uso y aplicación, esta planta se caracteriza por sus propiedades analgésicas e antiinflamatorias, y antioxidante (83), además de su elevado contenido de compuestos fenólicos y ácido linoleico demostrados in vitro reafirman tener propiedades analgésicas e antioxidantes (86).

3.5. Determinación del efecto del biopolímero diseñado a base de: colágeno y extractos de *Aloe maculata*, *Urtica urens* sobre la proliferación de fibroblastos *in vitro*.

Para el diseño de los biopolímeros se trabajó en base a un diseño factorial multinivel, teniendo como factores a los componentes de los biopolímeros (colágeno, *Aloe maculata* y *Urtica urens*) y sus concentraciones.

Se evaluaron concentraciones de polisacáridos de 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg/mL para los componentes *Aloe maculata* y *Urtica urens* en cada una de las matrices, se trabajaron concentraciones de colágeno de 10 y 20 mg/ml.

ANEXO 2. La elección de las concentraciones de los componentes para el biopolímero se basó en la bibliografía estudiada previamente.

Shanmuganathan S., et al (67) quien realiza el diseño de una membrana de colágeno y *Aloe*, trabaja con rangos entre 0.5 y 2.0mg/mL.

En el diseño del biopolímero se decidió aumentar el rango de prueba a 4.0 mg/mL de polisacáridos para evidenciar el efecto del *A. maculata*. en las células; aunque no existen trabajos previos de membranas de colágeno con *U. urens* se vio por conveniente emplear concentraciones similares para ambos extractos. Otros autores han formulado membranas con colágeno como principal componente, combinando con otros materiales como: alginato oxidado (Balakrishnan B., et al 2005), quitina (Arias J. 2009), poliuretano (Wu Z. et. al 2003).

3.5.1. Cultivo y viabilidad de fibroblastos en presencia de los biopolímeros

El cultivo celular es una etapa importante para poder comprobar el efecto del biopolímero sobre la proliferación de fibroblastos.

Se comprobó el efecto que tiene el biopolímero sobre los fibroblastos a través de su capacidad para favorecer el crecimiento de estos, la proliferación celular se analizó empleando el método el método colorimétrico de MTT.

Diversas investigaciones reportan la importancia de los fibroblastos en el proceso de regeneración celular, en este sentido se evaluó la viabilidad celular de los fibroblastos en presencia de los biopolímeros diseñados.

El ensayo de azul de tripan fue utilizado para el recuento de las células íntegras, este método se basa en que las células vivas (viables) mantienen la membrana intacta y selectiva por lo tanto no captan el azul de tripan, mientras que las células muertas (no viables) si lo hacen. Este ensayo se realizó previo al cultivo celular para cuantificar el número de células por pase. Una vez realizado el cultivo celular se utilizó el método del MTT de Mossann 1983, porque cuantifica por colorimetría la viabilidad celular durante el proceso de proliferación celular, fase donde el metabolismo es más activo convirtiendo las sales de tetrazolium (amarillo y soluble) a cristales de formazan (púrpura e insoluble). En la (Fig.13) se muestra las placas de cultivo en cada una de ellas se encuentra la composición de las matrices diseñadas del biopolímero con el cultivo de fibroblasto. ANEXO 2.

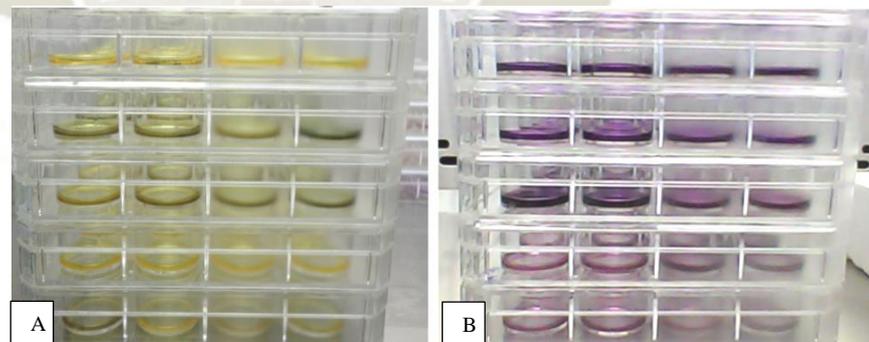


Figura 13. Placas de cultivo de fibroblasto- biopolímeros con el reactivo MTT.
A) Placas en presencia de sale de tetrazolium B) Formación de cristales de formazan diluidos en DMSO luego de 4horas.

Luego de 4 horas se midieron las absorbancias (570nm) a cada una de las matrices, los resultados fueron expresados en porcentaje de viabilidad Tabla 10 y ANEXO 3.

Se empleó el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV, para realizar los análisis estadísticos que nos permitieron analizar el efecto de cada componente y en conjunto (biopolímero). Se tuvo en cuenta que la absorbancia de colágeno para 10000 células fue de 0.239 el cual se empleó como patrón para el porcentaje de viabilidad.

Tabla 10

Porcentaje de viabilidad de las matrices conformadas por colágeno, Aloe maculata y Urtica urens.

Concentración de biopolímeros (mg/ml)			Porcentaje de viabilidad (%)		
Colágeno	<i>Aloe maculata</i>	<i>Urtica Urens</i>	1	2	3
10	0.5	0.5	456.90	404.18	427.20
10	0.5	1	328.87	282.43	326.36
10	0.5	2	330.96	368.62	288.28
10	0.5	4	346.86	421.34	467.36
10	1	0.5	650.21	430.13	326.78
10	1	1	703.77	709.21	678.66
10	1	2	772.80	727.20	728.45
10	1	4	612.97	799.58	789.96
10	2	0.5	413.39	553.14	559.00
10	2	1	463.18	534.73	529.71
10	2	2	448.12	565.69	620.50
10	2	4	359.83	425.52	416.32
10	4	0.5	405.02	356.90	366.53
10	4	1	512.13	416.32	590.38
10	4	2	476.57	453.14	532.22
10	4	4	459.00	416.74	636.82
20	0.5	0.5	17.15	19.25	21.34
20	0.5	1	17.15	15.90	17.15
20	0.5	2	17.57	19.25	17.15
20	0.5	4	20.50	19.67	18.41
20	1	0.5	71.13	66.95	58.58
20	1	1	56.07	59.41	55.23
20	1	2	58.58	66.95	62.76
20	1	4	47.70	47.70	84.52
20	2	0.5	37.66	38.49	39.33
20	2	1	45.19	38.49	38.49
20	2	2	38.49	42.68	38.49
20	2	4	39.33	42.68	44.35
20	4	0.5	46.86	52.72	55.23
20	4	1	58.58	50.21	46.86
20	4	2	56.07	61.92	46.86
20	4	4	51.05	54.39	51.05

Teniendo en cuenta las múltiples concentraciones y diseños de la matriz se empleó el diagrama de Pareto para identificar de manera gráfica que componentes tienen mayor efecto en el diseño de los biopolímeros.

En la (Fig.14) se observa el diagrama de Pareto para la matriz formada por la interacción, de los tres factores que conforman el biopolímero, cada uno analizado por separado y en conjunto, para poder identificar que componente del biopolímero fue significativo y relevante en sobre la proliferación celular de fibroblastos.

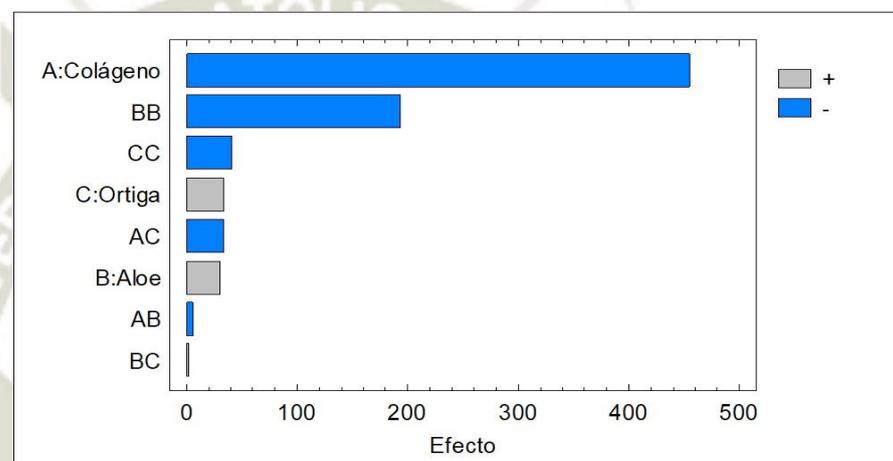


Figura 14. Diagrama de Pareto para el biopolímero de colágeno, *Aloe maculata* y *Urtica urens*.

Se observa que el colágeno presenta un mayor efecto negativo sobre la proliferación de fibroblastos generando a mayores concentraciones un efecto negativo sobre la proliferación celular, lo mismo que con el *Aloe maculata*, es importante determinar en qué grado este efecto es significativo sobre el cultivo; en la la (Fig.15) podemos observar que este efecto negativo solo se da entre concentraciones de 10 y 20 mg/ml, por lo que podemos inferir que a menores concentraciones el colágeno podría presentar un efecto positivo sobre la proliferación celular, sin embargo es necesario realizar otros estudios a menores concentraciones para determinar la influencia del colágeno. Según el diagrama de Pareto mostrado en la la (Fig.14) también se observa que el *Aloe maculata* también muestra un efecto negativo la proliferación

celular, sin embargo de acuerdo a la la (Fig.15), este efecto entre concentraciones de 0,5 a 2 mg/ml se observa un efecto positivo sobre la proliferación celular, el efecto negativo se da a concentraciones mayores a 2 mg/ ml.

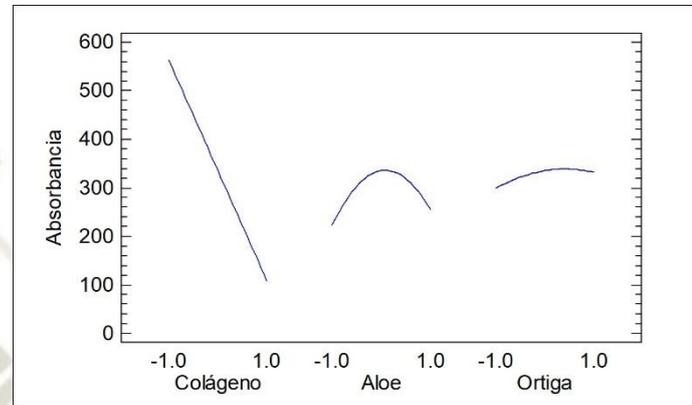


Figura 15. Gráfica de efectos principales de la matriz: colágeno, *Aloe maculata* y *Urtica urens* .

La (Fig.15) muestra la interacción de los tres componentes donde se evidencia con mayor claridad que a medida que las concentraciones de colágeno aumentan el porcentaje de viabilidad disminuye teniendo una tendencia lineal.

Sin embargo *Aloe maculata* muestra una tendencia cuadrática, donde se identifica la concentración ideal (alrededor de 2mg/mL) para una mayor proliferación celular con valores de absorbancia de 1.37 aproximadamente, además que valores mayores o menores de 2mg/mL tendrán un efecto negativo en la proliferación celular.

Para el caso de *Urtica urens* a medida que su concentración aumenta (0.5mg/mL – 4mg/mL) se nota un ligero aumento en el porcentaje de viabilidad celular con valores de absorbancia de 1.26 a 1.36.

En la Tabla 11 se muestra la interacción entre los componentes del polímero colágeno, *Aloe maculata* y *Urtica urens*, se observa que colágeno y *Aloe maculata* muestran una interacción con valor de P de 0.0000, lo que indica que tienen un efecto significativo en el polímero.

Tabla 11

Análisis de varianza para el porcentaje de viabilidad de los biopolímeros conformados por colágeno, Aloe maculata y Urtica urens.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Colágeno	4.95878E6	1	4.95878E6	576.89	0.0000
B:Aloe	12592.9	1	12592.9	1.47	0.2295
C:Ortiga	14780.7	1	14780.7	1.72	0.1933
AB	509.57	1	509.57	0.06	0.8082
AC	14384.1	1	14384.1	1.67	0.1993
BB	176357.	1	176357.	20.52	0.0000
BC	39.7301	1	39.7301	0.00	0.9460
CC	7813.99	1	7813.99	0.91	0.3431
bloques	5311.34	2	2655.67	0.31	0.7350
Error total	730641.	85	8595.78		
Total (corr.)	5.92121E6	95			

Se realizó un gráfico de superficie de respuesta para establecer valores de colágeno, *Aloe maculata* y *Urtica urens* que optimicen la respuesta en la proliferación celular de fibroblastos, estos datos se obtienen con los valores de absorbancia obtenidos, también nos permitió determinar valores mínimos y máximos de la actividad proliferativa de acuerdo a las matrices de biopolímeros diseñados.

En la (Fig.16) se observa el comportamiento en función de la gráfica tridimensional de superficie de respuesta de la interacción entre a) colágeno-*Aloe maculata* y b) colágeno-*Urtica urens*; en función de la concentración y la absorbancia como medida de la respuesta proliferativa.

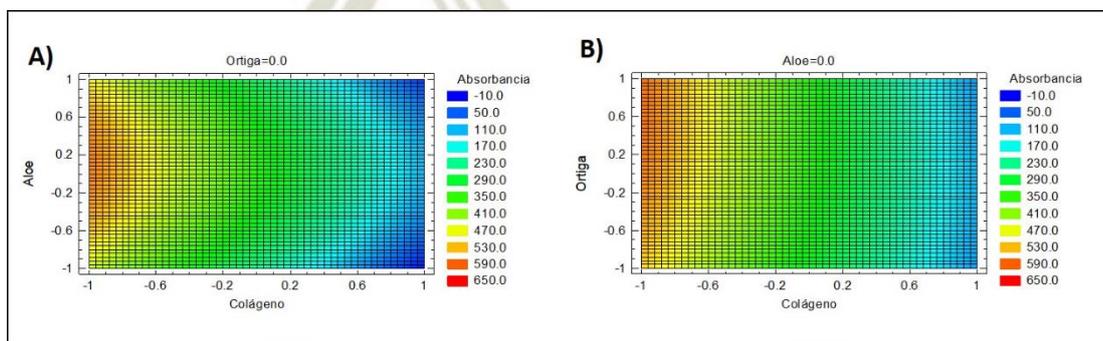


Figura 16. Gráfico de contornos para porcentaje de viabilidad para la interacción de colágeno, *Aloe maculata* y *Urtica urens*.

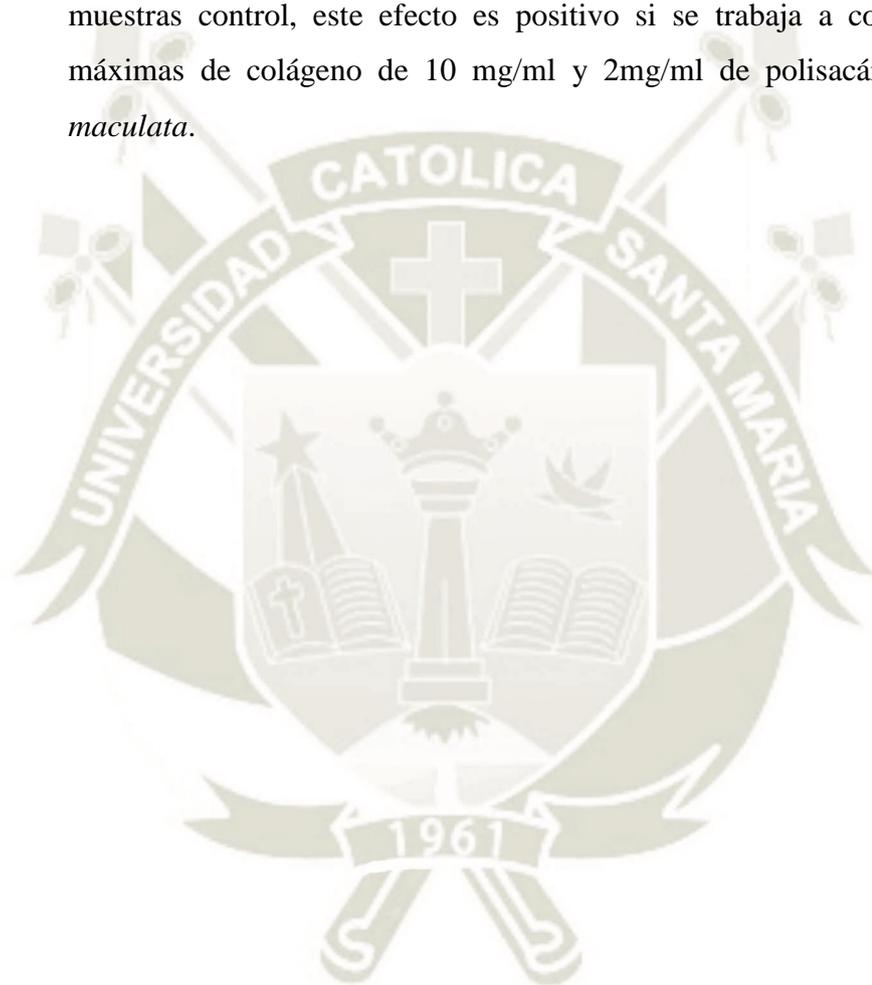
Este tipo de gráfico nos permite determinar el comportamiento de los componentes asociados que interactúan dando como resultado la respuesta proliferativa, ambos gráficos muestran que la concentración óptima de colágeno se encuentra por debajo de los 10 mg/ml, siendo que se observa que a concentraciones mayores a 10 mg/ml el efecto sobre la proliferación de fibroblastos proporcionado por el colágeno disminuye, pese a esta disminución es importante recalcar que pese a este efecto la participación de este componente en el biopolímero favorece la proliferación celular. De acuerdo al gráfico de interacción del colágeno con *Aloe maculata* podemos inferir que la concentración óptima aproximada de aloe es 1.65 mg/ml, mientras que la concentración de óptima de *Urtica urens* se encuentra entre los 2-4 mg/ml, esta concentración está medida en función al contenido de polisacáridos presentes en los extractos.

Este trabajo se enfocó a emplear las propiedades ya conocidas por parte del *Aloe maculata* y *Urtica urens* unidos a una matriz de soporte formada por el colágeno, la interacción de estos componentes ha demostrado que existe un efecto sobre la proliferación celular, este efecto puede ser positivo si se trabaja a concentraciones de colágeno máximas de 10 mg/ml de colágeno y a una concentración máxima de polisacáridos de *Aloe maculata* de 2 mg/ml. El presente trabajo tubo como materia de estudio el diseño de un biopolímero y el estudio de los componentes del mismo en la determinación del efecto de estos sobre la proliferación celular, para su posterior estudio como alternativa para el tratamiento de lesiones cutáneas.

En las etapas de regeneración tisular, ya sea de heridas normales o crónicas el proceso más importante es la formación de la cicatriz lo que favorece la proliferación de fibroblastos y por ende acelera el proceso de cicatrización. Esta demostrado que el colágeno de tipo I empleado como apósito tiene un papel fundamental como: inhibidor o desactivador de las metaloproteinas, la producción de fibroblastos, el aumento y permeabilidad, debido a la porosidad de la membrana, ayuda en la absorción y biodisponibilidad de la fibronectina, ayuda a preservar leucocitos, macrófagos, fibroblastos y células epiteliales lo que favorece la cicatrización y ayudan al

mantenimiento de la química y microambiente termostática de la herida (Burton et al, 1978; Doillon et al, 1984, 1986, 1988; Palmieri, 1992; Brett, 2008).

En este sentido el biopolímero diseñado demostró tener un efecto sobre la proliferación celular de fibroblastos dermales humanos *in vitro* frente a muestras control, este efecto es positivo si se trabaja a concentraciones máximas de colágeno de 10 mg/ml y 2mg/ml de polisacáridos de *Aloe maculata*.



CONCLUSIONES

PRIMERO.- Se extrajo colágeno en la cubierta de las especies marinas *Isurus oxyrinchus* (Diamante) y *Mustelus whitneyi*, (Tollo) mediante un método que consiste en 5 etapas: eliminación de proteína no colágena, solubilización de colágeno, precipitación salina, centrifugación y diálisis.

SEGUNDO.- Las características fisicoquímicas del colágeno extraído a partir de las pieles de las especies *Isurus oxyrinchus* (Diamante) y *Mustelus whitneyi* (Tollo) fueron: pH 3.7 y 4; contenido de hidroxiprolina: 0.361 y 0.561 ug/mL respectivamente. La prueba de calidad evidenció la ausencia de microorganismos mesófilos, enterobacterias, y la presencia de hongos y levaduras. Se comprobó mediante el ensayo de electroforesis SDS-PAGE que las muestras corresponden a colágeno de tipo I.

TERCERO: El rendimiento de colágeno extraído a partir de las pieles de *Isurus oxyrinchus* (Diamante) fue de $32.1 \pm 1\%$ y *Mustelus whitneyi* (Tollo) $24.6 \pm 1.3 \%$.

CUARTO.- Se preparó los extractos de las plantas de *Aloe maculata* y *Urtica urens*, el contenido de polisacáridos fue determinado mediante el método fenol ácido sulfúrico, el contenido promedio de polisacáridos totales de *Aloe maculata* fue de 0.2877 ± 0.0684 y *Urtica urens* de 0.2422 ± 0.0799 mg/mL.

QUINTO.- Se evaluó el efecto del biopolímero diseñado para favorecer la proliferación de fibroblastos humanos cultivados in vitro, el porcentaje de viabilidad más alto presente en el biopolímero fue con las concentraciones de colágeno de 10 mg/mL, 1.977mg/mL de *Aloe maculata* y 3.350mg/mL de *Urtica urens*.

SUGERENCIAS

De lo investigado en la presente tesis presentamos algunas sugerencias para posteriores investigaciones:

- Es importante la eliminación de otro tipo de proteínas por lo cual se podría realizar estudios con el uso de enzimas para eliminar las proteínas que no correspondan a colágeno.
- Se podrían realizar estudios de extracción de colágeno a partir de otras especies marinas.
- Para un análisis más detallado de la composición del colágeno se sugiere realizar un análisis de componentes por HPLC.
- Trabajar con concentraciones entre 0.1-2mg/mL de *Aloe maculata* y con concentraciones mayores a las empleadas de *Urtica urens* para observar su efecto la proliferación celular.
- Se sugiere trabajar con concentraciones de colágeno menores a 10 mg/mL.
- Para un mejor análisis se sugiere cuantificar el contenido de taninos en los extractos de *Urtica urens*.
- Realizar una evaluación de la capacidad regeneradora del biopolímero *in vivo*.

REFERENCIAS

1. Nagai T.S. Isolation of collagen from fish waste material:(skin,bone and fins). Food chemistry. 1999; 68: p. 277-281.
2. ICONTEC. Productos para la industria cosmética: Colágeno soluble. Bogotá D.C., NTC 3750; 1995.
3. Bernaldes, D.M; Caride, F. ; Lewis,A.; Martin, L. Membranas de colágeno polimerizado:consideraciones sobre su uso en técnicas de regeneración tisular y ósea guiadas. Rev. Cubana. Invest. Biomed. 2004;; p. 65-74.
4. Sheridan RL, Tompkins RG. Skin substitutes in burns. Burns. 1999; 25: p. 97-103.
5. Zhang Y, Liu W et. al. Isolation and partial characterization of pepsin- soluble collagen from skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Food Chemistry. 2007; 103: p. 906-912.
6. Gonzalez Tuero J.H, Ramirez R, Pineda M, Quiala J, Salazar.J. Heridas. Metodos de tratamiento. MEDISAN. 2004; 8(1): p. 33-42.
7. Gómez R, Figueroa C, Martínez JM, Rodríguez Y. Análisis de la prefactibilidad económica para la obtención de colágeno de origen porcino. ResearchGate. 2016 Noviembre.
8. Ferraro GM. Revisión de la Aloe vera (*Barbadensis Miller*) en la dermatología actual. Rev Argent Dermatol. 2009; 90: p. 218-223.
9. Almonacid MA. Efecto antiinflamatorio y cicatrizante del extracto liofilizado de Aloe vera (*Aloe Vera (L)*). Lima: Universidad Mayor de San Marcos; 2012.
10. Rojas GA, Rodríguez C. Uso de la sábila (*Aloe vera*) en la regeneración muscular de un equino. Rev. Electron. vet. 2017; 18(01): p. 1-12.
11. Marrassini C, Gorzalczany S, Ferraro G. Actividad analgésica de dos especies de *Urtica* con usos etnomédicos en la República Argentina. Dominguezia. 2010; 26(1).
12. Huerta C. Ortega mayor , *Urtica dioica L*. Medicina naturista. 2007; 1(2): p. 131-137.
13. Franco M, Higita ANJ. Estudio de la síntesis de biopolímeros de origen microbiano. QUID. 2015; 25: p. 69-78.
14. Rojas MG, Vallejo BM, Perilla EJ. Biopolymers as materials for product development in pharmaceutical applications and biomedical uses. Ing. Investig. 2009 Jan./Apr; 28(1).
15. Ratner B. HAFLJ. Biomaterials Science. An introduction to Materials in Medicine. Academic Press. 1986.
16. Medical device regulations : global overview and guiding principles. 1211 Geneva 27, Switzerland: World Health Organization can be obtained from Marketing and Dissemination, World Health Organization.; 2003.
17. Satturwar PM, Fulzele SV, Dorle AK. Biodegradation and In vivo Biocompatibility of Rosin: a natural film forming polymer. AAPS PharmSciTech. 2033; 4(55): p. 1-6.
18. Barcellos IO, S.G. C, Pires A, Alvarez M. In vivo and in Vitro responses to poly (ethylene terephthalate co-diethylene glycol terephthalate) and polyethylene

- oxide blends. *Biomaterials*. 1998; 19: p. 2075-2082.
19. Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and Biocompatibility of PLA and PLGA Microspheres. *Adv Drug Del Rev*. 1997; 28: p. 5-24.
 20. Saraydin D,SSU, Karadag E, Koptagle E, Guven O. In vivo biocompatibility of radiation crosslinked acrylamide copolymers. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*. 2004; B 217: p. 281-292.
 21. Zhang H,CW,BJ,WS. Preparation of poly (lactide –co-glycolide –co-caprolactone) nanoparticles and their degradation behaviour in aqueous solution. 2006..
 22. Rosero MV. Estudio de los biomateriales para el desarrollo de endoprotesis. Tesis de grado,Ingeniería Mecánica y Mecatrónica. Universidad Nacional de Colombia; 2003.
 23. FDA. FDA. [Online].; 1995 [cited 2018 Mayo. Available from: <http://www.fda.gov/cdrh/g951.html>, 15/03/0.
 24. Elisseeff J, Anseth K,Simst D, MsintochW. Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation.. *Proc. Natl.Acad. Sci*. 1999; 96: p. 3104-3107.
 25. Lee CJ, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *International journal of pharmaceutics*. 2001; 221(1): p. 1-22.
 26. Haim Tal, Ofer M, Amital K, CN. Bioresorbable Collagen Membranes for Guided Bone Regeneration. [Online].; 2012. Available from: <http://www.intechopen.com/books/>.
 27. Aragón C. MH. Fuentes del colágeno y sus métodos de extracción. 2011 Agosto 24.
 28. Haard NF. Control of Chemical-Composition and Food Quality Attributes of Cultured Fish. *Food Research International*. 1992; 25(4): p. 289-307.
 29. Gómez-Lizarraga K, Pina-Barba C, Rodríguez-Fuentes N, Romero M. Obtención y caracterización de colagena tipo I a partir de tendón bovino. México D.F: Universidad Autónoma de México, Instituto de Investigación en Materiales; 2011.
 30. Sato K,Yoshinaka R, Sato M y Ikeda S. A Simplified Method for Determining Collagen in Fish Muscle. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 1986; 5(52): p. 889-893.
 31. (AFIB) AFdeB. Guía para la determinación de tiburones de importancia comercial en el Perú. 2015. Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N 2015-11535.
 32. Chirichigno N. Clave para identificar los peces marinos del Perú. Lima: Instituto del mar del Perú; 1998. Report No.: 44.
 33. Navia AF, Mej+ia PA, Caicedo JA. Guía para la identificación de especies de tiburones y rayas comercializadas en el Pacífico Colombino. Fundación SQUALUS; 2007.
 34. Romero MA, Alcántara PF, Verde K. Guía de campo para la determinación de tiburones e la pesca artesanal del Perú. Lima: Instituto del Mar del Perú.; 2015.
 35. Lamilla JyB. Guía para el reconocimineto de:tiburones, rayas y quimeras de

- Chile. Oceana; 2005.
36. Institutional FAO Web Site FAO FishFinder. FAO Fisheries and Aquaculture Department (online).Rome. [Online].; 2010-2018 [cited 2015. Available from: <http://www.fao.org/fishery/>.
 37. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. [Online].; 2018 [cited 2018 Abril 24. Available from: <http://www.tropicos.org/Reference/100000886>.
 38. Vibrans H, al e. Malezas de Mexico. [Online].; 2009 [cited 2015 Set. Available from:<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asphodelaceae/aloe-vera/fichas/ficha.htm>.
 39. Ramachandra C, Srinivasa P. Processing of Aloe vera leaf gel: a review. American Journal of Agricultural and Biological Sciences. 2008; 2(3): p. 502.
 40. Reynolds T, Dweck AC. Aloe vera leaf gel:a review update. 1999; 1(68): p. 3-37.
 41. Choi S, Chung MH. A review on the relationship between Aloe vera components and their biologic effect. WB Saunders. 2003; 1(1): p. 53-62.
 42. Domínguez, R N; Arzate V., I; Chanona P., J J; Welti Ch., J S; Alvarado G., J S; Calderón D., G; Garibay F., V; Gutierrez L., G F. El gel de Aloe vera:Estructura, composición química, procesamiento,actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 2012; 11(1): p. 23-43.
 43. Vinson J, Al Kharh y Adreoli L. Effect of Aloe vera preparation on the human bioavailability of vitamin C and E. Phytomedicine. 2005; 12: p. 760-765.
 44. Macé F. Vivero Terra Nostra. [Online].; 2009. Available from: <http://terranostra-terranostra.blogspot.com/>.
 45. International Aloe Science Council. [Online].; 2018 [cited 2018 03 15. Available from: <http://www.iasc.org>.
 46. Okamura M, Asaia M, Hine N y Yagi A. High performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in Aloe species. Journal Chromatographic A. 1996; 747: p. 225-231.
 47. Rivero R,Rodriguez E,Menéndez R,Fernández J, Del carpio B,González M. Obtención y caracterización preliminar de un extracto de Aloe vera L. con actividad antiviral. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2002; 7: p. 32-38.
 48. Reynolds T. Aloes: The Genus Aloe. Medicinal and aromatic plants-industrial profiles. .
 49. Santamaria X, Yunga U L. Beneficios que otorga el Aloe Vera como planta medicinal. Monografía. Cuenca - Ecuador: Universidad Catolica de Cuenca; 2011.
 50. Dominguez, R N; Arzate, I; Chanona, J; Welti, JS; Alvarado, J S; Calderon, G; Gaaribay, V; Gutierrez, G F. El gel de Aloe vera :estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. Rev. Mex. Ing. Quim. 2012; 11(1).
 51. Eun Ah Yoo SD, Whi M, Hwa J, Sang K, Jae Y, Wongi M, et al. Evaluation of antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from Aloe saponaria Haw. Phytotherapy Research. 2008 October; 22(10).

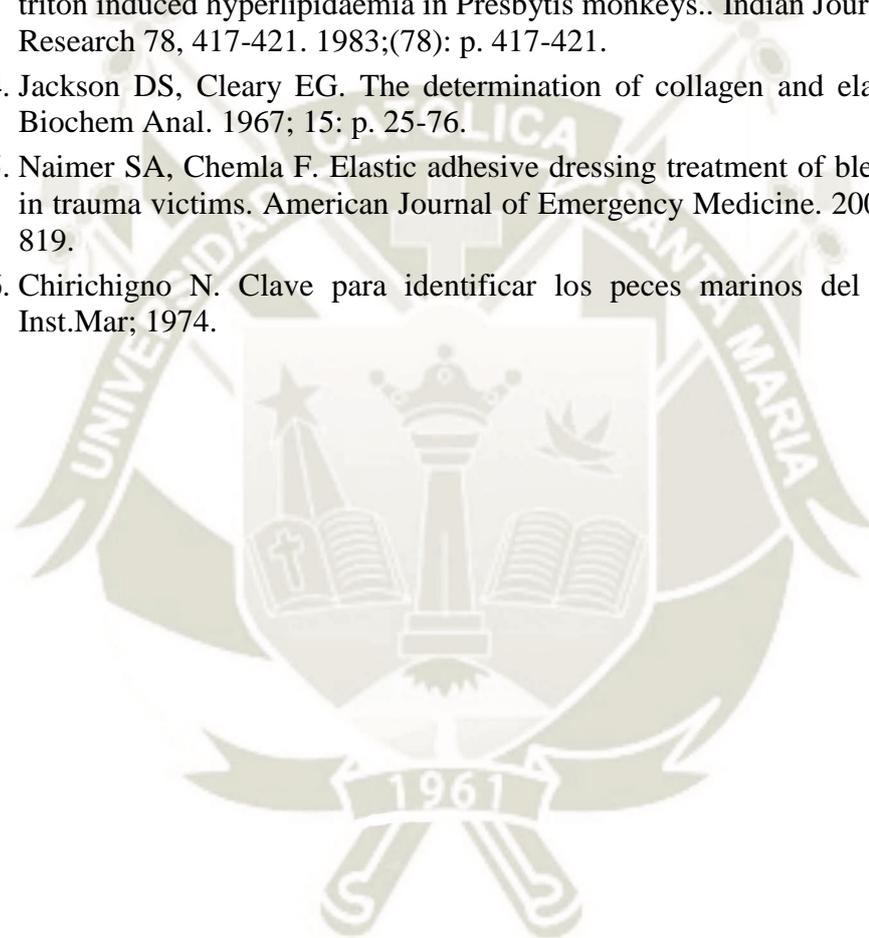
52. Akira Y, Kozo Hamada INKMNH. Structure determination of polysaccharides in Aloe saponaria(Hill.) Haw.(Liliaceae). Journal Pharmaceutical Sciences. 1984 January; 73(1).
53. Porcuna JL. La ortiga,Urtica Urens y Urtica Dioica. Revista AE. 2010; 2.
54. Http.curartenaturalment.blogspot.com.Es. [Online].; 2011.
55. Tomo Navas M. Flora de la cuenca de Santiago de Chile. 1973.
56. Font quer P. Plantas Medicinales. Barcelona; 1976.
57. Schuenberg P,FP. Guía de las Plantas Medicinales. Barcelona; 1972.
58. Red de proteccion social Gobierno de Chile Ministerio de Salud. Medicamentos Herbarios Tradicionales..
59. Tankred W. Utilidad del jugo de sumidad de ortiga en el tratamiento de afecciones urológicas y reumatológicas. Separata de la revista de Fitoterapia. 2011; 11(1).
60. Morales J. Jardinería, Plantas y el Jardin en infojardin.com. [Online].; 2002 [cited 2015 Marzo 25. Available from: www.infojardi.com.
61. Dubois M. et.al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 1956; 28: p. 350-356.
62. Serrano J. Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos del fileteo de tilapia (*Oreochromis sp.*) y cachama (*Piaractus brachyomus*). Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2011.
63. Primo Yufera E. Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria Barcelona: Editorial Reverte, S.A; 1995.
64. Duan R, Zhang,J. "Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*)". Food Chemistry. 2009; 3(112): p. 702-706.
65. Wang L, X. An ea. "Isolation and characterization of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebaste mentella*)." Food Chemistry. 2008; 2(108): p. 616-628.
66. Shanmuganathan S, Shanmugasundaram N, Adhirajan N, Ramyaa Lakshmi TS, Babu M. Diseño de una matriz de sopoprte compuesta de colágeno de piel de tiburón-aloe para ingeniería tisular. Ars Pharm. 2008; 4(49): p. 321-340.
67. Torres-Arreola W, Pacheco-Aguilar R, Sotelo-Mundo R, Rouzaud-Sández O, Ezquerro-Brauer JM. Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante(*Dosidicus gigas*). Ciencia y Tecnología Alimentaria. 2008; 6(2): p. 101-108.
68. Ribgy BJ. Amino-acid composition and thermal stability of the skin collagen of the Antarctic ice-fish. Nature. 1968; 219(5150).
69. Sikorski Z, Borderias J. Collagen in the muscles and skins of marine animals. En: Sea Food Protein Sikorski, ZE, Pan, BS, Shahidi, F (eds),Chapman and Hall. 1994;: p. 58-70.
70. Badii F, Howell N. Elucidation of the effect of formaldehyde and lipids on frozen stored cod collagen by FT-raman spectroscopy and differential scanning calorimetry. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 2003; 51: p. 1440-1446.
71. Kimura S, Ohno Y. Fish type I collagen: Tissue-specific existence of 2

- molecular forms, $(\alpha 1)2\alpha 2$ and $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$, in alaska pollock. *Comparative Biochemistry and Physiology* 88B. 1987;: p. 409-413.
72. Nagai T, et al. Isolation and characterisation of collagen from the outer skin waste material of cuttlefish (*Sepia lycidas*). *Food Chemistry*. 2001; 72: p. 425-429.
 73. Mocan E, Tagadiuc O, Naco V. Aspects of collagen isolation procedure. *Curierul medical*. 2011; 2(320).
 74. Parenteau-Bareil R, Gaubin R, Berthod. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials*. 2010; 3: p. 1863-1887.
 75. Montero P, Borderias J, Turnay J, & Leyzarbe MA. Characterization of hake (*Merluccius merluccius* L.) and trout (*Salmo irideus* Gibb) collagen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1990; 38: p. 604-609.
 76. Muyonga JH, et al. Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*. 2004; 85: p. 81-89.
 77. Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, & Tanaka M. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*. 2005; 3(89): p. 362-373.
 78. Mosquera JM. Nanoencapsulación de hidrolizados pesqueros con actividades biológicas procedentes de subproductos de la pesca. Tesis Doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos; 2014.
 79. Zhang J, Duan R, et al. Characterization of acid-soluble collagen from skin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*. 2009: p. 318-322.
 80. Zeng S, Zhang et al. Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Chemistry*. 2009; 2(116): p. 879-883.
 81. Wang L, An X, et al. Isolation and characterization of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebaste mentella*). *Food Chemistry*. 2008; 2(108): p. 616-623.
 82. Amaro de Carvalho AR. *Urtica* spp. Bioactividad y Cultivo. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias y Tecnología Universidad de Coimbra, Departamento de Ciencias de la Vida; 2014.
 83. Natural Cy. <http://curativoynatural.blogspot.pe/>. [Online].; 2013.
 84. Nadinic J. *Revista bienestarbien*. [Online]; 2015 [cited 2018 Mayo. Available from: http://www.natura.net/arg/bien_estar_bien_aloe_vera.asp.
 85. Lobna M, Sazzat H, Wiem T. New insights of Nettle (*Urtica urens*): Antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Medicinal Planta Research*. 2017; 11(4): p. 73-86.
 86. Fratzl P. Collagen: Structure and mechanics, an introduction. *Collagen*. 2008: p. 1-13.
 87. Langer R, Vacanti, JP. Tissue engineering. *Science*. 1993; 260: p. 920-926.
 88. Lizarbe MA. Sustitutivos de tejidos de los biomateriales a la ingeniería tisular. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fis.Nat*. 2007; 101(1): p. 227-249.

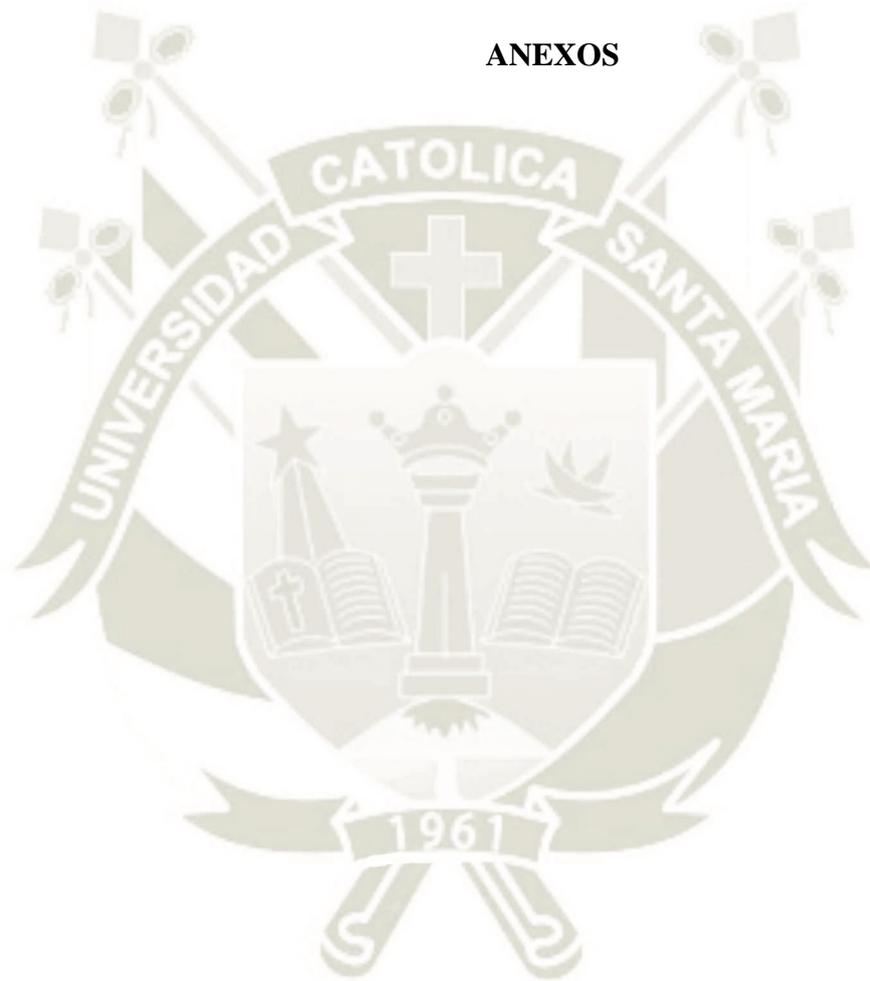
89. D Willians. Biomaterials and biocompatibility. *Med Prog Technol.* ; 4: p. 31-42.
90. DF Willians. The Willians dictionary of biomaterials. University Press. Liverpool, UK.
91. Hench L, Ethridge E. Biomaterials. An interfacial approach. 1982; 4.
92. Marques PE, Reis RL, Hunt JA. The biocompatibiity of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies. *Biomaterials.* 2002; 23: p. 1471-1478.
93. Rey Perez L. Micromoldeo mediante ultrasonidos. Encapsulación de fármacos y preparación de nanocompuestos; 2013.
94. Anexo C. Polímeros biodegradables. Aplicaciones en suturas quirúrgicas.
95. Collet González, A. Nuevas poliesteramidas biodegradables derivadas de ácido glicólico y aminoácidos con aplicación en biomedicina. 2004.
96. Duffo G. Materiales y materias primas: Biomateriales Buenos Aires; 2012.
97. Singh R DN. Corrosion degradation and prevention by surface modification of biometallic materials. *J Mater Sci Mater Med.* 2007; 18: p. 725-751.
98. Baumann MA. Nickel-titanium: options and challenges. *Dent Clin North Am.* 2004; 48: p. 55-67.
99. Scholes SC, Unsworth A. The tribology of metal-on-metal totl hip replacements. *Proc Inst Mech Eng.* 2006; 220: p. 183-194.
100. LL Hench. Ceramics, glasses and composites in medicine. *Med Instrum.* 1973; 7: p. 136-144.
101. Vallet-Regi M. Revisiting ceramics for medical applications. *Dalton Trans.* 2006; 44: p. 5211-5220.
102. Valimaki V, Haro. Molecular basis for action of bioactive glasses as bone graft substitute. *Scand J Surg.* 2006; 95: p. 95-102.
103. Jones JR, Ehrenfried. L, Saravapavan P, Hench L. Controlling ion release from bioactive glass foam scaffolds with antibacterial properties. *J Mater Sci Mater Med.* ; 17: p. 989-996.
104. Hahn SK, Jelacic. S, Mair. R, Stayton. P, Hoffman A. Anti-inglammatory drug delivery from hyaluronic acid hydrogels. *J Biomater Sci Polym Ed.* ; 15: p. 1111-1119.
105. Hoffman. AS, Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002; 54: p. 3-12.
106. Vela Huitron M, Ramírez F R, Martínez H. AL, Martínez S. KJ. Síntesis de polímeros híbridos biodegradables a partir de fibras de nylon y moléculas de queratina y colágeno. Guanajuato, Mexico: Universidad Autonoma de Guanajuato, Ingeniería en Materiales, Centro de Física aplicada y tecnología Avanzada, UNAM; 2007.
107. Bateman JF, Lamande SR, Ramshaw JA. Collagen superfamily. En extracellular Matrix. Harwood Academic Pubishers. UK. 1996: p. 22-67.
108. Lee CJ, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *International journal of pharmaceutics.* 2011; 1(211): p. 1-22.
109. Jaksic T, Burke JF. The use of "artificial skin" for burns. *Annual Review of Medicine.* 1987;; p. 107-117.

110. Franco, M; Gonzáles, N; Diaz, M; Pardo, S; Ospina, S. Epidemiological and clinical profile of burn victims Hospital Universitario San Vicente de Paul Medellin, 1994-2004. Medellin; 2006.
111. Schulz III, JT; Tompkins, RG; Burke, JF. Artificial skin. Annual Review of Medicine. 2000;: p. 231-244.
112. Horch, R E; Kopp, J; Kneser, U; Beier, J; Bach, AD. Tissue engineering of culture skin substitutes. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2005 Jul-Sep; 9(3): p. 592-608.
113. Souto, LR; Rehder, J; Vasallo, J; Cintra, ML; Puzzi; Puzzi, MB. Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. Sao Paulo Medical Journal. 2006; 142(2): p. 71-76.
114. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implat biomaterial research in bone: a review. Eur Cell Mater. 2007; 13: p. 1-10.
115. Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes:A review. J. Periodontol. 2001; 72: p. 215-29.
116. Ramos, Mikol; Zamora, V; Rodriguez, G; Sibaja, M. Andamiajes tridimensionales tipo esponja basados en bioconjugados colageno-quitosano como potencial biomaterial para aplicaciones en ingeniería de tejidos. Innotec. 2012; 7: p. 43-48.
117. Wolf K, Sobral PJ, Telis VR. Physicochemical characterization of collagen fibers and collagen powder for self-composite film production. Food Hydrocolloids. 2009; 23(7): p. 1886-1894.
118. Anexo C. Polímeros biodegradables.Aplicaciones en suturas quirurgicas.
119. Moscoso JL. Estudios de biopelículas de compositos de colágeno de calamar gigante(Dosidicus gigas) y quitosina. , Programa de Maestría de Tecnología de alimentos.
121. Cantu C. Guía de tiburones del Perú.
122. Loots DT., vander Westhuizen FH y Botes. L. Aloe ferox leaf gel phytochemical content, antioxidant capacity, and possible health benefits. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2007; 55.
123. Davis J,Dibner D y Battey JF. End labeling of synthetic probes: Basic method in molecular biology.. 1986;: p. 72-74.
124. Thompson D,Harvey A, Kasm M, y Stout J. Fibrinolysis and angiogenesis in wound healing. Journal of Pathology. 1991;(165): p. 311-318.
125. Bischoff J. (1995). Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. Trends Cell Biology 5 67. Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis.. Trends Cell Biology. ; 5: p. 69-74.
126. Folkman J,y Klagsbrun. M. Angiogenic factor. Science. 1987;(235): p. 442-447.
127. Phillips D,Whitehead.A y Kighton. R. Initiation and pattern of angiogenesis in wound healing in the rat. American Journal of Anatomy. 1991; 192: p. 257-262.
128. Rey Perez L. Micromoldeo mediante ultrasonidos. Encapsulación de farmacos y preparación de nanocompuestos. 2013.
129. Gonzáles CJ. Nuevas poliesteramidas biodegradables derivadas de ácido glicólico y aminoácidos con aplicación en biomedicina. 2004.

130. Landro, Maria Eulalia; Francalacaccia, Veronica; Douglas, Ana Laura. Medicina regenerativa: Su aplicación en traumatología. Rev. Asoc. Argent. Ortop. Traumatol. 2010; 75(4): p. 398-403.
131. Stadelmann WK Digenes A, Tobin G. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. The American Journal of Surgery. 1998; 2(176): p. 26S-38S.
132. The phases of cutaneous wound healing. Experts Review in Molecular Medicine. 2008.
- 133 Dixit V y Joshi.S. Effect of Aloe barbadensis and clofibrate on serum lipids in triton induced hyperlipidaemia in Presbytis monkeys.. Indian Journal of Medical Research 78, 417-421. 1983;(78): p. 417-421.
134. Jackson DS, Cleary EG. The determination of collagen and elastin. Methods Biochem Anal. 1967; 15: p. 25-76.
135. Naimer SA, Chemla F. Elastic adhesive dressing treatment of bleeding wounds in trauma victims. American Journal of Emergency Medicine. 2000; 18: p. 816-819.
136. Chirichigno N. Clave para identificar los peces marinos del Perú. Callao: Inst. Mar; 1974.



ANEXOS



ANEXO 1

Preparación del método de Woessner reactivo de ERLICH para la cuantificación del contenido de hidroxiprolina

Hidróxido de Potasio

KOH 12N (168,3 g. KOH + 250 mL de H₂O)

KOH 1N (14.02 g. KOH + 250 mL de H₂O)

KOH 0.1N (1,40 g. KOH + 250 mL de H₂O)

Fenoltaleína

1g. en 100 mL de etanol

Tampón Borato de potasio con pH 8.7

6.18 g. de ácido bórico + 22.5 g. de cloruro de potasio en 80 mL de agua
ajustar a pH 8.7 adicionando hidróxido de potasio 12N y 1N, enrazar a 100
ML.

Alanina 10%

5 g. Alanina + 45 mL. de H₂O pH 8.7 vol. final 50 mL.

Cloramina T 0.2M

5.64 g. de Cloramina T +100 mL de metoxietanol (Preparar al momento)

Tiosulfato de Sodio 3.6M

267.9 g. Tiosulfato de sodio + 300mL de H₂O calentando levemente y
agitando constantemente hasta disolución total.

Reactivo de EHRlich (Sol. A y B)

Solución A:

Adicionar 6.85 mL de ácido sulfúrico a 50 mL de etanol.

Solución B:

30 g. de ρ -dimetilamino-benzaldehído + 50ml de etanol, se calienta a
37°C para la disolución completa de la sal.

Se adicionó la Sol. A en la Sol. B lentamente enfriando con agua de grifo el frasco.

Ácido Clorhídrico 0.05N

Se diluyen 0.76 ml de ácido clorhídrico concentrado en 500 mL de H₂O

Cálculo final de la cantidad de hidroxiprolina presente en la muestra (Ecuación 1)

$$(\text{mg. de Hyp})(\text{g. de Tejido}) = \left(\frac{(\text{mg. de Hyp})}{(\text{mL.})} \right) \left(\frac{(\text{g. de Tejido})}{(\text{mL.})} \right)$$

Se utilizó la relación de la cantidad de hidroxiprolina en miligramos por mililitro de solución (Ecuación 2)

$$(\text{mg. de Hyp total})(\text{mL.}) = \left[\frac{(A_x - A_b)}{(A_p - A_b)} \right] \times (0.036)$$

Dónde:

A_x = Absorbancia del cromóforo de la muestra final.

A_b = Absorbancia del cromóforo de la solución patrón de trabajo de hidroxiprolina.

A_p = Absorbancia de la solución blanco

Hyp = Hidroxiprolina

ANEXO 2

Diseño de la matriz de trabajo correspondiente a un biopolímero conformado por colágeno y *Aloe maculata*

Concentración (mg/ml)	
COLÁGENO	<i>Aloe maculata</i>
10	0.5
10	1
10	2
10	4
20	0.5
20	1
20	2
20	4

Diseño de la matriz de trabajo correspondiente a un biopolímero conformado por colágeno y *Urtica*

Concentración (mg/ml)	
COLÁGENO	<i>Urtica urens</i>
10	0.5
10	1
10	2
10	4
20	0.5
20	1
20	2
20	4

Diseño de la matriz de trabajo correspondiente a un biopolímero conformado por
Aloe maculata y *Urtica urens*

Concentración (mg/ml)	
<i>Aloe maculata</i>	<i>Urtica urens</i>
0.5	0.5
0.5	1
0.5	2
0.5	4
1	0.5
1	1
1	2
1	4
2	0.5
2	1
2	2
2	4
4	0.5
4	1
4	2
4	4

ANEXO 3

Absorbancias para la matriz colágeno y *Aloe maculata*.

Concentración (mg/ml)		Absorbancia(nm)		
COLÁGENO	ALOE	ABS 1	ABS 2	ABS 3
10	0.5	1.138	1.103	1.66
10	1	1.196	1.048	1.189
10	2	1.134	1.404	1.721
10	4	1.324	1.545	1.093
20	0.5	0.560	0.490	0.600
20	1	0.690	0.790	0.830
20	2	0.710	0.910	0.850
20	4	0.390	0.940	1.240

Donde Abs= Absorbancia (570 nm)

Absorbancias para la matriz colágeno y *Urtica urens*

Concentración (mg/ml)		Absorbancia(nm)		
COLÁGENO	<i>Urtica urens</i>	ABS 1	ABS 2	ABS 3
10	0.5	1.538	1.397	1.607
10	1	1.689	1.409	1.504
10	2	1.396	1.386	1.204
10	4	0.869	0.965	1.078
20	0.5	0.560	0.530	0.510
20	1	0.510	0.430	0.560
20	2	0.560	0.560	0.460
20	4	0.510	0.470	0.550

Donde Abs= Absorbancia (570 nm)

Absorbancias para la matriz *Aloe maculata*. y *Urtica urens*.

Concentración (mg/ml)		Absorbancia (nm)		
<i>Aloe maculata</i>	<i>Urtica urens</i>	ABS 1	ABS 2	ABS3
0.5	0.5	0.571	0.437	0.253
0.5	1	0.326	0.222	0.333
0.5	2	0.280	0.246	0.433
0.5	4	0.633	0.251	0.528
1	0.5	0.208	0.101	0.094
1	1	0.273	0.214	0.212
1	2	0.584	0.282	0.321
1	4	0.296	1.004	0.404
2	0.5	0.362	0.355	0.294
2	1	0.362	0.319	0.246
2	2	0.372	0.393	0.386
2	4	0.178	0.256	0.39
4	0.5	0.206	0.157	0.124
4	1	0.192	0.130	0.142
4	2	0.251	0.284	0.129
4	4	0.134	0.173	0.211

Donde Abs= Absorbancia (570 nm)